

POTENCIALIDADES Y LIMITACIONES DE LAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES COMO BIOFÁRMACOS

**Lic. Yunel Pérez Hernández, MSc. Aymara Valdivia Ávila, Dr.C. Amalia Domínguez
Suárez**

*. Universidad de Matanzas “Camilo Cienfuegos”, Vía Blanca
Km.3, Matanzas, Cuba.*

Resumen

Las enzimas antioxidantes constituyen blancos terapéuticos promisorios para el tratamiento de numerosas enfermedades asociadas al estrés oxidativo. Entre las más importantes y que han sido material de estudio en investigaciones biomédicas se encuentran las enzimas Superóxido dismutasa y catalasa. Las potencialidades se basan en la capacidad ilimitada que presentan las mismas de detoxificar el organismo humano de las especies reactivas del oxígeno que se generan en concentraciones elevadas durante diferentes procesos patológicos como las enfermedades de Parkinson, Alzheimer, el cáncer, isquemia/reperfusión y procesos inflamatorios entre otras. En el presente trabajo se abordan las potencialidades de dichas enzimas para el tratamiento de trastornos donde están involucradas las especies reactivas del oxígeno; así como sus principales limitaciones basadas en las propiedades biofarmacéuticas deficientes que presentan.

Palabras claves: ERO, SOD, catalasa, estrés oxidativo.

I. Introducción

La evolución hacia formas de vida complejas tuvo una base importante en el surgimiento de los primeros organismos fotosintetizadores, que transformaron la atmósfera reductora primitiva en una condición indispensable (presencia de oxígeno molecular) para realizar proceso de respiración celular e incrementar de manera eficiente la producción y disponibilidad de energía metabólica, indispensable en las transformaciones que tuvieron lugar hacia la formación de tejidos, órganos y sistemas de órganos que caracterizan a los organismos superiores actuales. Sin embargo, el paso hacia una atmósfera oxidante impuso una presión selectiva que conllevó a la formación de un sistema de defensa antioxidante presente en todos los organismos de respiración aerobia, conformado por un grupo numeroso de enzimas y compuestos de naturaleza no proteica, que regulan las concentraciones de las especies reactivas del oxígeno (ERO) que son generadas durante procesos metabólicos normales en las células (Carletti y Cantiello, 2007; Valéry et al., 2007).

Las ERO desempeñan funciones importantes como la señalización celular ante diversas situaciones de estrés (Chen et al., 2009), que desencadena un grupo de reacciones moleculares dirigidas a reestablecer el balance redox en células, tejidos y órganos dañados. No obstante, cuando los mecanismos de defensa antioxidante no logran reducir a niveles no tóxicos las ERO se presenta el estado de estrés oxidativo, que ha estado asociado a numerosas patologías en humanos y animales (Borrelli et al., 2008; Epperly et al., 2003).

Entre las enzimas antioxidantes que han constituido un blanco terapéutico para el tratamiento de dichas enfermedades, la Superóxido dismutasa (SOD) y la catalasa han sido extensamente estudiadas con este propósito, a partir de la función catalítica que presentan las mismas. (Góth et al., 2000; Walsh y Wang, 1993).

El presente trabajo tiene como objetivo describir las principales potencialidades y limitaciones que presentan las enzimas antioxidantes Superóxido dismutasa y catalasa como drogas proteicas antiestrés, a partir de estudios *in vitro* e *in vivo* desarrollados en el área de la biomedicina.

II. Desarrollo

II.1. Las enzimas antioxidantes

Las enzimas constituyen las proteínas más especializadas que catalizan todas reacciones metabólicas (síntesis y degradación) que tienen lugar en todos los organismos.

A pesar de las potencialidades de las enzimas para su uso en distintos procesos industriales y biotecnológicos (Kazan y Erarslan, 1997; Brena et al., 1996; Eichler, 2001; Veronese, et al., 2002; Valdivia et al., 2005), no fue posible su explotación hasta el desarrollo de técnicas de purificación que permitiera obtener estas biomoléculas de manera aislada, para su estudio físico-químico, biológico y aplicación final. Una de las mayores perspectivas en el uso de las enzimas por el hombre se encuentra en la industria farmacéutica, debido a las elevadas actividades enzimáticas y especificidades que presentan las mismas.

Entre los grupos de fármacos proteicos que han despertado la atención de los tecnólogos enzimáticos se encuentran las enzimas antioxidantes, presentes en todos los organismos de respiración aerobia. Este grupo de enzimas constituyen una barrera importante para mantener niveles viables de ERO; que son generadas a través de fuentes exógenas y endógenas y han sido vinculadas al desarrollo con numerosos desórdenes desde el nivel celular hasta de organismo (Jay et al., 2006; Kinnula y Crapo, 2003; Henricks y Nijkamp, 2001; Putnam et al., 2000; Bush, 2003).

De manera general el sistema antioxidante de los organismos incluye un conjunto amplio de compuestos proteicos (enzimas antioxidantes), como la Superóxido dismutasa, las peroxidasas, la catalasa y la glutatión reductasa, entre otras (Junqueira y Barros, 2004; Sampayo et al., 2003; Goulielmos et al., 2003; Putnam et al., 2000; Halliwell, 1991); así como compuestos de naturaleza no enzimática como la vitamina E, el ácido ascórbico, el α -tocoferol, el glutatión y los pigmentos carotenoides entre otros compuestos de baja masa molecular (Halliwell, 1992; Junqueira y Barros, 2004). Estos últimos son introducidos en el organismo a través de la alimentación y en conjunto con las enzimas antioxidantes desempeñan funciones esenciales en la eliminación intra y extracelular de las ERO (Halliwell y Gutteridge, 1999). Sin embargo, el tratamiento terapéutico a base de estos compuestos no proteicos de las enfermedades asociadas a las ERO, ha estado limitado porque no son lo suficientemente efectivos para combatir daños oxidativos crónicos (Greenwald, 1990; Christofidou-Solomidou y Muzykantov, 2006) y son consumidos cuantitativamente e irreversiblemente por las ERO (Veronese et al., 2002).

II.2. ERO vs enzimas antioxidantes

Las ERO constituyen átomos o pequeñas moléculas que presentan un electrón no apareado en su último nivel atómico (Valéry et al., 2007), característica que las proveen de una elevada reactividad frente a sustratos orgánicos y son consideradas, cuando las

concentraciones de éstas sobrepasan las defensas antioxidantes del organismo, como tóxicas y perturbadoras del metabolismo celular.

Entre las principales vía de generación de las ERO se encuentra las fuentes endógenas como la cadena transportadora de electrones mitocondrial (Carletti y Cantiello, 2007; Arora et al., 2002), los microsomas, el retículo endoplasmático, el núcleo (Carletti y Cantiello, 2007), y la actividad catalítica de enzimas como la NADPH oxidasa, la mieloperoxidasa, la óxido nítrico sintetasa y la xantina oxidasa (Valéry et al., 2007). La otra fuente de producción de ERO es la exógena, entre las que se encuentran las radiaciones ionizantes y ultravioletas (Carletti y Cantiello, 2007).

Dentro del grupo numeroso que conforman las ERO se encuentra el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) que aunque no es considerado un agente oxidante fuerte, pudiendo incluso actuar como agente reductor, puede producir otra radical más potente como el hidroxilo (OH^{\cdot}), cuando iones libre de hierro o cobre reaccionan con el $O_2^{\cdot-}$ vía reacción de Fenton (Rodríguez y Céspedes, 1999; Veronese et al., 2002; Macias et al., 2007; León et al., 2005). Además, también puede combinarse con el óxido nítrico (NO) para generar el radical peroxinitrilo (Valéry et al., 2007; Beckman, 1996), fenómeno que trae consigo un doble efecto nocivo, debido a la acción destructiva del nuevo radical formado y a la disminución de la biodisponibilidad del NO, lo que puede provocar vasoconstricción, la adhesión de neutrófilos al endotelio y la agregación de plaquetas (Vepa et al., 1999) con el consecuente incremento de la probabilidad de formación de trombos (Nguyen et al., 1999).

En particular el $O_2^{\cdot-}$ posee un efecto dañino sobre células endoteliales, incrementando la permeabilidad de los microcapilares y acelerando la migración de neutrófilos a sitios de inflamación (Valéry et al., 2007).

Otros radicales libres del oxígeno de interés biológico son el radical peroxilo (ROO^{\cdot}) y el hidroxilo (OH^{\cdot}), capaces de reaccionar con numerosos tipos de biomoléculas como el ADN (Wiseman y Halliwell, 1996; Furukawa y O'halloran, 2006), proteínas (Davies, 1987; Stadtman, 1986) y lípidos de membrana (Bruckdorfer, 1998). A nivel de ADN se ha observado que los componentes fundamentales de su estructura (bases nitrogenadas y el azúcar desoxirribosa) son susceptibles a procesos de oxidación que provocan su degradación, con la consecuente fragmentación de las cadenas simples y su entrecruzamiento con proteínas (Imlay y Linn, 1986), fenómeno que ha estado asociado a deleciones y otros efectos genéticos letales. En las proteínas, estas ERO provocan modificaciones sitio específicas en aminoácidos, que conllevan a la desnaturalización de las mismas, incrementando su susceptibilidad a la degradación proteolítica y a la formación de productos a partir del entrecruzamiento de los residuos modificados y cambios en las cargas eléctricas de las proteínas (Vicedo y Vicedo, 2000). El ataque del OH^{\cdot} a lípidos de membrana provoca la formación de nuevos radicales orgánicos en una reacción en cadena más dañina que cualquier otra catalizada por las ERO, fenómeno conocido como peroxidación lipídica (Arora et al., 2002).

El H_2O_2 ha sido otro compuesto de gran interés biológico. Aunque no es considerado un radical libre por su estabilidad (Kashif et al., 2006) y ausencia de un electrón no apareado (Lee et al., 2006), presenta también propiedades oxidativas. Este compuesto puede difundir entre las membranas biológicas y reaccionar en presencia de iones metálicos como el Fe^{2+} para generar el radical OH^\cdot vía reacción de Fenton (Halliwell, 1991; Vogiatzi et al., 2009).

Por otra parte, numerosos estudios han evidenciado la función del H_2O_2 como mensajero químico, donde las concentraciones de este compuesto tienen un efecto determinante en la respuesta celular (Chen et al., 2009), variando desde la estimulación de la proliferación celular, el arresto del ciclo celular, hasta la apoptosis y necrosis (Giorgio et al., 2007; Kowaltowski et al., 2000; Saito et al., 2006; Finkel, 2000; Hirpara et al., 2001; Ahmad et al., 2004).

Las ERO han estado asociadas a un gran número de procesos patológicos, en los cuales se ha observado la presencia de concentraciones elevadas de las mismas, aunque sin poder discernir, si dichos incrementos son causa o efecto de la patología. Así, enfermedades neurodegenerativas como las de Alzheimer y Parkinson (Reiter, 1995; Simonian y Coyle, 1996), procesos inflamatorios (Salin y McCord, 1975; Babior et al., 1973; Halliwell y Gutteridge, 1990; Lee y Lim, 2007), daños por isquemia/reperfusión (McCord, 1985), diabetes (Maritim et al., 2003; Jay et al., 2006), cáncer (Cerutti, 1991; Church et al., 1993), daños causados por agentes físicos como las radiaciones ionizantes (Borrelli et al., 2008; Epperly et al., 2003), entre otras, constituyen patologías asociadas al estrés oxidativo.

Estos hechos sustentan el empleo de las enzimas antioxidantes en el tratamiento de dichas enfermedades, por su participación directa en la regulación de las concentraciones de las ERO en el organismo humano, catalizando la transformación de éstas en compuestos de baja o ninguna reactividad.

Entre las enzimas antioxidantes, la Superóxido dismutasa (SOD) y la catalasa constituyen blancos promisorios para su aplicación terapéutica en patología mediadas por las ERO, debido su la capacidad de eliminar un número ilimitado de las mismas (Atalla et al., 1985; Chiu y Toledo-Pereyra, 1987; Flye y Yu, 1987; Lambotte et al., 1988; Romani et al., 1988; Castillo et al., 1990; Cho et al., 1990; Muzykantov, V.R. 2001; Gao et al., 2003). La SOD ha tenido la mayor atención de los investigadores debido a su disponibilidad a partir de diferentes fuentes, una elevada sensibilidad en ensayos de actividad enzimática, rápida eliminación de la circulación sanguínea que permite detectar pequeños cambios en el perfil farmacocinético de esta enzima, la existencia de diferentes modelos experimentales de inflamación y un número elevado de patologías asociadas a la producción anormal del radical superóxido (Veronese et al., 2002).

Las SODs constituyen una familia de isoformas (Cu,Zn-SOD, Mn-SOD y Fe-SOD), esta última presente principalmente en procariontes (Céspedes y Ela, 1996). En células de mamíferos, además de las dos primeras isoformas presentes en citoplasma y núcleo (Cu,Zn-SOD) (Crapo et al., 1992) y mitocondria (Mn-SOD) (Pascale et al., 2005), se presenta otra encontrada primariamente en espacios extracelulares, con la presencia de cobre y zinc en el sitio catalítico (Marklund, 1982). Esta oxidoreductasa se diferencia de la Cu,Zn-SOD clásica por sus características inmunológicas (Fridovich, 1997). Todas las isoformas han

sido objeto de estudio como fármacos terapéuticos en la protección de sistemas de órganos contra el estrés oxidativo (McCord, 1986; Muzykantov, V.R. 2001; Gao et al., 2003; Bowler et al., 2004), ya que catalizan la dismutación del anión $O_2^{\cdot -}$ a H_2O_2 y H_2O (Fridovich, 1997; Michiels et al., 1994 y Fridovich, 1995; McCord, 2002). Entre todas, la Cu,Zn-SOD citosólica ha sido la más extensamente empleada con este propósito, la cual constituye un homodímero de 32 kDa, con un átomo de cobre y otro de zinc en cada subunidad, donde el cobre desempeña una función esencial durante la catálisis enzimática (Kinnula y Crapo, 2003; Venereo, J.R. 2002).

La catalasa (CAT) ha encontrada en casi todos los organismos de respiración aerobia (Gonçalves et al., 1999) cuya función principal es la de catalizar la transformación del H_2O_2 en H_2O y O_2 molecular (Mueller et al., 1997; Vasudevan y Weiland, 1992; Pascale et al., 2005). La catalasa de hígado bovino fue una de las primeras enzimas intracelulares cristalizadas (Sumner y Dounce, 1937), lo que permitió su estudio estructural detallado. Posteriormente esta enzima fue purificada de distintas fuentes como: eritrocitos, hígado y riñón de ganado vacuno, caballo y humano por diferentes métodos (Gonçalves et al., 1999).

Existen tres familias de catalasas, (1): la Mn-CAT, que utiliza manganeso como cofactor en el centro activo (Barynin et al., 2001) y presenta un peso molecular entre 170 y 210 kDa. Ha sido identificada en diferentes grupos de organismos como bacterias, plantas, hongos y animales (Ken et al., 2008). (2): Las catalasas bifuncionales que presentan tanto actividad catalasa como peroxidasa, con masa moleculares que varían entre 120-140 kDa, las cuales han sido encontradas mayoritariamente en hongos (Fraaije et al., 1996) y en general, constituyen homodímeros con grupos hemo en su estructura proteica (Obinger et al., 1997; Nagy et al., 1997). (3): La típica catalasa monofuncional, formando homotetrámeros con masa moleculares entre 200 y 400 kDa y la presencia de cuatro grupos hemo prostéticos (Hirasawa et al., 1989; Sheptovitsky y Brudvig, 1996).

La catalasa de mamíferos y algunos hongos y bacterias presentan además cuatro moléculas de NADPH unidas fuertemente, cuya función ha sido controversial (Kirkman y Gaetanit, 1984, Kirkman et al., 1999).

La catalasa no sólo representa un componente esencial dentro del sistema protector antioxidante de los organismos, por su función en la degradación del peróxido de hidrógeno y pequeños compuestos orgánicos de peróxidos, sino que además protege a otras enzimas principalmente las SODs (Amstad et al., 1991; Michiels et al., 1994), contra la inactivación frente a elevadas concentraciones de H_2O_2 (Fridovich, 1995).

II.3. La catalasa y la SOD como potenciales drogas para el tratamiento de enfermedades asociadas a las ERO

Las potencialidades terapéuticas de las enzimas catalasa y Superóxido dismutasa ha sido evaluada por numerosos trabajos en modelos *in vitro* e *in vivo*. Varias de estas investigaciones se resumen a continuación:

- La aplicación sistémica de catalasa en un modelo de ratas con inflamación intestinal inducida con indometacina, provocó una reducción de la hiperemia y la velocidad de flujo sanguíneo en las microvellosidades intestinales por cambios en el diámetro de la arteriola principal (Ruh et al., 2000). Este estudio evidencia además el papel del peróxido de hidrógeno como efector de la hiperemia en la mucosa intestinal.
- Una mutación en el gen que codifica para la catalasa reduce la actividad catalítica de esta enzima en eritrocitos humanos a menos de un 10 % en comparación con la actividad enzimática en eritrocitos normales. Esto provoca la elevación del H₂O₂ en estas células y la aparición de trastornos fisiológicos identificados como la enfermedad autosómica recesiva acatalasemia (Góth et al., 2000).
- Estudios realizados por Wang y Walsh (1996) sugieren que una deficiencia en el sistema enzimático antioxidante puede desempeñar un papel importante en desórdenes prenatales humanos. Estos investigadores reportaron bajos niveles de actividad enzimática y ácido ribonucleico mensajero de la SOD y la Glutatión peroxidasa (GPx) en tejidos de placenta preeclámpticas humanas, en comparación con placentas normales lo que ha estado relacionado con el aumento de la peroxidación lipídica y tromboxanos (Walsh y Wang, 1993).
- El aumento de H₂O₂ por inhibición de la catalasa provocó un incremento de la toxicidad en el Sistema Nervioso Central (SNC) de ratas (Buckman et al., 1993; Zhang y Piantadosi, 1991); mientras que la aplicación exógena de catalasa (solamente) o en combinación con SOD protegió de isquemias inducidas por daños cerebrales en áreas específicas como corteza, hipocampo, tálamo y el núcleo geniculado medial (Truelove et al., 1994 a y b; Liu et al., 1989; Matsuyama et al., 1994). El SNC en particular requiere de una estricta integridad de membrana, sin embargo, es muy susceptible a la peroxidación lipídica por el ataque de las ERO (Braugher y Hall, 1989; Demopoulos et al., 1979), y además presenta bajos niveles de enzimas antioxidantes endógenas (Demopoulos et al., 1979; Cohen et al., 1996), por lo que la aplicación exógena de las enzimas antioxidante constituye una vía promisoría en el tratamiento de enfermedades nerviosas.
- La aplicación tópica de catalasa en tejidos dañados de pulpa dental de perros, mostró un saneamiento más rápido en un periodo de tres meses en los grupos tratados con la enzima en comparación con el control (Alaçama et al., 2000).
- La sobreexpresión de la SOD y la catalasa ha sido considerada como una estrategia eficiente para prevenir o disminuir la toxicidad mediada por citoquinas proinflamatorias, las cuales inducen la generación continuada de ERO que provocan daños no selectivos a proteínas y ADN en las células β pancreáticas productoras de insulina (Hohmeier et al., 1998; Lortz et al., 2000; Lortz y Tiedge, 2003), que conllevan a la muerte celular por necrosis y apoptosis (Lortz et al., 2000).
- Varios autores han reportado el efecto beneficioso de la SOD y la catalasa en la prevención del daño por reperfusión en el tejido muscular esquelético (Zimmerman,

1991; Korthuis et al., 1985; Erikson et al., 1987; Feller et al., 1989; Walker et al., 1987).

- La sobreexpresión de catalasa y SOD en células de mamíferos mostró un efecto protector contra la muerte inducida por calor (Li y Oberley, 1997; Davidson et al., 1996; Wong et al., 1991).
- La administración por vía intravenosa de neoglicoconjugados a base de Cu,Zn-SOD, mostró una disminución significativa del edema inducido con carragenina en patas de ratas (Valdivia et al., 2006 a y b; Pérez et al., 2005; Valdivia et al., 2005).
- La administración de SOD (Woodward y Zakaria, 1985; Bernier et al., 1986), SOD modificada con polietilenglicol (Garcia-Alves et al., 1989) y catalasa (Veronese et al., 2002), ha reportado una reducción en la incidencia de la arritmia inducida por reperfusión en ratas. En estudios de daños por reperfusión con presencia de catalasa, no existieron evidencias del aumento abrupto en la producción de ERO durante la reperfusión (Veronese et al., 2002), las cuales inician una reacción en cadena de radicales que provocan daños a las membranas biológicas y alteran el estado redox de los canales iónico y proteínas transportadoras (Edsmyr et al., 1976). Esto conlleva a un imbalance iónico en el tejido dañado (Tetsuo et al., 1966) y finalmente a la arritmia ventricular (Veronese et al., 2002).
- El empleo de SOD exógena en modelos animales de isquemia por calor y frío redujo el daño por hipoxia (Hoshino et al., 1988; Heberer et al., 1991).

Debido a la función enzimática que realizan la SOD y la catalasa, varios trabajos realizados apuntan hacia el desarrollo de formulaciones biomédicas que incluyan ambas enzimas para el tratamiento de enfermedades asociadas al estrés oxidativo (D'Agnillo y Chang, 1993; D'Agnillo y Chang, 1998; Valdivia et al., 2007).

II.4. Limitaciones de las enzimas con fines terapéuticos

A pesar de las perspectivas terapéuticas que ofrecen las enzimas antioxidantes como la SOD y la catalasa, su aplicación médica ha estado limitada por su rápida eliminación del torrente sanguíneo luego de su administración por vía endovenosa (Pyatak et al., 1980; Turrens et al., 1984), lo cual se debe a la combinación de varios eventos como la degradación proteolítica, la ultrafiltración renal (Vorauer et al., 2001) y la eliminación por el hígado y el sistema inmunológico (Caliceti y Veronese, 2003). Otra de las limitaciones ha estado relacionada con la carencia de un blanco en las células dañadas por el estrés oxidativo (Greenwald, 1990; Muzykantov, 2001; Christofidou-Solomidou y Muzykantov, 2006); así como la interacción y acumulación de estos compuestos dentro de los tejidos (Kompella y Lee, 1991).

II.4.1. Vías fundamentales de eliminación de los fármacos proteicos del cuerpo humano

De manera general, las proteínas que son administradas vía intravenosa son primariamente eliminadas del cuerpo a través de la filtración glomerular. Otras vías importantes de

eliminación y/o inactivación son: la fagocitosis por el sistema del retículo endotelial, la degradación proteolítica en sangre y otros tejidos (Veronese et al., 2002) y el reconocimiento e inactivación de las mismas por el sistema inmunológico.

II.4.1.1. Ultrafiltración glomerular

La ultrafiltración glomerular en el riñón es una de las principales rutas de eliminación de la sangre de proteínas y enzimas (Rabkin y Dahl, 1993; Harris, et al., 2000; Delgado, et al., 1992; Kartre, 1993) con pesos moleculares inferiores a 60 kDa (Mark et al., 2002). Entre los parámetros que afectan a este proceso, se encuentran la composición química, tamaño y carga de las moléculas que circulan en sangre y por otra parte, las propiedades morfológicas y funcionales de este órgano (Brenner, et al., 1978; Deen et al., 1979).

En los riñones la selectividad glomerular está restringida a una doble barrera constituida por una membrana basal (primera barrera que actúa como un filtro) y un diafragma epitelial, que funciona a una mayor distancia en la pared de los capilares creando una barrera física. Sin embargo, la pared de capilares glomerulares no puede ser considerada simplemente como un filtro poroso capaz de seleccionar o discriminar solamente por el tamaño del compuesto. Estudios realizados con polímeros cargados y proteínas con diferentes pesos moleculares y puntos isoelectricos, han demostrado que la funcionalidad de la barrera puede involucrar diferentes aspectos de la pared capilar (Caliceti y Veronese, 2003).

Elementos proximales ricos en sialoproteínas presentes en el epitelio y la lámina interna de la membrana basal glomerular, operan principalmente retardando la filtración de las moléculas glicopolianiónicas circulantes, incluyendo la albúmina, mientras que elementos más distales tales como la lámina externa de la membrana basal glomerular y el diafragma, retardan la clarancia de las macromoléculas catiónicas circulantes. El epitelio no glomerular también presenta cargas negativas que retardan la filtración de moléculas polianiónicas (Kompella y Lee, 1991; Rabkin y Dahl, 1993; Deen et al., 1979).

II.4.1.2. Eliminación por el sistema inmunológico

El sistema inmunológico constituye una barrera importante que limita la aplicación terapéutica de las drogas proteicas (Kartre, 1990). De manera general, cuando proteínas como la catalasa entran al torrente sanguíneo se desarrolla una respuesta humoral, donde los linfocitos B reconocen estas macromoléculas y son activados con la participación de linfocitos T que tienen como especificidad la de activar a los linfocitos B. Esta respuesta antígeno-anticuerpo es nombrada T-dependiente, la cual se diferencia de la respuesta inmunológica de otros antígenos como lípidos y polisacáridos por la no participación de dichos linfocitos T (respuesta T-independiente).

La cantidad de anticuerpos producidos posterior al primer encuentro antígeno-linfocito B (respuesta primaria) es inferior a las cantidades producidas luego de repetidas inmunizaciones (respuesta secundaria), debido a que se estimula la producción de linfocitos T activadores de los linfocitos B. Esto constituye sin dudas una limitante importante para el empleo de enzimas antioxidantes como la catalasa y la SOD para el tratamiento clínico de enfermedades asociadas a las ERO. Por ejemplo, se ha demostrado que la catalasa

desencadena una inmunológica extensa entre diferentes especies (Saha et al., 1964; Higashi et al., 1966). Por otra parte, esta enzima se encuentra incluida dentro del grupo de antígenos que genera anticuerpos (autoanticuerpos) contra la catalasa propia del organismo humano. Este fenómeno ha sido reportado en pacientes con la enfermedad inflamatoria intestinal (Roozendaal et al., 1998) y en ratas de laboratorio (Miura et al., 2000; Gershwin et al., 1987).

II.4.1.3. Eliminación de las proteínas por el hígado

Numerosas proteínas son secuestradas activamente en el hígado mediado por receptores o mecanismos pasivos e internalizadas por las células de Buffer, los hepatocitos y las células endoteliales del tejido hepático. Las macromoléculas cargadas negativamente y/o glicosiladas pueden interactuar con estas células (Caliceti y Veronese, 2003) facilitando la internalización de las mismas. Los hepatocitos presentan receptores para las formas glicosiladas y no glicosiladas de compuestos proteicos tales como la proteína transferrina, hormonas y lipoproteínas de baja densidad, mientras que las células endoteliales internalizan más eficientemente las proteínas cargadas negativamente.

Una vía de secuestro y reciclaje común a todas las células es el proceso denominado picnóctosis, donde no se requiere ningún receptor específico de membrana. Posterior a la internalización, las proteínas son procesadas y convertidas en productos que pueden ser reciclados, acumulados o excretados por exocitosis en la bilis (Caliceti y Veronese, 2003).

III. Conclusiones

Las enzimas antioxidantes Superóxido dismutasa y catalasa constituyen blancos terapéuticos importantes para el tratamiento de numerosas enfermedades asociadas al estrés oxidativo. Su interés biomédico radica en la función catalítica que realizan las mismas que detoxifican el cuerpo humano de las nocivas especies reactivas del oxígeno que son exacerbadas en diferentes condiciones patológicas. Las limitaciones clínicas que presentan estas enzimas son también comunes a otros compuestos proteicos, entre las principales vías de eliminación la filtración glomerular reduce de manera significativa, las concentraciones en sangre una vez administradas por vía endovenosa. Entre las principales estrategias que han sido desarrolladas y continúan en explotación para reducir tales limitaciones, la modificación covalente de la superficie proteica con diferentes tipos de polímeros y su encapsulación en liposomas, han evidenciado la posibilidad de mejorar significativamente las propiedades farmacológicas de estas enzimas, lo que constituye un paso importante para su aplicación en la salud humana.

Bibliografía

- Ahmad, K.A.; Iskandar, K.; Clement, M.V., 2004. Hydrogen peroxide mediated cytosolic acidification is a signal for mitochondrial translocation of Bax during drug induced apoptosis, *Cancer Res*, (64), p. 7867 – 7878.
- Alaçama, A.; Tulunoglua, Ö.; Oygür, T.; Bilicia, S., 2000. Effects of topical Catalase application on dental pulp tissue: a histopathological evaluation, *Journal of Dentistry* (28), p. 333–339.
- Amstad, P.; Peskin, A.; Shah, G.; Mirault, M.E.; Moret, R.; Zbinden, I.; Cerutti, P., 1991. *Biochemistry*, 30, p. 9305-9313.
- Arora, A.; Sairam, R.K.; Srisvastava, G.C., 2002. Oxidative stress and antioxidative system in plants. Review article. *Current Science*, 82, p. 1227-1238.
- Atalla, S.L.; Toledo-Pereyra, L.H.; MacKenzie, G.H.; Cederna, J.P., 1985. Influence of oxygen-derived free radical scavengers on ischemic livers. *Transplantation* 40, p. 584–590.
- Babior, B.M.; Kipnes, R.S.; Curnutte, J.T., 1973. Biological defense mechanisms. The production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent, *J Clin Invest.* 52, p. 741–774.
- Barynin, V.V.; Whittaker, M.M.; Antonyuk, S.V.; Lamzin, V.S.; Harrison, P.M.; Artymiuk, P.J.; J.W. Whittaker., 2001. Crystal structure of manganese catalase from *Lactobacillus plantarum*. *Structure* (9), p. 725-738.
- Beckman, J.S., 1996. Oxidative damage and tyrosine nitration from peroxynitrite. *Chem. Res. Toxicol.* 9:836–844.
- Bernier, M.; Hearse, D.J.; Manning, A.S., 1986. Manning, Reperfusion-induced arrhythmias and oxygen-derived free radicals: studies with 'anti-free radical' interventions and a free radical-generating system in the isolated perfused rat heart. *Cir. Res*, 58, p. 331.
- Borrelli, A.; Schiattarella, A.; Mancini, R.; Morrica, B.; Cerciello, V.; Mormile, M.; d'Alesio, V.; Bottalico, L.; Morelli, F.; D'Armiento, M.; D'Armiento, F.P; Mancini, A., 2009. A recombinant MnSOD is radioprotective for normal cells and radiosensitizing for tumor cells. *Free Radical Biology and Medicine*. Volumen 46 (1), p. 110-116.
- Bowler, R.P.; Nicks, M.; Tran, K.; Tanner, G.; Chang, L-Y.; Young, S.K.; Worthen, G.S., 2004. Extracellular Superoxide Dismutase Attenuates Lipopolysaccharide-Induced Neutrophilic Inflammation, *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. Vol. 31, p. 432-439.
- Braugher, J.M.; Hall, E.D., 1989. Central nervous system trauma and stroke. *Free Rad. Biol. Med.* 6, p. 289-301.

- Brena, B.M.; Pazos, C.; Franco-Fraguas, L.; Batista-Viera, F., 1996. Chromatographic methods for amylases. *J. Chromatogr. B* 684, p. 217–237.
- Brenner, B.M.; Hostetter, T.H.; Humes, H.D., 1978. Glomerular permselectivity: barrier function based on discrimination of molecular size and charge, *Am. J. physiol.* 234: F455-F460.
- Bruckdorfer, K.R., 1998. Lipid oxidation products and vascular function. *Free Radic Res*, 28, p. 573-581.
- Buckman, T.D.; Sutphin, M.S; Mitrovic, M., 1993. Oxidative stress in a clonal cell line of neuronal origin: effect of antioxidant enzyme modulation. *J. Neurochem.* 60, p. 2046-2058.
- Bush, A.I., 2003. The Metallobiology of Alzheimer's Disease, *Trends Neurosci.*, 26: 207–214.
- Caliceti, P.; Veronese, F.M., 2003. Pharmacokinetic and biodistribution properties of poly(ethylene glycol)–protein conjugates. *Advanced Drug Delivery Reviews* 55, p. 1261–1277.
- Carletti, M.; Cantiello, M., 2007. Serum antioxidant enzyme activities and oxidative stress parameters as possible biomarkers of exposure in veal calves illegally treated with dexamethasone. *Toxicology in Vitro.*, 21 p. 277-283.
- Castillo, M., Toledo-Pereyra, L.H., Shapiro, E., Guerra, E., Prough, D.; Frantzis, P., 1990. Protective effect of allopurinol, catalase, or superoxide dismutase in ischemic rat liver. *Transplant Proc*, 22, p. 490–491.
- Cerutti, P.A., 1991. Oxidant stress and carcinogenesis. *Eur J Clin Invest* 21, p.1–5.
- Céspedes, M.; Ela, M., 1996. Enzimas que participan como barreras fisiológicas para eliminar radicales libres. *Rev Cubana Inv Biomed*, (15), p.75-78.
- Chen, Ce-Belle.; Jowin, K.W.; Poh-Heok, N.G.; Choo, W.W.; Porter, A.G., 2009. Mammalian sterile 20-like kinase 3 (MST3) mediates oxidative-stress-induced cell death by modulating JNK activation. *Biosci. Rep*, 29, p. 405–415.
- Chiu, C.; Toledo-Pereyra, L.H., 1987. Effect of catalase and/or allopurinol, or *N*-t-butyl-alpha-phenylnitron on hepatic ischemia. *Transplant Proc* 19, p.1077–1079.
- Cho, W.H.; Kim, D.G.; Murase, N.; Mischinger, H.J.; Todo, S.; Starzl, T.E., 1990. Comparison of superoxide dismutase, allopurinol, coenzyme Q10 and glutathione for the prevention of warm ischemic injury, *Transplantation*, 50, p. 353–355.
- Christofidou-Solomidou, M.; Scherpereel, A.; Wiewrodt, R.; Sweitzer, T.; Arguiri, E.; Shuvaev, V.; Solomides, C.C.; Albelda, S.M.; Muzykantov, V.R., 2003.

- PECAMdirected delivery of catalase to endothelium protects against pulmonary vascular oxidative stress, *Am J Physiol*, 285, p. 283–292.
- Church, S.L.; Grant, J.W.; Ridnour, L.A.; Oberley, L.W.; Swanson, P.E.; Meltzer, P.S., 1993. Increased manganese superoxide dismutase expression suppresses the malignant phenotype of human melanoma cells, *Proc Natl Acad Sci USA*, 90, p. 3113–7.
- Cohen, G.; Kim, M.; Ogwu, V., 1996. A modified catalase assay suitable for a plate reader and for the análisis of brain cell cultures, *Journal of Neuroscience Methods*, 67, p. 53–56.
- Crapo, J.D.; Oury, T.C.; Rabouille, J.W.; Chang, L.Y., 1992. Copper,zinc superoxide dismutase is primarily a cytosolic protein in human cells. *Proc. Natl. Acad. Sci, USA* 89, p. 10405–10409.
- D'Agnillo, F.; Chang, T.M.S., 1998. Polyhemoglobin-superoxide dismutase-catalase as a blood substitute with antioxidant properties. *Nature Biotechnology* 16, 667 – 671.
- D'Agnillo, F. and Chang, T.M.S., 1993. Crosslinked hemoglobin-superoxide dismutase-catalase scavenges oxygen-derived free radicals and prevents methemoglobin formation and iron release. *Biomaterials, Artificial Cells, and Artificial Organs* 21, p. 609–621.
- Davidson, J.F.; Whyte, B.; Bissinger, P.H.; Schiestl, R.H., 1996. Oxidative stress is involved in heat-induced cell death in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:5116–5121.
- Davies, K.J., 1987. Protein damage and degradation by oxygen radicals. I. general aspects. *J Biol Chem*; 262, p. 9895-901.
- Deen, W.M.; Bohrer, M.P.; Brenner, B.M., 1979. Macromolecule transport across glomerular capillaries: application of pore theory, *Kidney Int.* 16, p. 353-365.
- Delgado, C.; Francis, G.E.; Fisher, D., 1992. The uses and properties of PEG-linked proteins, *Crit. Rec. Ther. Drug Carrier Syst.* 9, p. 249-304.
- Demopoulos, H.B.; Flamm, E.S; Seligman, L., 1979. Membrane perturbation in central nervous system injury: theoretical basis for free radical damage and a review of the experimental data, In *neural Trauma* (ed. Popp A.J. et al.), p. 63-78.
- Edsmyr, F.; Huber, W.; Nenander-Huber, K.B., 1976. Orgotein efficacy in ameliorating side effects due to radiation therapy: double-blind, placebo-controlled trial in patients with bladder tumors, *Curr. Ther. Res.* 19, p. 198-211.
- Eichler, J., 2001. Biotechnological uses of archaeal extremozymes. *Biotechnol Adv.* 19, p. 261–78.

- Epperly, M.W.; Gretton, J.E.; Sikora, C.A.; Jefferson, M.; Bernarding, M.; Nie, S.; Greenberger, J.S., 2003. Mitochondrial localization of superoxide dismutase is required for decreasing radiation cellular damage, *Radiat. Res.* 160, p. 568–578.
- Erikson, E.; Replogle, R. L.; Glagov, S., 1987. Reperfusion of skeletal muscle after warm ischemia. *Ann. Plast. Surg.* 18, P. 224.
- Feller, A.M.; Roth, A.C.; Russell, R.C.; Eagleton, B.; Suchy, H.; Debs, N., 1989. Experimental evaluation of oxygen free radical scavengers in the prevention of reperfusion injury to skeletal muscle, *Ann. Plast. Surg.* 22, P.321.
- Finkel, T., 2000. Redox-dependent signal transduction, *FEBS Lett.* 476, p. 52–54.
- Flye, M.W.; Yu, S., 1987. The synergistic effect of superoxide dismutase and adenosine triphosphate-MgCl₂ on acute hepatic ischemia. *Transplant Proc* 19, p. 1324–1326.
- Fraaije, M.W.; Roubroeks, H.P.; Hagen, W.R.; Van Berkel, W.J., 1996. Purification and characterization of an intracellular catalase-peroxidase from *Penicillium simplicissimum*. *Eur. J. Biochem.* 235, p. 192-198.
- Fridovich, I., 1995. Superoxide radical and superoxide dismutases, *Annu Rev Biochem* 64, p. 97–112.
- Fridovich, I., 1997. Superoxide anion radical (O^{-•2}), superoxide dismutases, and related matters, *J Biol Chem* 272, p. 18515–18517.
- Furukawa, Y.; O'halloran, T.V., 2006. Posttranslational Modifications in Cu,Zn-Superoxide Dismutase and Mutations Associated with Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Antioxid Redox Signal.* 8 (5-6), p. 847–867.
- Gao, B.; Flores, S.C.; Leff, J.A.; Bose, S.K.; McCord, J.M., 2003. Synthesis and anti-inflammatory activity of a chimeric recombinant superoxide dismutase: SOD2/3. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 284:, p. 917–925.
- Garcia-Alves, M.; Kadowaki, Y.; Iwashita, Y.; Nishi, K., 1989. Pretreatment with a single bolus injection of polyoxy-ethylene-modified superoxide dismutase prevents reperfusion induced arrhythmias in the anesthetized rat, *Jpn. J. Pharmacol*, 51, p. 199-209.
- Gershwin, M.E.; Coppel, R.L.; Bearer, E.; Peterson, M.G.; Sturgess, A.; Mackay, I.R., 1987. Molecular cloning of the liver-specific rat F antigen. *J. Immunol.* 139, p. 3828–3833.
- Giorgio, M.; Trinei, M.; Migliaccio, E.; Pelicci, P.G., 2007. Hydrogen peroxide: a metabolic by-product or a common mediator of ageing signals? *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, p. 722–728.

- Gonçalves, V.M.; Leite, L.C.; Raw, I.; Cabrera-Crespo, J., 1999. Purification of catalase from human placenta. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 29, p. 73–77.
- Góth, L.; Shemirani, A.; Kalmár, T., 2000. A Novel Catalase Mutation (a GA Insertion) Causes the Hungarian Type of Acatalasemia. *Blood Cells, Molecules, and Diseases* 26 (2), p.151–154.
- Goulielmos, G.N.; Arhontaki, K.; Eliopoulos, E.; Tserpistali, K.; Tsakas, S.; Loukas, M., 2003. Drosophila Cu, Zn superoxide dismutase gene confers resistance to paraquat in *Escherichia coli*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 308, p. 433–438.
- Greenwald, R.A., 1990. Superoxide dismutase and catalase as therapeutic agents for human diseases: a critical review. *Free Radic Biol Med*, 8, p. 201–209.
- Halliwell, B.; Gutteridge, J.M.C., 1990. Role of free radicals and catalytic metal ions in human diseases: An overview. *Methods Enzymol*, 186, p.1–85.
- Halliwell, B., 1991. Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease. *Am J Med*; 91, p. 14-22.
- Halliwell, B., 1992. Reactive oxygen species and the central nervous system, *J. Neurochem.* 59, p. 1609–1623.
- Halliwell, B.; Gutteridge, J.M.C., 1999. *Free Radicals in Biology and Medicine*, 3rd Edition, Oxford University Press, Oxford.
- Harris, J.M.; Martin, N.E.; Modi, M., 2000. Pegylation: a novel process for modifying pharmacokinetics, *Clin. Pharmacokinet.* 40, p. 539-551.
- Heberer, M.; Jorgensen, J.; Mihatsch, M.J.; Marx, A.; Landmann, J., 1991. Protective effect of allopurinol and superoxide dismutase in renal isografts in cyclosporin A-treated rats, *Ren. Fail.* 13, p. 233-242.
- Henricks, P.A., Nijkamp, F.P. 2001. Reactive oxygen species as mediators in asthma. *Pulm Pharmacol Ther.* 14: 409–420.
- Higashi, T.; Shibata, Y.; Yagi, M.; Hirai, H., 1966. Purification and properties of rat erythrocyte catalase; comparison with rat liver catalase. *J. Biochem.* 59, p. 115–121.
- Hirasawa, M.; Gray, K.A.; Ondrias, M.R.; Larsen, R.W.; Shaw, R.W.; Jr Morrow, K.J.; Knaff, D.B., 1989. Prosthetic group content and ligand binding properties of a spinach catalase. *Biochim. Biophys. Acta* 994, p. 229-234.
- Hirpara, J.L.; Clement, M.V.; Pervaiz, S., 2001. Intracellular acidification triggered by mitochondrial-derived hydrogen peroxide is an effector mechanism for drug-induced apoptosis in tumor cells. *J Biol Chem.* 276, p. 514 – 21.

- Hohmeier, H.E.; Thigpen, A.; Tran, V.V.; Davis, R.; Newgard, C.B., 1998. Stable expression of manganese superoxide dismutase (Mn-SOD) in insulinoma cells prevents IL-1-induced cytotoxicity and reduces nitric oxide production. *J. Clin. Invest.* 101, p.1811–1820.
- Hoshino, T.; Maley, W.R.; Bulkley, G.B.; William, G.M., 1988. Ablation of free-radical mediated reperfusion injury for the salvage of kidney taken from non-heartbeating donors, *Transplantation* 45, p. 284-289.
- Imlay, J.A.; Linn, S., 1986. DNA damage and oxygen radical toxicity. *Science* 240, p.1302-1309.
- Jay, D.; Hitomi, H.; Griendling, K.K., 2006. Oxidative stress and diabetic cardiovascular complications. *Free Radic Biol Med.* 40, p.183-92.
- Junqueira, V.B.C.; Barros, S.B.M., 2004. Ageing and oxidative stress. *Molecular aspects of Medicine*, 25, p. 5-16.
- Karter, K., 1993. The conjugation of proteins with poly(ethyleneglycol) and other polymers, *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 10, p. 91-114.
- Kartre, N.V., 1990. Immunogenicity of recombinant IL-2 modified by covalent attachment of polyethylene glycol, *J. Immunol.* 144, p. 209-213.
- Kashif, A.; Guixia, A.W.; Ahmed, K., 2006. Intracellular Hydrogen Peroxide Production Is an Upstream Event in Apoptosis Induced by Down-Regulation of Casein Kinase 2 in Prostate Cancer Cells., *Mol Cancer Res.*4 (5), p. 331-338.
- Kazan, D.; Erarslan, A., 1997. Stabilisation of *Escherichia coli* penicillin G acylase by polyethylene glycol against thermal inactivation. *Appl Biochem Biotechnol.* 62, p.1–13.
- Ken, Chui-an-Fu.; Chen, Hsueh-Tai.; Chang, Reny-Chang; Lin, Chi-Tsai., 2008. Biochemical characterization of a catalase from *Antrodia camphorata*: Expression in *Escherichia coli* and enzyme properties. *Botanical Studies*, 49, p. 119-125.
- Kinnula, V.L.; Crapo, J.D., 2003. Superoxide dismutases in the lung and human lung diseases. *Am J Respir Crit Care Med*; 167, p.1600-1619.
- Kirkman, H.N.; Gaetanit, G.F., 1984. Catalase: A tetrameric enzyme with four tightly bound molecules of NADPH (ultrafiltration/human erythrocytes/bovine liver). *Biochemistry*. Vol. 81, p. 4343-4347.
- Kirkman, H.N.; Rolfo, M.; Ferraris, A.M.; Gaetani, G.F., 1999. Mechanisms of protection of catalase by NADPH. Kinetics and stoichiometry. *J. Biol. Chem.* 274, p. 13908-13914.

- Kompella, U.B.; Lee, V.H.I., 1991. Pharmacokinetics of peptide and protein drugs, in: V.H.L. Lee (Ed.). Peptide and Protein Drug Delivery, Marcel Dekker, New York, p. 391.
- Korthuis, R.; Granger, D.N.; Townsley, M.; Taylor, A., 1985. The role of oxygen-derived free radicals in ischemia-induced increases in canine skeletal muscle vascular permeability. *Cir. Res.* 57, p. 599.
- Kowaltowski, A.J.; Vercesi, A.E.; Rhee, S.G.; Netto, L.E., 2000. Catalases and thioredoxin peroxidase protect *Saccharomyces cerevisiae* against Ca²⁺-induced mitochondrial membrane permeabilization and cell death. *FEBS Lett.* 473, p. 177–182.
- Lambotte, L.; d’Udekem, Y.; Amrani, A.; Traper, H.; 1988. Free radicals and liver ischemia-reperfusion injury. *Transplant Proc* 20, p. 977.
- Lee, K.S.; Kim, S.R.; Park, S.J.; Park, H.S.; Min, K.H.; Lee, M.H.; Jin, S.M.; Jin, G.Y.; Yoo, W.H.; Lee, Y.C., 2006. Hydrogen Peroxide Induces Vascular Permeability via Regulation of Vascular Endothelial Growth Factor. *Am J Respir Cell Mol Biol* Vol 35, p. 190–197.
- Lee, S.J.; Lim, K.T., 2007. UDN glycoprotein regulates activities of manganese-superoxide dismutase, activator protein-1, and nuclear factor-kappaB stimulated by reactive oxygen radicals in lipopolysaccharide-stimulated HCT-116 cells. *Cancer Lett*; 254, p. 274–87.
- León, O.S.; Martínez, G.; Candelario, E.J.; Isabel, G.; Tania, B.; Ledesma, L., 2005. Balance antioxidante prooxidante. *Salud y enfermedad*. Primera Edición. Edición Electrónica. N° 562-2004:55-85.
- Li, J.J.; Oberley, L.W., 1997. Overexpression of manganese-containing superoxide dismutase confers resistance to the cytotoxicity of tumor necrosis factor- α and/or hyperthermia. *Cancer Res.* 57, p. 1991–1998.
- Liu, T.H.; Beckman, J.S.; Freeman, B.A.; Hogan, E.L.; Hsu, C.Y., 1989. Polyethylene glycol-conjugated superoxide dismutase and catalase reduce ischemic brain injury. *Am. J. Physiol.* 256, p. 589-593.
- Lortz, S.; Tiedge, M., 2003. Sequential inactivation of reactive oxygen species by combined overexpression of sod isoforms and catalase in insulin-producing cells. *Free Radical Biology & Medicine*, 34, (6), p. 683–688.
- Lortz, S.; Tiedge, M.; Nachtwey, T.; Karlens, A. E.; Nerup, J.; Lenzen, S., 2000. Protection of insulin-producing RINm5F cells against cytokine-mediated toxicity through overexpression of antioxidant enzymes. *Diabetes* 49, p.1123–1130.
- Macias, C.A.; Chiao, J.W.; Xiao, B.S.J; Arora, D., S.A.; Tyurina, Y.; Delude, R.L.; Wipf, P.; Kagan, V.E.; Fink, M.P., 2007. Treatment With a Novel Hemigramicidin-TEMPO Conjugate Prolongs Survival in a Rat Model of Lethal Hemorrhagic. *Ann. Surg.* 245, p. 305-314.

- Maritim, A.C.; Sanders, R.A.; Watkins, III J.B., 2003. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review. *J Biochem Mol Toxicol* 17, p. 24–38.
- Mark, S.D.; Zhang, M.; Meng, Y.G.; Kadkhodayan, M.; Kirchhofer, D.; Combs, D.; Damico, L.A., 2002. Albumin Binding as a General Strategy for Improving the Pharmacokinetics of Proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 277, (38), p. 35035–35043.
- Marklund, S.L., 1982. Human copper-containing superoxide dismutase of high molecular weight. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, p. 7634–7638.
- Matsuyama, T.; Shimizu, S.; Nakamura, H.; Michisita, H.; Tagaya, M.; Sugita, M., 1994. Effect of recombinant superoxide dismutase on manganese superoxide dismutase gene expression in gerbils after ischemia. *Stroke* 25 (7), p. 1417-1424.
- McCord, J.M., 1985. Oxygen-derived free radicals in post-ischemic tissue injury. *N Engl J Med* 312, p.159–63.
- McCord, J.M., 1986. Superoxide dismutase: rationale for use in reperfusion injury and inflammation. *Free Radic Biol Med* 2: 307–310.
- McCord, J.M. 2002. Superoxide dismutase in aging and disease: an overview. *Methods Enzymol* 349, p. 331–341.
- Michiels, C.; Raes, M.; Toussaint, O.; Remacle, J., 1994. Importance of Se-glutathione peroxidase, catalase, and Cu/Zn-SOD for cell survival against oxidative stress, *Free Radic Biol Med* 17, p. 235–248.
- Miura, H.; Tobe, T.; Miura, K.; Kobayashi, K.; Higashi, T.; 2000. Identification of Epitopes for Cross-reaction, Auto-reaction and Autoantibodies to Catalase. *Journal of Autoimmunity* 15, p. 433–440.
- Mueller, S.; Ruedel, H.D.; Stemmel, W.; 1997. Determination of catalase activity at physiological hydrogen peroxide concentrations. *Anal Biochem*, 245, p.50–60.
- Muzykantov, V.R., 2001. Targeting of superoxide dismutase and catalase to vascular endothelium. *J Control Release* 71, p.1–21.
- Nagy, J.M.; Cass, A.E.; Brown, K.A.; 1997. Purification and characterization of recombinant catalase-peroxidase, which confers isoniazid sensitivity in *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Biol. Chem.* 272, p. 31265-31271.
- Nguyen, W.D., Kim, D.H.; Alam, H.B.; Provido, H.S.; Kirkpatrick, J.R., 1999. Polyethylene glycol-superoxide dismutase inhibits lipid peroxidation in hepatic ischemia/reperfusion injury. *Crit. Care* 3, p. 127–130.

- Obinger, C., Regelsberger, G.; Strasser, G.; Burner, U.; Peschek, G.A., 1997. Purification and characterization of a homodimeric catalase-peroxidase from the cyanobacterium *Anacystis nidulans*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 235, p. 545-552.
- Pascale, G.; Petzold, L.; Théron, P., Anderson, W.B.; Evain-Brion, D.; Raynaud, F., 2005. Differential regulation of Cu, Zn- and Mn-superoxide dismutases by retinoic acid in normal and psoriatic human fibroblasts. *Journal Autoimmunity*, Vol. 24, (1), p. 69-78.
- Pérez, Y.; Valdivia, A.; Gómez, L.; Simpson, B.K.; Villalonga, R., 2005. Glycosidation of Cu,Zn-Superoxide dismutase with end-group aminated dextran. Pharmacological and pharmacokinetics properties. *Macromol. Biosci.* 5, p. 1220-1225.
- Putnam, C.D.; Arvai, A.S.; Bourne, Y., Tainer, J.A., 2000. Active and Inhibited Human Catalase Structures: Ligand and NADPH Binding and Catalytic Mechanism *J. Mol. Biol.* 296, p. 295-309.
- Pyatak, P.S., Abuchowski, A.; Davis, F.F., 1980. Preparation of a polyethylene glycol: Superoxide dismutase adduct, and an examination of its blood circulating life and anti-inflammatory activity. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 29, p.113–127.
- Rabkin, R.; Dahl, D.C., 1993. Renal uptake and disposal of proteins and peptides, in: K.L. Audus, T.J. Raub (Eds.), *Biological Barriers in Protein Delivery*, Plenum Press, New York, p.299.
- Reiter, R.J., 1995. Oxidative processes and antioxidative defense mechanisms in the aging brain. *FASEB J.* 9, p. 526–33.
- Rodríguez, K.; Céspedes, E., 1999. Estrés oxidativo y envejecimiento. *Rev. Cubana de Investigaciones Biomed.* 18, p. 67-76.
- Roosendaal C.; Zhao M.H.; Horst G.; Lockwood C.M.; Kleibeuker J.H.; Limburg P.C.; Nelis G.F.; Kallenberg C.G.M., 1998. Catalase and α -enolase: two novel granulocyte autoantigens in inflammatory bowel disease (IBD). *Clin. Exp. Immunol.* 112, p. 10–16.
- Ruh, J.; Vogel, F.; Schmidt, E.; Werner, M.; Klar, E.; Secchi, A.; Gebhard, M.M.; Glaser, F.; Herfarth, C., 2000. Effects of Hydrogen Peroxide Scavenger *Catalase* on Villous Microcirculation in the Rat Small Intestine in a Model of Inflammatory Bowel Disease. *Microvascular Research* 59, p. 329–337.
- Saha A.; Campbell D.H.; Schroeder, W.A., 1964. Immunochemical studies on liver and erythrocyte catalases from cattle, horse, rabbit and human. *Biochim. Biophys. Acta.* 85, p. 38–49.
- Saito, Y.; Nishio, K.; Ogawa, Y.; Kimata, J.; Kinumi, T.; Yoshida, Y.; Noguchi, N.; Niki, E., 2006. Turning point in apoptosis/necrosis induced by hydrogen peroxide. *Free Radical Res.* 40, p. 619–630.

- Salin, M.L.; McCord, J.M., 1975. Free radicals and inflammation: protection of phagocytosing leukocytes by superoxide dismutase. *J Clin Invest.* 56, p.1319–23.
- Sampayo, J.N.; Gill, M.S.; Lithgow, G.J., 2003. Oxidative stress and aging – the use of superoxide dismutase/catalase mimetics to extend lifespan *Biochemical Society Transactions.* Volume 31, (6), p. 1305-1307.
- Sheptovitsky, Y.G.; Brudvig, G.W., 1996. Isolation and characterization of spinach photosystem II membrane-associated catalase and polyphenol oxidase. *Biochemistry* 35, p 16255-16263.
- Simonian, N.A.; Coyle, J.T., 1996. Oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 36, p.83–106.
- Stadtman, E.R., 1986. Oxidation of proteins by mixed-function oxidation systems: implication in protein turnover, aging and neutrophil function. *Trends Biochem Sci*;11, p.11-12.
- Sumner, J.B.; Dounce, A.L., 1937. Crystalline catalase. *J. Biol. Chem.*, 121, p. 417-424.
- Tetsuo, A.; Malamoto, F.; Yoshimasa, I.; Kazuyuki, H.; Mamoru, S.; Katsuhito, S., 1966. Effect of superoxide dismutase on glomerular nephritis. *Biochem. Pharmacol.* 35, p. 241-345.
- Truelove, D.; Shuaib, A.; Ijaz, S.; Ishaqzay, R.; Kalra, J., 1994 b. Neuronal protection with superoxide dismutase in repetitive forebrain ischemia in gerbils. *Free Rad. Biol. Med.* 17 (5), p. 445-450.
- Truelove, D.; Shuaib, A.; Ijaz, S.; Richardson, S.; Kalra, J., 1994 a. SOD, catalase and U8517F attenuate neuronal damage in gerbils after repeated brief ischemic insults. *Neurochem. Res.* 19 (6), p. 665-671.
- Turrens, J.F.; Crapo, J.D.; Freeman, B.A., 1984. Protection against oxygen toxicity by intravenous injection of liposome-entrapped catalase and superoxide dismutase. *J Clin Invest* 73, p.87–95.
- Valdivia, A.; Dominguez, A.; Caballero, J.; Hernández, J.; Pérez, Y.; and Villalonga, R., 2006. Improved pharmacological properties for superoxide dismutase modified with mannan. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 44, p. 00-00.
- Valdivia, A.; Pérez, Y.; Cao, R.; Baños, M.; García, A.; Villalonga, R., 2007. Bienzymatic supramolecular complex of catalase and superoxide dismutase with improved anti-inflammatory properties. *Macromol. Biosci.* 7, p. 70-75.
- Valdivia, A.; Perez, Y.; Dominguez, A.; Caballero, J.; Gomez, L.; Schacht, E.H.; Villalonga, R., 2005. Improved anti-inflammatory and pharmacokinetics properties for superoxide dismutase by chemical glycosidation with carboxymethylchitin. *Macromol. Biosci.* 5, p. 118-123.

- Valdivia, A.; Pérez, Y.; Ramírez, H.L.; Cao, R.; Villalonga, R., 2006. Improved pharmacological properties for superoxide dismutase modified with β -cyclodextrin-carboxymethylcellulose polymer. *Biotechnol. Lett.* 28, p. 1465-1470.
- Valéry A.; Champy, R.; Mitrovic, D.; Collin, P.; Lomri, A., 2007. Reactive oxygen species and superoxide dismutases: Role in joint diseases. *Joint Bone Spine* 74, p. 324-329.
- Vasudevan, P.T.; Weiland, R.H., 1992. Deactivation and reactor stability. *Biotechnol Bioeng*;41, p. 231– 6.
- Venereo, J.R., 2002. Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Rev Cubana Med Milit.* 31, p.126-33.
- Vepa, S.; Scribner, W.M.; Parinandi, N.L., 1999. Hydrogen peroxide stimulates tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase in vascular endothelial cells. *Am J Physiol.* 277, p. 150-158.
- Veronese, F.; Caliceti, P.; Schiavon, O.; Sergi, M., 2002. Polyethylene glycol-Superoxido dismutase a conjugate in search of explotation. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 54, p. 587-606.
- Vicedo, A.; Vicedo, Y., 2000. Relaciones entre estrés oxidativo con el catabolismo de proteínas. *Rev. Cubana Invest Biomed.* 19, p. 206–12.
- Vogiatzi, G.; Tousoulis, D.; Stefanadis, C., 2009. The Role of Oxidative Stress in Atherosclerosis *Hellenic J Cardiol*; 50, p. 402-409.
- Vorauer, K.; Furnschlief, E.; Wagner, A.; Ferko, B.; Katinger, H., 2001. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 14, p. 63-67.
- Walker, P.M.; Lindsay, T.F.; Labbe, R.; Mickle, D.A.; Romaschin, A.D., 1987. Salvage of skeletal muscle with free radical scavengers. *J. Vasc. Surg.* 5, p.68.
- Walsh, S.W.; Wang, Y., 1993. Deficient glutathione peroxidase activity in preeclampsia is associated with increased placental production of thromboxane and lipid peroxides. *Am J Obstet Gynecol*; 169, p. 1456-61.
- Wang, Y.M.D.; Walsh, S.W., 1996. Antioxidant activities and mRNA Expression of Superoxide Dismutase, Catalase, and Glutathione Peroxidase in Normal and Preeclamptic Placentas. *J Soc Gynecol Invest*, 3, p. 179-84.
- Wiseman, H.; Halliwell, B., 1996. Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. *Biochem J*; 313, p.17-29.
- Wong, G.H.; McHugh, W.T.; Weber, R.; Goeddel, D.V., 1991. Tumor necrosis factor- α selectively sensitizes human immunodeficiency virus-infected cells to heat and radiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, p. 4372–4376.

- Woodward, B.; Zakaria, M.V.M.; 1985. Effect of some free radical scavengers on reperfusion-induced arrhythmias in the isolated rat heart, *J. Mol. Cell. Cardiol.* 17, p. 485-493.
- Zhang, J.; Piantadosi, C.A., 1991. Prevention of H₂O₂ generation by MAO protects against CNS O₂ toxicity. *J. Appl. Physiol.* 71 (83), p. 1057-1061.
- Zimmerman, J.J., 1991. Therapeutic application of oxygen radical scavengers. *Chest* 100, p. 189.