

Mecanismos moleculares en la formación y degradación de los agentes oxidantes en la célula

María Andrea Murillo

*Carlos Arturo Guerrero**

Resumen

Dentro del metabolismo normal de las células se producen agentes oxidantes como especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (ERO y ERN, respectivamente) cuya concentración es regulada por mecanismos antioxidantes. Al ser alterada su producción, tanto ERO como ERN pueden alterar químicamente las principales biomoléculas como lípidos, proteínas y DNA; no obstante, estas moléculas participan en múltiples reacciones fisiológicas celulares. En el presente trabajo queremos revisar el papel de estas especies químicas en la comunicación celular y su interacción específica con transducción de señales, fundamentalmente en células animales.

Palabras clave: Especies reactivas de oxígeno – Especies reactivas de nitrógeno – hidroperóxidos – Transducción de señales.

Summary

Molecular mechanisms involved in the formation and degradation of oxidant agents in the cell

Oxidant agents are produced during the normal metabolism in the cells; these one are reactive oxygen species and nitrogen species (ROS and RNS, respectively). Their concentrations are regulated by antioxidant mechanisms. Although these molecules act in many physiological reactions, when their production is altered, both ROS and RNS can change chemically the major biomolecules, like lipids, proteins, and DNA. In this paper we want to review the role of these chemical species as communicators between cells in

Recibido para evaluación: 15 de Octubre de 2002
Aceptado para publicación: 31 de Mayo de 2003

* Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Medicina,
A.A. 14490, Bogotá, D.C., Colombia.
E-mail: guerra039@yahoo.com

addition to their specific relationship with signal transduction, principally in animal cells.

Key words: Reactive oxygen species – Reactive nitrogen species – Hydroperoxides – Signal transduction.

Introducción

Los orbitales de los electrones contienen electrones en pares con espines opuestos. Los radicales libres son moléculas o fragmentos de moléculas que contienen electrones desapareados en su orbital externo. Debido a la tendencia natural de los electrones a aparearse, la presencia de estos electrones impares en el átomo resulta en una tensión la cual induce al electrón a buscar pareja (otro electrón) (1), es decir, los radicales libres son especies químicas que tienen un electrón desapareado. Son muy reactivos y son producidos continuamente en las células como productos del metabolismo normal (2).

Los radicales libres pueden ser formados de tres formas: 1. Por rompimiento homolítico (simétrico) de un enlace covalente de una molécula en la que cada fragmento retiene un electrón desapareado. ($X : Y \rightarrow X^{\bullet} + Y^{\bullet}$), 2. Por la pérdida de un solo electrón de una molécula normal y 3. Por la adición de un electrón a una molécula normal ($A + e^{-} \rightarrow A^{\bullet-}$). La transferencia de electrones es el proceso más común en los sistemas biológicos que la mediada por rayos UV o radiación ionizante la cual generalmente requiere aumento de energía y se denomina fisión homolítica. En cambio los iones son formados por rompimiento asimétrico denominado fisión heterolítica, ($X : Y \rightarrow X^{-} + Y^{+}$), en la cual los electrones del enlace covalente son retenidos por solo uno de los fragmentos de la molécula (2).

En la naturaleza podemos encontrar diversos radicales libres siendo los más importantes aquellos derivados del oxígeno o del nitrógeno:

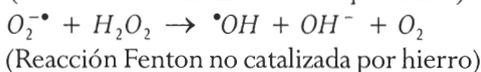
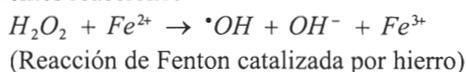
1. Radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$): es producido por la transferencia al oxígeno de un solo

electrón causando su reducción ($O_2 + e^{-} \rightarrow O_2^{\bullet-}$). Se caracteriza por no ser difusible, de esta manera su acción se restringe al lugar de formación. No es particularmente dañino, su importancia radica en que es un agente reductor de iones metálicos y puede inactivar la glutatión peroxidasa y la catalasa llevando a un incremento en la concentración de peróxido de hidrógeno intracelular (2). En pH ácido el superóxido se protona produciendo el radical perhidroxilo (HO_2^{\bullet}), especie altamente reactiva (2). Se sospecha que una persona convierte el 1 al 3% del oxígeno respirado a superóxido (1). También se sabe que el superóxido inhibe la respiración celular dañando el centro Fe-S de la enzima aconitasa deteniendo el ciclo de Krebs y como consecuencia la cadena respiratoria y fosforilación oxidativa.

2. Peróxido de hidrógeno: Una particularidad muy importante de esta molécula es su difusibilidad debido a su estabilidad. La reducción de dos electrones del oxígeno produce peróxido de hidrógeno en la siguiente reacción de manera espontánea o catalizada por la superóxido dismutasa (SOD): $2 O_2 + 2 e^{-} + 2 H^{+} \rightarrow H_2O_2$. Se considera que el peróxido de hidrógeno es un agente oxidante, fuente de radicales hidroxilo en presencia de iones metálicos, por lo cual entra en la categoría de especies reactivas de oxígeno (ERO) aunque no es un radical libre (2). El peróxido es generado por la enzima NADPH oxidasa (Fosfato de Nicotinamida Adenin Dinucleótido) dependiente de calcio. En la tiroides, al igual que en otros puntos metabólicos el peróxido es utilizado por una peroxidasa para agregar yodo a los anillos aromáticos durante las síntesis de hormona tiroidea (2). El peróxido de hidrógeno, en

algunas células, puede regular la expresión génica regulando la transcripción al desplazar la subunidad inhibitoria citoplasmática κB del factor de transcripción NF- κB .

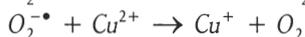
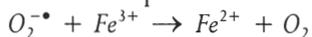
3. Radical hidroxilo OH: Es producido en las siguientes reacciones:



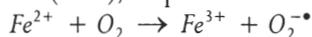
El radical hidroxilo es extremadamente reactivo, puede reaccionar con la mayoría de biomoléculas. En la célula no difunde debido a su alta reactividad y su vida media extremadamente corta (2).

4. Radicales relacionados con el carbono ($R\cdot$): Proviene del ataque de un radical oxidante (por ejemplo $\cdot OH$) sobre una molécula biológica (RH) como un lípido, carbohidrato, proteína o ácido nucleico. Estos reaccionan muy rápidamente con oxígeno para formar el correspondiente radical peroxilo ($ROO\cdot$) el cual puede participar en reacciones que generen radicales alcoxilo ($RO\cdot$) o radicales tiilo ($RS\cdot$) (2).

5. El hierro o cobre son catalizadores en reacciones químicas y no son radicales libres, pero los incluimos dentro de esta clasificación en cuanto estos metales reducidos reaccionan con el oxígeno y producen superóxido que a su vez es fuente de peróxido de hidrógeno.



Los iones ferroso (Fe^{2+}) y cuproso (Cu^+) son más reactivos con peróxido de hidrógeno que sus contrapartes oxidadas, férrico (Fe^{3+}) y cúprico (Cu^{2+}), respectivamente.



De esta manera las reacciones de iones metálicos pueden ser consideradas reacciones redox reversibles y son importantes en la

promoción de las reacciones de los radicales libres (2).

Respecto a los compuestos derivados del nitrógeno, moléculas como el óxido nítrico y dióxido nítrico contienen un electrón no apareado en el orbital externo y son radicales libres (3). En general el óxido nítrico ($NO\cdot$) es débilmente reactivo con moléculas no radicales, pero reacciona rápidamente con $O_2^{\cdot -}$ y otros radicales. El exceso de $NO\cdot$ es citotóxico, de manera directa, porque se combina con residuos tirosina, y al unirse a ellos puede inactivar vías enzimáticas, por ejemplo se une a residuos tirosina en la enzima ribonucleósido difosfato reductasa, implicada en la síntesis de nucleótidos alterando la replicación celular. Igualmente, el peróxido, es tóxico de manera indirecta al formar peroxinitrito ($ONOO^-$) (1) el cual es un potente oxidante que puede, en los sitios activos de diferentes enzimas, nitrosilar los grupos sulfhidrilo para formar S-nitrosotioles causando su inactivación (1).

Las células han desarrollado diversos mecanismos de defensas antioxidantes para prevenir la formación de radicales libres o limitar sus efectos dañinos. Incluyen tres tipos de mecanismos: a) unas enzimas que descomponen peróxidos; b) proteínas que secuestran metales como el hierro y el cobre y c) otro tipo de moléculas que secuestran indiscriminadamente los radicales libres (1,4). Los antioxidantes son de dos categorías: los que previenen la generación de radicales libres o interceptan los radicales ya generados. Estas defensas pueden ser enzimáticas o no. Entre las defensas preventivas se encuentran la transferencia de electrones y el secuestro de iones metálicos por parte de proteínas plasmáticas como la ferritina o la ceruloplasmina (3).

Las principales biomoléculas celulares como el ácido deoxirribonucleico (DNA), el ácido ribonucleico (RNA), lípidos, carbohidratos y

produce la peroxidación del ácido araquidónico lo cual lleva a la endociclización y a la formación de compuestos similares a prostaglandina G₂ (PGG₂) que a su vez son reducidos a compuestos similares a PGF₂, a continuación estos F₂-isoprostanos son liberados, presumiblemente por fosfolipasas (5). Según diversos reportes, la formación de F₂-isoprostanos es uno de los primeros fenómenos que preceden la muerte celular causada por radicales libres (1,2, 5).

Por otro lado, las proteínas parecen ser menos susceptibles que los PUFAs al ataque por radicales libres, pero si la proteína tiene un metal en su estructura (por ejemplo cobre unido a residuos de histidina) puede producirse reacción entre el ión metálico y el peróxido de hidrógeno lo cual genera un radical hidroxil (1). Los productos de oxidación de las proteínas y derivados carbonilos de proteínas pueden resultar de modificaciones oxidativas de las cadenas laterales de los aminoácidos, rompimiento de péptidos y reacciones con productos de oxidación de lípidos y carbohidratos (6). La presencia de grupos carbonilo en proteínas puede indicar que las proteínas han sido sujetas a daño por radicales libres. Un incremento en estos grupos en diversos tejidos ha sido asociado con un número de desórdenes patológicos incluyendo artritis reumatoidea, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson y aterosclerosis (5).

En contraste a la labilidad de la mayoría de compuestos carbonilo, algunos productos de oxidación de fenilalanina y tirosina son estables. La oxidación de uno de los electrones de la L-tirosina genera radicales tirosilo de larga vida los cuales pueden reaccionar entre si formando ditirosina (DT), el cual ha sido utilizado como marcador de estrés oxidativo en estudios animales (5, 7).

En cuanto al DNA, los radicales libres pueden causar entrecruzamientos, daño al esqueleto

desoxirribosa-fosfato y modificaciones químicas en las bases púricas o pirimidínicas (5, 7). En general el DNA al ser atacado por radicales oxidantes, no produce reacción en cadena y al igual que en las proteínas el daño parece ser sitio específico llevando a ruptura de la hebra de DNA (3). La modificación oxidativa de las bases nitrogenadas provoca mutaciones, mientras que la oxidación de la desoxirribosa puede inducir la liberación de la base nitrogenada o rompimiento de la hebra de DNA. La mayoría de radicales libres generan múltiples productos a partir de las cuatro bases (5-hidroximetiluracil, 8-hidroxiadenina, timidina glicol, etc.), sin embargo el O₂ modifica preferencialmente la guanina por 8-hidroxilación (5, 7).

Papel de ERO en algunas reacciones fisiológicas

Las especies reactivas de oxígeno (ERO) incluyen radicales libres de oxígeno y derivados no radicales involucrados en la producción de radicales de oxígeno como peróxido de hidrógeno (1). Las ERO son producidas dentro del metabolismo de las células e intervienen en varias reacciones fisiológicas, por ejemplo:

a. Fagocitosis: En la destrucción celular mediada por neutrófilos, eosinófilos y mononucleares se observa la concomitante producción de agentes oxidantes (8). El mecanismo molecular generado por el estímulo provoca despolarización de la membrana celular, formación de superóxido (como resultado de la activación de la NADPH o NAD oxidasa) lo que causa cambios en el nivel de AMPc y liberación de enzimas lisosomales (8).

b. Actividad plaquetaria: El superóxido es posiblemente un producto del metabolismo del ácido araquidónico, aunque no tiene función específica cuando se encuentra en el espacio extracelular, puede causar daño en las plaquetas

vecinas, leucocitos y en la pared del vaso. En las plaquetas el superóxido es formado continuamente independientemente del estímulo celular, Los radicales libres y productos de peroxidación lipídica modulan la función plaquetaria actuando en el metabolismo del ácido araquidónico. Ellos aceleran la liberación del ácido araquidónico de los fosfolípidos de la membrana y favorecen la formación de TXA₂ (tromboxano A₂) aumentando la agregación plaquetaria (8, 9).

c. Generación de radicales libres en la cadena de transporte de electrones mitocondrial y microsomal. La mitocondria juega un papel importante en la detoxificación de oxígeno por la reducción a agua mediada por el sistema citocromo oxidasa. Este proceso está asociado con la producción de enlaces de fosfato de alta energía ATP. Algunos constituyentes de la cadena transportadora de electrones, (NAD, FAD coenzima Q, citocromo b) localizados en la membrana interna de la mitocondria al reducirse pueden reaccionar con oxígeno para producir superóxido. La región de coenzima Q y citocromo b se ha demostrado como el principal sitio de formación de superóxido y autooxidación de la ubisemiquinona (8). De la misma manera el peroxisoma cumple una función fisiológica en la detoxificación del peróxido de hidrógeno formado durante la β -oxidación de los ácidos grasos. Igualmente debido a la alta concentración de oxidasa (D-aminoácido oxidasa, α -hidroxiácido oxidasa, acil CoA oxidasa) los peroxisomas son el principal sitio de producción de peróxido de hidrógeno, el cual es neutralizado por la catalasa (8).

d. Citocromo P450: Las especies reactivas de oxígeno también se pueden producir en el citoplasma y en la membrana nuclear en cadenas de transporte de electrones independientes de fosforilación oxidativa como en el citocromo P450 y citocromo b5. La descomposición del

complejo P-450 – Fe⁺³ – sustrato – O₂ es una fuente de peróxido, pero es principalmente la citocromo P-450 reductasa la que produce superóxido por transferencia de electrones desde el oxígeno (8).

e. Metabolismo del ácido araquidónico: El equilibrio en la coagulación se mantiene por el balance de dos prostanooides (tromboxanos/prostaciclina: TXA₂/PGI₂) los cuales derivan del ácido araquidónico. Este ácido se libera de los fosfolípidos en las membranas celulares por acción de la enzima fosfolipasa A2, cuya acción es incrementada por las ERO. De esta manera a través de la síntesis de 5-hidroxiicosatetraeicoico (5-HETE), leucotrieno B4 (LTB4), la sustancia anafiláctica de reacción lenta (SRS-A) y prostanooides, las ERO pueden influenciar hacia la coagulación y la inflamación, respectivamente. Los prostanooides TXA₂/PGI₂ se sintetizan por la enzima PG endoperóxido sintetasa (PGH sintetasa) una enzima con actividad tanto ciclooxigenasa (producción de PGG₂) y peroxidasa (PGH₂ a partir de PGG₂). A partir de PGH₂ se sintetizan TXA₂ o PGI₂. Los hidroperóxidos lipídicos estimulan una u otra actividad de la PGH sintetasa dependiendo de su concentración: 10⁻⁹ – 10⁻⁷ M estimula la actividad ciclooxigenasa (síntesis de PGI₂), mientras que 10⁻⁷ – 10⁻⁶ M favorece la actividad peroxidasa (TX₂) (8).

f. Deshidrogenasa láctica: Esta enzima reacciona con el superóxido. El NADH libre no reacciona con superóxido, sin embargo, cuando el NADH está unido a la enzima deshidrogenasa láctica puede ser oxidado por superóxido produciendo NAD, consumiendo de esta forma el poder reductor de la deshidrogenasa láctica (8).

Radicales libres y transducción de señales

La transducción de señales es el proceso que une el medio externo con el núcleo celular, los receptores son el inicio de estas vías de transducción de señales y entre ellos encontramos los receptores tirosin quinasa (RTK) los cuales autofosforilan algunas tirosinas a lo largo de sus dominios intracelulares (10). Algunos agentes reaccionan específicamente con un tipo de receptor, pero otros como los rayos UV, radiación ionizante, toxinas metálicas, oxidantes y agentes alquilantes no reaccionan con un tipo exclusivo de receptor. Una vez se ha unido el ligando al receptor se desencadena una serie de reacciones químicas en las cuales están involucradas enzimas quinasa y fosfatasa. Prácticamente todas las proteínas fosfatasa (PTP) poseen un residuo de cisteína en su sitio activo, y se especula que esta cisteína es blanco de agentes oxidantes como H_2O_2 (10).

Las ERO parecen funcionar produciendo alteraciones selectivas en grupo heme o sistemas que regulan grupos tiol (guanilato ciclasa, ciclooxigenasa, cadena de transporte de electrones y tirosinas fosfatasa) para iniciar una respuesta fisiológica a través de transducción de señales en la que intervienen fosfolipasas, proteínas quinasa, canales iónicos, proteínas contráctiles y expresión génica (11). En cuanto a la guanilato ciclasa, ERO y ERN parecen tener papeles en la señalización en procesos fisiológicos ya que su aumento está asociado en la atenuación de mecanismos vasodilatadores mediado a través de estimulación de la guanilato ciclasa soluble (sGC) y la promoción de la expresión de proteínas de adhesión o procesos proliferativos (11). Por ejemplo el H_2O_2 interfiere con la producción de ATP por algunos mecanismos incluyendo oxidación de un grupo $-SH$ esencial en los sitios activos de algunas enzimas glucolíticas como gliceraldehido-3P-deshidrogenasa (10).

Entre algunos efectos del H_2O_2 en la transducción de señales se encuentra la activación de proteínas quinasa, inhibe proteínas fosfatasa, altera la concentración de calcio intracelular, estimula fosfolipasas y regula factores de transcripción como NF- κ B y AP-1 (10). También activa algunos miembros de la familia de quinasa activadoras de mitosis (MAPK) en células endoteliales, musculares vasculares y fibroblastos a través de mecanismos dependientes de tirosinquinasa (10).

Del mismo modo, ERO pueden afectar múltiples vías de transducción de señales corriente arriba de los factores de transcripción incluyendo modulación de la señalización de calcio, proteínas quinasa y proteínas fosfatasa (12). Por ejemplo se ha demostrado que en respuesta a estímulos fisiológicos en la superficie celular, el nivel de calcio aumenta produciendo la activación de proteínas dependientes de calcio como PKC, Ca^{2+} calmodulina quinasa y protein-fosfatasa dependientes de calmodulina (calcineurina) (12). Los oxidantes estimulan la señalización de calcio y aumentan el calcio citosólico, lo que sugiere un posible papel fisiológico de ERO y estrés oxidativo en la regulación de señalización inducido por calcio. Aunque los blancos moleculares exactos de la señalización de calcio mediada por oxidantes no son conocidos, la capacidad de varios antioxidantes para inhibir la bomba calcio dependiente de ATP sugiere que modificaciones de esta bomba por oxidantes puede ser un mecanismo de señalización.

En cuanto a la fosforilación de proteínas (paso clave en diferentes vías de transducción de señales) se ha observado que radiación ionizante y H_2O_2 inducen eventos de tirosin fosforilación y activación de quinasa corriente abajo como PKC, p56lck y p72raf1 (12), es posible que ERO puedan producirse tras algún estímulo y provocar la actividad de estas enzimas. No es muy claro si ERO causa activación directa de

la actividad tirosin quinasa o si el aumento observado en la tirosin fosforilación sea causada por inhibición de la actividad tirosin fosfatasa (10, 13).

Dentro de las proteínas con acción de quinasas se encuentra la familia MAPK (ERK: Extracellular Signal-Regulated Kinases, SAPK/JNK: c-jun N-terminal Kinase, P38 MAPK) las cuales tienen la función de llevar la información extracelular al núcleo tras una serie de reacciones secuenciales de quinasas (12, 13).

Es importante recordar que estas quinasas están localizadas corriente abajo en la vía de transducción de señales y por lo tanto es difícil asegurar la contribución directa de ERO sobre la modulación de la actividad MAPK. La modulación redox de su actividad puede reflejar efectos directos sobre procesos de señalización corriente arriba que converjan sobre MAPK.

En cuanto a ERN, la interacción más significativa de NO• con los sistemas de señalización involucra su reacción con el hierro del grupo heme, otros metales y radicales libres (14). El NO• posee un efecto dual dependiendo de su concentración. Normalmente, entre las acciones de NO• se incluye la unión al grupo heme de la enzima guanilato ciclasa soluble (sGC) y el complejo hemo-cobre de la citocromo oxidasa (11). La unión de NO• a estas proteínas estimula la producción de GMP cíclico (3', 5'-guanilato monofosfato cíclico cGMP) el cual está asociado con procesos que incluyen vasodilatación, inhibición de la agregación plaquetaria y adhesión de neutrófilos al endotelio y una inhibición reversible de la respiración mitocondrial asociado con un mejoramiento de la eficiencia del metabolismo de energía (11). Sin embargo, cuando la concentración de NO• aumenta compete con la superóxido dismutasa para remover el superóxido formando peroxinitrito (ONOO-) (14). Esta

reacción puede ocurrir en la membrana debido a la baja polaridad de NO• y del superóxido. Entre los efectos más potentes de ONOO• y RNS parecen ser las modificaciones de los tioles que pueden afectar los sistemas de señalización o resultar en la producción de donadores de NO• (11, 14). Del mismo modo, ONOO-, NO₂ y N₂O₃ interactúan con el glutatión (GSH) y otros tioles causando su oxidación o la formación de tioles nitrosados RSN₂ ó RSNO. Esta modificación de tioles en aminoácidos de sitios claves en proteínas afecta el control de la señalización. Altos niveles de ONOO• también parece formar donadores NO• a través de la modificación de alcoholes y azúcares a especies nitradas las cuales liberan NO• en presencia de tioles (11, 14). Las ERN también pueden participar en procesos de señalización celular a través de interacciones con lípidos (eicosanoides) y proteínas.

En conclusión existen diferentes mecanismos celulares para generar las ERO y las ERN así como también los mecanismos que regulan su concentración. Estas especies reactivas pueden ser formadas por actividad endógena alterada o exógena, al ingerir sustancias generadoras, pueden contribuir a originar patogénesis como la aterosclerosis a través de su acción sobre lípidos, proteínas y DNA. Estos radicales libres pueden tener un efecto tanto directo como indirecto sobre factores de transcripción que alteran anormalmente la expresión de genes involucrados en fisiopatologías.

Agradecimientos

Al Dr. Fabio Andrés Rodríguez por la consecución de algunos de los artículos citados en esta revisión y por su valioso aporte en la discusión del tema aquí presentado.

Bibliografía

1. J. Fehér, G. Csomós y A. Verecker, The chemistry of free radical reactions (chapter 1), en: "Free Radical Reactions in Medicine", Springer-Verlag Berlin, 1987.
2. K.H. Cheeseman y T.F. Slater, An introduction to free radical biochemistry, *Brit. Med. Bull.*, **49**, 481 (1993).
3. B. Halliwell, Antioxidants in human health and disease, *Ann. Rev. Nutr.*, **16**, 33 (1996).
4. L.A. del Río, F.J. Corpas, L.M. Sandalio, J.M. Palma, M. Gómez y J.B. Barroso, Reactive oxygen species, antioxidant systems and nitric oxide in peroxisomes, *J. Exp. Bot.*, **53**, 1255 (2002).
5. M.M Wolin, Interactions of oxidants with vascular signaling systems, *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, **20**, 1430 (2000).
6. H. Esterbauer, G. Wäg y H. Puhl, Lipid peroxidation and its role in atherosclerosis, *Brit. Med. Bull.*, **49**, 566 (1993).
7. L.L. Zwart, J.H.N. Meerman, J.N.M. Commandeur y N.P.E. Vermeulen, Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and in humans, *Free Rad. Biol. Med.*, **26**(1/2): 202-R226 (1999).
8. J. Fehér, G. Csomós y A. Vereckei, Physiological free radical reactions (chapter 3), en: "Free Radical Reactions in Medicine", Springer-Verlag, Berlin, 1987.
9. R.R. Jenkins, Free radical chemistry, relationship to exercise, *Sport Medicine*, **5**, 156 (1998).
10. P. Herrlich y F.D. Böhmer, Redox regulation of signal transduction in mammalian cells, *Biochem. Pharmacol.*, **59**, 35 (2000).
11. S. Vepa, W.M Scribner, N.L. Parinandi, D. English, J.G.N. Garcia y V. Natarajan, Hydrogen peroxide stimulates tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase in vascular endothelial cells, *Am. J. Physiol.*, **277** (Lung Cell Mol. Physiol., 21) L150-L158 (1999).
12. C. Kunsch y R.M. Medford, Oxidative stress as a regulator of gene expression in the vasculature, *Circulation Research*, **85**, 753 (1999).
13. K.C. Fuh, A. Meneshian, C.B. Patel, V. Taktiar y G.B. Bulkley, Signal transduction by reactive oxygen species: alternative paradigms for signaling specificity, *Surgery*, **131**, 601 (2002).
14. G. Espey-Michael, M.M. Katrina, T. Douglas, X. Sandhya, C. Deborah, V. Michael y W. David, A chemical perspective on the interplay between NO, reactive oxygen species, and reactive nitrogen oxide species, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **962**, 195 (2002).