

GERAÇÃO DE O₂* DURANTE A SÍNTESE DE NEUROMELANINAS

Accção do Manganésio

C.R. MARINHO, C.F. MANSO

Instituto de Química Fisiológica. Faculdade de Medicina de Lisboa. Lisboa

SUMÁRIO

Estudou-se o consumo de O₂ da reacção de autoxidação da dopamina em tampão TRIS/NaCl a pH variável. A autoxidação da dopamina pode ocorrer através de duas vias de oxidação distintas, uma que envolve a redução univalente do O₂ e leva à formação de O₂* e outra de redução divalente que produz H₂O₂. A detecção da redução univalente durante a síntese *in vitro* de neuromelaninas foi seguida através do consumo de O₂, usando o método do ferritocromo c. A detecção divalente foi feita na presença de catalase. Verificou-se que o manganésio aumenta o consumo de O₂ da reacção, aumentando a produção de espécies activas de oxigénio, nomeadamente O₂* e H₂O₂. Assim, parece provável que a neurotoxicidade deste metal a nível do sistema nervoso central possa estar relacionada com o facto de haver um aumento da produção de radicais livres de oxigénio nos neurónios dopaminérgicos, os quais ficam deste modo sujeitos a um stress oxidativo.

SUMMARY

Production of O₂ during Neuromelanin synthesis. Action of Manganese

The oxygen uptake during the reaction of dopamine autoxidation was studied and it was found that it may occur through two distinct oxidative pathways. One involves the univalent reduction of oxygen, forming the superoxide radical, the other involves a bivalent reduction which generates hydrogen peroxide. The detection of the univalent reaction was followed by the study of oxygen consumption, in the presence of cytochrome c. The detection of the bivalent reaction was made in the presence of catalase. It was found that manganese increases the oxygen uptake of the reaction, by increasing the production of both oxygen active forms. It seems probable that the neurotoxicity of this metal may be related with the increased production of activated oxygen in dopaminergic neurons, which undergo an oxidative stress.

INTRODUÇÃO

As neuromelaninas são derivadas do metabolismo oxidativo das catecolaminas (Fig.1) e são responsáveis pela pigmentação do sistema nervoso central. Os estudos histoquímicos de Barden¹, demonstraram que as melaninas depositadas na *Substantia nigra* e no *Locus coeruleus*, são resultado da polimerização de produtos derivados da oxidação da dopamina e da noradrenalina, respectivamente.

As funções das neuromelaninas são ainda motivo de grande controvérsia. Estes polímeros são muitas vezes considerados como produtos de acumulação de natureza tóxica², devido ao facto de durante a sua síntese haver formação de metabolitos intermediários que exercem acções tóxicas (quinonas e radicais semiquinónicos)³⁻⁶. Por outro

lado, as neuromelaninas são indicadas como possíveis "scavengers" de radicais livres^{7,8}, ao actuarem como tampões redox que captam e cedem electrões. Segundo Korytowski et al.⁹, os polímeros de melaninas podem actuar como pseudo-dismutases, o que pode indicar as neuromelaninas como parte de um mecanismo protector do sistema nervoso.

Estes pigmentos adquiriram particular importância nos últimos anos devido à sua possível relação com a doença de Parkinson. A despigmentação do sistema nervoso central parece estar relacionada com factores implicados no aparecimento de doenças motoras extrapiramidais.

Os neurónios que contêm neuromelaninas sofrem uma degenerescência com a idade. O parkinsonismo parece estar associado a uma degenerescência acelerada dos

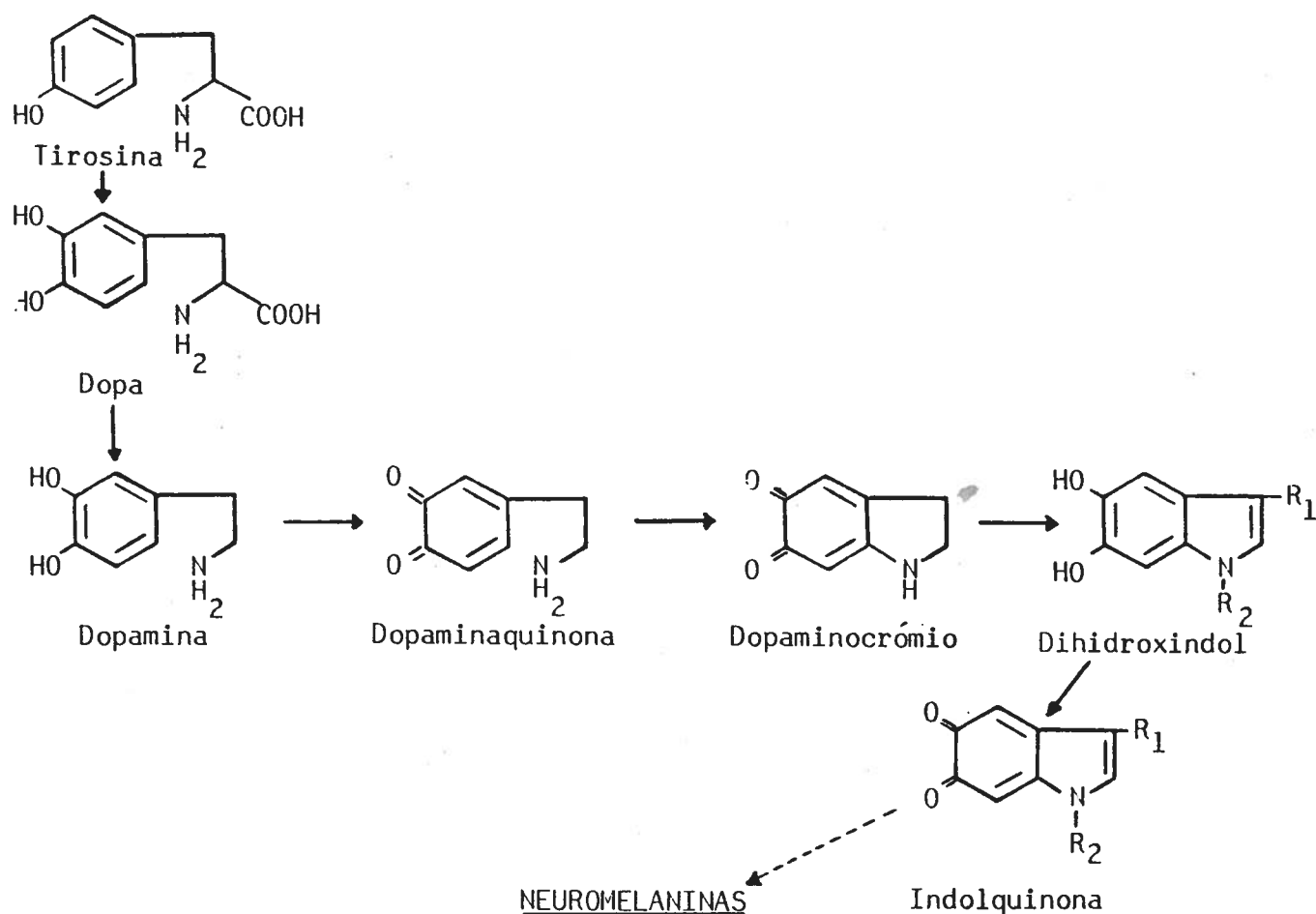


Fig. 1 — Mecanismo proposto para a via de síntese de neuromelaminas, partindo da oxidação não enzimática da dopamina

QUADRO 1 — Autoxidação da dopamina e geração de radical superóxido e peróxido de hidrogénio

	TRIS/NaCl, pH9		TRIS/NaCl, pH 9.5		TRIS/NaCl, pH 10	
	$\mu\text{M O}_2$	% O_2	$\mu\text{M O}_2$	% O_2	$\mu\text{M O}_2$	% O_2
Tampão Tris 0.2M/NaCl 0.15M	38.5±4.7n=10	18% c.v.=12.2%	34.2±2.1 n=3	16% c.v.=6.25%	31.2±3.3 n=12	14.6% c.v.=10.4%
Dopamina 0.1m M em Tris/NaCl (SC)	104.9±7.3 n=5	49% c.v.=6.9%	154.1±3.8 n=5	72% c.v.=2.5%	187.3±4.9 n=11	87.5% c.v.=2.3%
SC+Fe(III)Citc	104.9±9 n=4	49% c.v.=8.6%	—	—	157.8±3.8 n=2	73.8%
SC+ Fe(III)Citc+SOD	—	—	—	—	179.8±3 n=2	84%
SC +Catalase	70.6±2.1 n=3	33% c.v.=3%	—	—	—	—
SC + Fe(III)Citc + Catalase	67.4 n=2	31,5%	—	—	—	—

O consumo de oxigénio foi determinado ao fim de 30 minutos a 37°C. Os valores apresentados representam a média±desvio padrão dos vários ensaios (n). O coeficiente de variação dos resultados, desvio padrão/média x 100% foi igualmente calculado, de forma a ter uma medida do erro associado a cada experiência. A significância dos resultados foi calculada usando o teste de T de Student (valores comparados com os obtidos para S.C.)

neurónios dopaminérgicos da *Substantia nigra*, além de se verificar uma diminuição acentuada da concentração de dopamina e despigmentação destas células¹⁰.

Lesões similares têm sido observadas após administração crónica de manganésio¹¹ e de drogas como o MPTP¹²⁻¹³. A neurotoxicidade destas substâncias parece estar relacionada com o facto de elas serem capazes de potenciar a autooxidação *in vitro* da dopamina¹⁴⁻¹⁶, aumentando a produção de quinonas citotóxicas e provavelmente de radicais livres de oxigénio.

Em trabalhos anteriores¹⁷, verificou-se que o manganésio divalente seria capaz de potenciar a autooxidação da dopamina, aumentando a produção de dopaminaquinonas.

Pretendeu-se com este trabalho estudar a geração de formas activas de oxigénio durante a síntese de neuromelaninas e verificar o efeito do manganésio a nível da produção de radicais livres de oxigénio.

MATERIAL E MÉTODOS

A dopamina oxida-se espontaneamente em solução aquosa, levando à formação de compostos corados de cor amarela, que vão escurecendo com o decorrer da reacção e que acabam por precipitar sob a forma de pigmentos de cor castanha escura (neuromelaninas). A velocidade desta reacção está altamente dependente do pH da solução. Estudos espectrofotométricos desta reacção foram realizados em tampão TRIS 0.02 M/ NaCl 0.15 M, a pH 8 e a pH 10.

Estudou-se o consumo de oxigénio durante a síntese *in vitro* de neuromelaninas, partindo da reacção de autooxidação da dopamina 0.1 mM em tampão TRIS/NaCl, a pH 9-10.

A detecção da redução univalente do oxigénio durante a oxidação da dopamina, foi seguida através do consumo de O₂ de acordo com o método descrito por Fridovich¹⁸. Este método baseia-se na inibição pelo ferricitocromo c do consumo de oxigénio pela via de redução univalente, podendo tal inibição ser superada na presença de SOD.

A detecção da redução divalente do oxigénio foi feita na presença de catalase. A catalase inibe metade do consumo de O₂ pela via de redução divalente.

A acção do manganésio sobre o sistema em estudo e o seu efeito na geração de O₂⁻ e H₂O₂ foram avaliados através do consumo de oxigénio da reacção da dopamina na presença de iões Mn²⁺ 0.01 mM. De forma a evitar a formação de possíveis complexos e posterior precipitação, o cloreto de manganésio (MnCl₂) foi dissolvido em água desionizada, sendo posteriormente diluído em tampão TRIS-salino de forma a obter a concentração e o pH desejados.

As determinações espectrofotométricas foram realizadas num aparelho Beckman DU-50 com controlador de temperatura, utilizando um módulo Soft-PacTM de cinética.

O consumo de oxigénio foi determinado usando um eléctrodo de Clark com agitação e unidade de controlo e registor acoplados (Oxígrafo Gilson 5/6). Todos os ensaios foram realizados a uma temperatura constante de 37°C.

A dopamina, SOD (eritrócitos de bovino), catalase (fígado bovino) e ferricitocromo c (coração de cavalo) foram obtidos da Sigma, enquanto os restantes reagentes foram fornecidos pela Merck.

RESULTADOS

1- Estudo da reacção de oxidação da dopamina — A oxidação das catecolaminas é um processo complexo em que há formação de compostos altamente instáveis como as quinonas, hidroquinonas e radicais semiquinónicos. O mecanismo desta oxidação foi proposto por Mason em 1947¹⁹, como explicação para a formação de melaninas. As catecolaminas são convertidas inicialmente em orto-semiquinonas, as quais dão origem por desprotonação às orto-quinonas. Estas quinonas sofrem posteriormente uma ciclização irreversível, com formação de aminocrómios.

A formação não enzimática de neuromelaninas pode ser estudada *in vitro* a partir da oxidação espontânea da dopamina¹⁷. Determinações espectrofotométricas desta reacção permitem detectar a formação de alguns compostos intermediários. Assim, foi-nos possível detectar a formação de dopaminaquinona a 290 nm e de um aminocrómio, o dopaminocrómio a 450 nm.

Estes estudos, realizados a diferentes pH (Fig.2 e 3), permitiram uma razoável caracterização da reacção de autooxidação da dopamina e da consequente formação de neuromelaninas sintéticas.

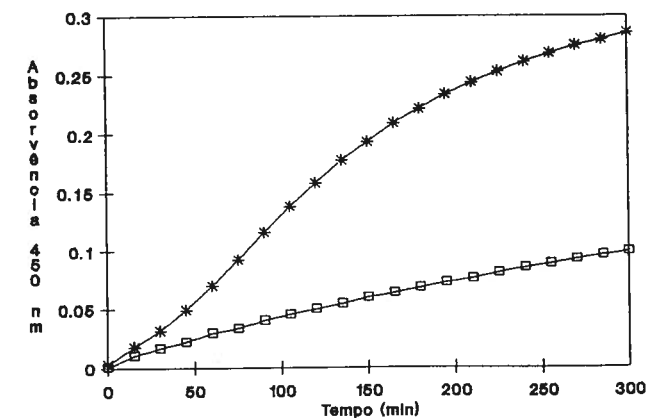
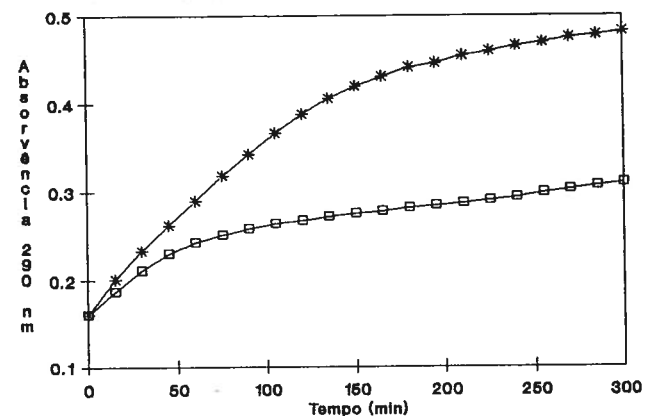


Fig. 2 — Efeito do manganésio na reacção de oxidação não enzimática da dopamina a pH8. Ensaio realizado a 37°C em tampão TRIS 0,2/NaCl 0,15M, pH8 na presença de dopamina 0,1 mM (□) e MnCl₂, 0,01mM(*)

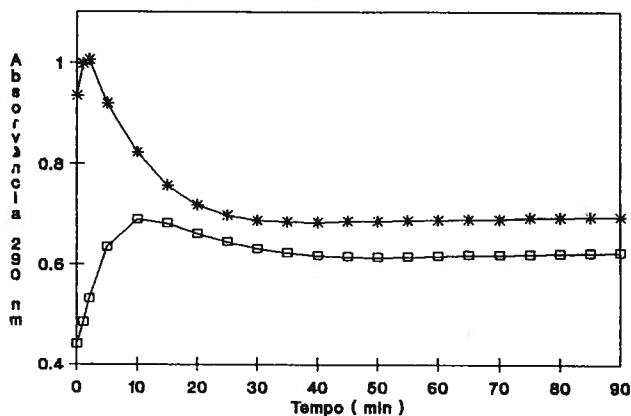
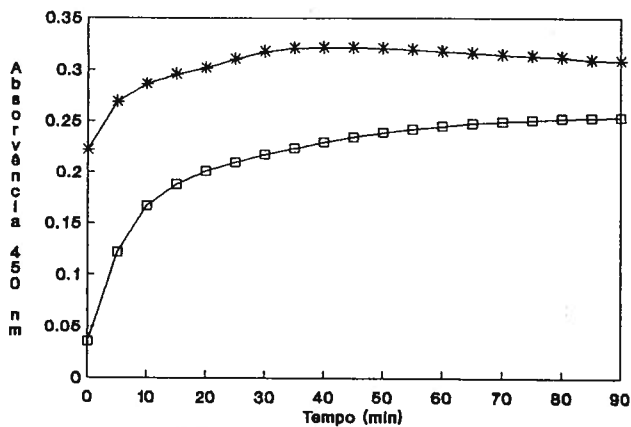


Fig. 3 — Efeito do manganésio na reacção de autoxidação da dopamina a pH10. Ensaio realizado com procedimento idêntico ao da figura 2

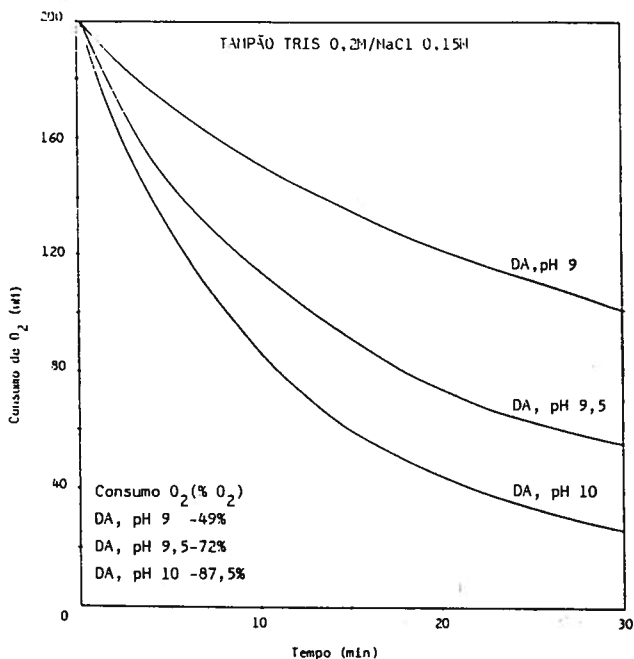
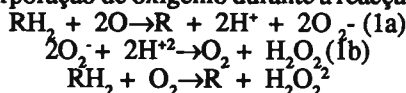


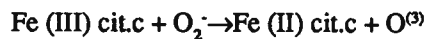
Fig.4-Efeito do pH no consumo de oxigénio durante a reacção de síntese de neuromelaninas. Os ensaios foram realizados a uma temperatura constante de 37°C em tampão TRIS 0.02 M/NaCl 0.15 M.

O consumo de oxigénio da reacção de oxidação da dopamina em tampão TRIS-salino foi estudado a diferentes pH (Fig.4). Verificou-se que a pH 10, este consumo é praticamente total ao fim de 30 minutos, enquanto que a pH 9 e durante o mesmo período de tempo, o consumo de oxigénio é da ordem dos 50% (Quadro 1).

2- Geração de O₂^{•-} durante a síntese de neuromelaninas — O consumo de O₂ durante a reacção de autoxidação da dopamina pode seguir duas vias distintas, uma de redução univalente que leva à formação de radical anião superóxido (1a) e 1b)) e outra de redução divalente que produz peróxido de hidrogénio². Segundo o mecanismo proposto para a síntese de neuromelaninas a partir da dopamina, não existe incorporação de oxigénio durante a reacção (Fig.1).



Se o ferricitocromo c estiver presente, poderá reagir com os radicais superóxido gerados pela via de redução univalente.



Quando presente em quantidades saturantes, o ferricitocromo c pode impedir a parte do consumo total de oxigénio pela via de redução univalente, não interferindo com o consumo de oxigénio pela via de redução divalente¹⁸. Se, para além do ferricitocromo c a SOD estiver também presente, ao catalisar a reacção (b), esta irá competir com o ferricitocromo c para os radicais O₂^{•-}, inibindo o efeito deste no consumo de oxigénio.

A adição de ferricitocromo c 5 mM à solução de dopamina 0.1 mM em tampão TRIS/NaCl, pH 10, provoca uma diminuição do consumo total de oxigénio ao fim de 30 minutos de reacção. Na presença de SOD 120 U/ml, a

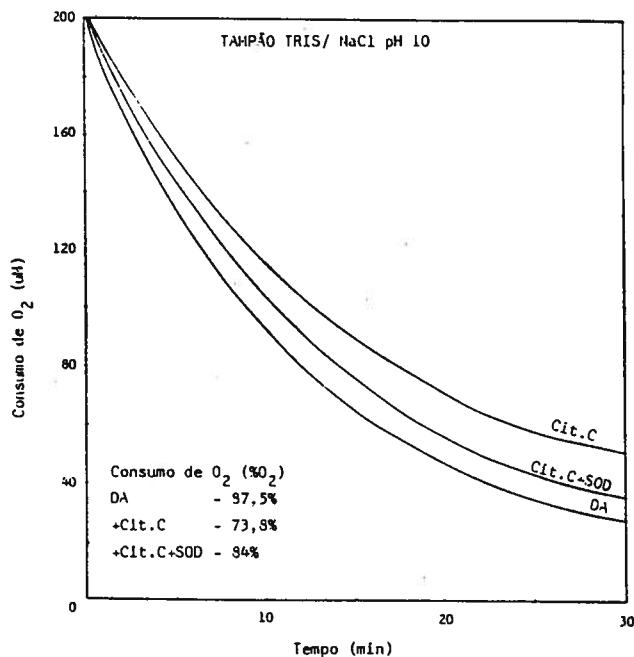


Fig.5-Geração de O₂^{•-} durante a autoxidação da dopamina 0.1 mM em tampão TRIS/NaCl, pH10. A redução do Fe(III)cit.c (5mM) pelo superóxido diminui o consumo total de oxigénio da reacção, sendo este consumo reposto na presença de SOD (120U/ml).

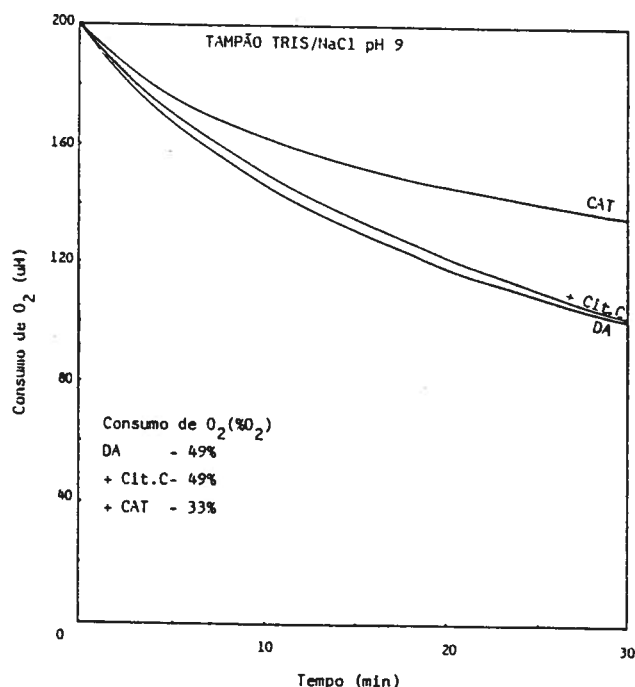


Fig. 6-Detecção da formação de peróxido de hidrogénio (CAT 300U/ml) e de superóxido (Fe³⁺cit.c 20 mM), durante a autoxidação da dopamina 0,1 mM em tampão TRIS/NaCl, pH9

acção do ferricitocromo c é anulada, havendo reposição do consumo total de oxigénio (Fig.5).

A diminuição do consumo de O₂ na presença de Fe(III)cit.c corresponde à fracção do oxigénio que é reduzida pela via univalente e que leva à geração de superóxido.

A adição de Fe(III)cit.c 20 mM à solução de dopamina em TRIS/NaCl, pH 9 não tem influência no consumo total de oxigénio. Assim, nestas condições não existe formação de radical anião superóxido. Em contrapartida, a adição de catalase 300 U/ml ao sistema diminui substancialmente o consumo de O₂ (Fig.6). A catalase inibe metade do consumo de oxigénio pela via de redução divalente (2H₂O₂ → 2H₂O + O₂).

A diminuição do consumo de O₂ na presença de catalase corresponde a metade da fracção do oxigénio que é reduzido pela via divalente e que leva à formação de H₂O₂.
3-Acção do manganésio — O manganésio potencia a autoxidação da dopamina, aumentando o consumo de oxigénio da reacção (Fig.7).

Estas observações estão de acordo com os resultados de Donaldson et al.¹⁴, que verificaram que o Mn²⁺ 10 mM aumentava a autoxidação da dopamina em tampão TRIS 50 mM, pH 7,8, por determinações espectrofotométricas da formação de aminocrómio a 480 nm.

Segundo Archibald e Tyree²⁰, o manganésio é capaz de potenciar a oxidação das catecolaminas, sendo esta acção dependente do seu estado de oxidação. Segundo estes autores, a forma divalente do manganésio é pouco eficaz na oxidação das catecolaminas enquanto que a sua forma trivalente tem um efeito acentuado.

O estudo do consumo de oxigénio da reacção de oxidação da dopamina em presença de iões Mn²⁺, demonstrou que além do manganésio divalente potenciar esta reacção, este

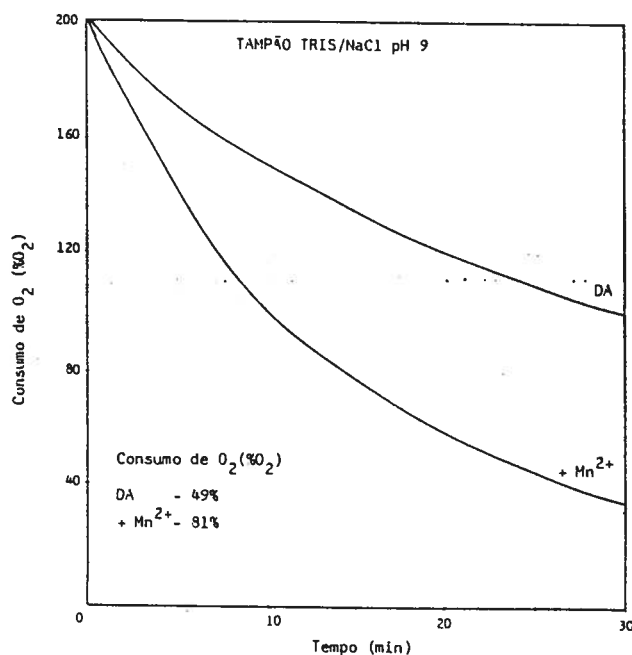
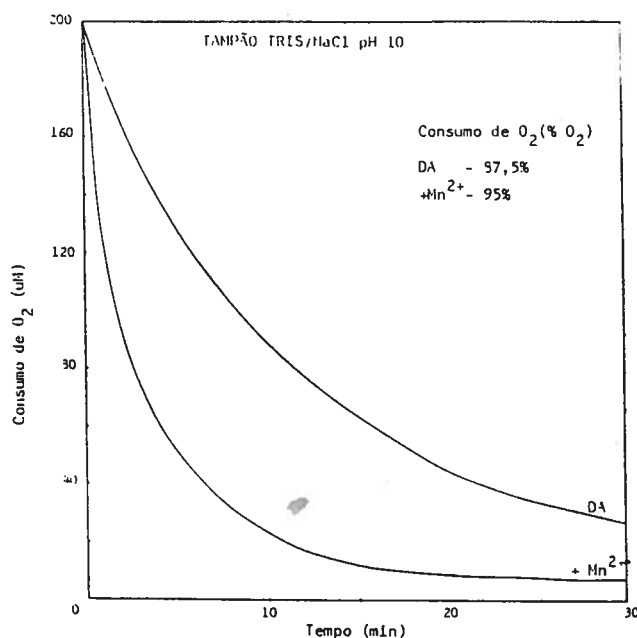


Fig.7 - Acção do manganésio divalente no consumo de oxigénio da reacção de autoxidação da dopamina 0.1 mM em tampão TRIS/NaCl a diferentes pH ([Mn²⁺]=0.01mM).

metal é capaz de estimular a geração de formas activadas de oxigénio, nomeadamente O₂⁻ e H₂O₂ (Fig.8).

A adição de ferricitocromo c 20mM à solução de dopamina e MnCl₂ 0.01mM em tampão TRIS/NaCl, pH 9 diminui o consumo de O₂ da reacção. A adição de SOD a este sistema não tem qualquer acção, não havendo deste modo reposição do consumo de oxigénio pela via de redução univalente. A explicação para este comportamento pode residir no facto de que em presença de elevadas concentrações de ferricitocromo c e SOD, estas duas substâncias possam interagir entre si, havendo inactivação da superóxido dismutase²¹.

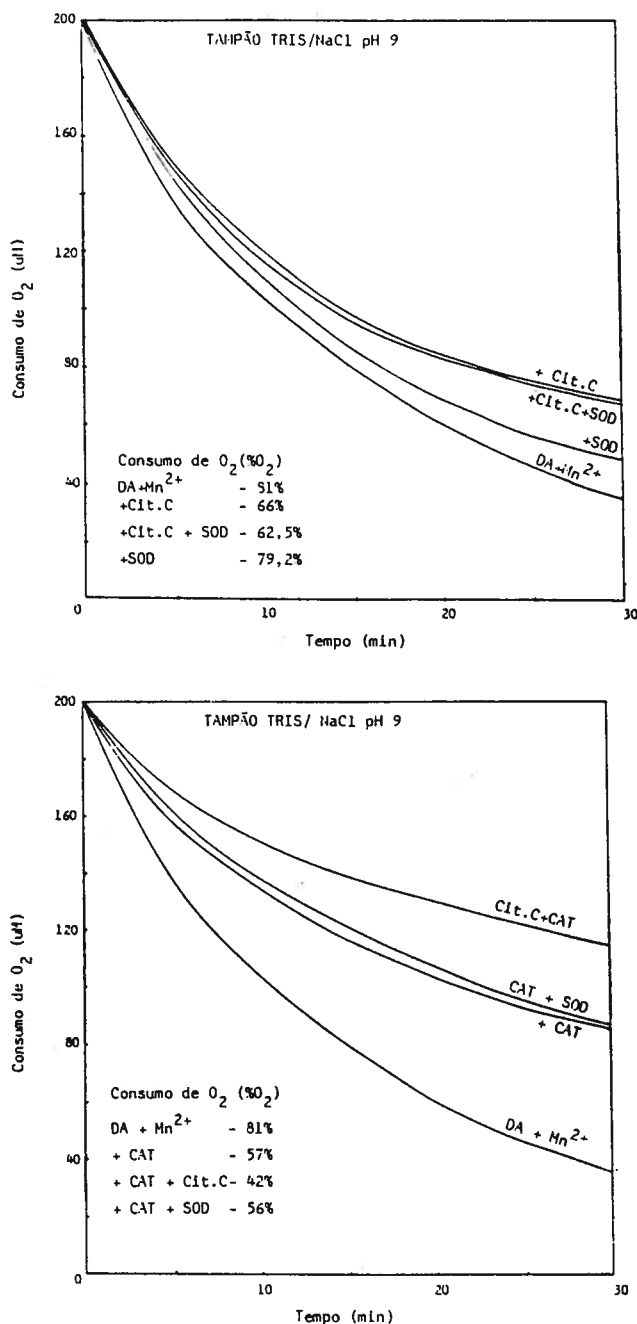
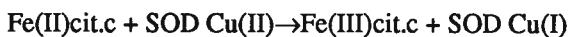


Fig. 8 - Detecção da geração de superóxido e de peróxido de hidrogénio durante a síntese *in vitro* de neuromelaninas na presença de iões manganésio ([Mn²⁺]=0.01mM)



As concentrações de ferricitocromo c utilizadas foram relativamente elevadas, devido a este composto não reagir especificamente com o superóxido, podendo ligar-se a diversos compostos, nomeadamente às quinonas²².

É possível verificar que na presença de Mn²⁺ 0.01 mM, a reacção de oxidação da dopamina em TRIS/NaCl, pH 9 forma superóxido e peróxido de hidrogénio, enquanto que a mesma reacção na ausência de manganésio não origina superóxido (Quadro 2).

Propostas para a acção do Mn²⁺ a nível da oxidação das catecolaminas estão relacionadas com o facto deste metal ser capaz de dismutar o O₂⁻ formando-se Mn³⁺²³. A forma trivalente do manganésio seria capaz de reagir com as catecolaminas, aumentando significativamente a sua oxidação, enquanto que o Mn²⁺ não teria acção directa sobre as catecolaminas²⁰.

Trabalhos realizados sobre a acção do manganésio nas catecolaminas, demonstraram que na presença de SOD seria possível inibir a oxidação da dopamina dependente de Mn²⁺²⁰, uma vez que na ausência de O₂⁻ não se formaria Mn³⁺ e como tal não haveria acção sobre as catecolaminas. A acção da SOD foi testada no nosso sistema através da medição do consumo de oxigénio da reacção da dopamina em presença de iões divalentes de manganésio. Os resultados obtidos demonstram que a SOD não tem qualquer efeito sobre o nosso sistema (Fig.8). Assim, parece que a acção do Mn²⁺ não depende da presença de superóxido e que o seu efeito sobre a oxidação da dopamina é bastante significativo.

DISCUSSÃO

O envenenamento por manganésio ou manganismo foi descrito inicialmente por Couper and Glasgow em 1837 em trabalhadores de refinarias de manganésio. Recentemente, o manganismo adquiriu particular interesse ao se verificar que esta patologia apresenta sintomas extrapiramidais semelhantes aos encontrados no parkinsonismo.

Várias propostas têm sido indicadas como possíveis hipóteses explicativas da toxicidade do manganésio a nível do sistema nervoso central: (a) toxicidade directa do Mn²⁺ ou do manganésio em estados de oxidação superiores¹⁴, para as células dopaminérgicas, (b) aumento da produção de radicais livres de oxigénio, os quais podem atacar a dopamina, as células dopaminérgicas ou os receptores de dopamina^{4,24}, (c) diminuição da actividade da peroxidase e catalase por acção do manganésio, (d) o manganésio catalisa a formação de 6-hidroxidopamina ou de outras catecolaminas tóxicas, que podem levar à diminuição da quantidade de grupos tiólicos com acção protectora^{4,25,26} e (e) o manganésio oxida ou aumenta a autooxidação da dopamina^{14-16,20}, eliminando desta forma este neurotransmissor e aumentando a formação de quinonas citotóxicas.

Estudos realizados por Graham e colaboradores sobre a toxicidade de diferentes polifenóis³, forneceram evidências para a existência de dois modos de acção claramente distintos: (a) produção de radicais de oxigénio durante a autooxidação e (b) produção de espécies quinónicas, que levariam à morte celular por reacção com grupos nucleófilos de proteínas, péptidos, etc. Segundo estes autores a dopamina pode ser tóxica para as células ao actuar preferencialmente segundo o mecanismo (b). A dopamina é a catecolamina que se autooxida mais rapidamente e a que cicliza mais lentamente, sendo as suas quinonas relativamente estáveis⁴.

A habilidade do manganésio para induzir lesões selectivas na *S.nigra* de humanos e primatas pode estar relacionada com as elevadas concentrações de enzimas oxidativas nesta região do cérebro. Segundo Ambani e col.²⁷, a *S.nigra* é a região do cérebro que apresenta uma maior

QUADRO 2 — Acção do manganésio sobre a reacção de autoxidação da dopamina e efeito consequente na geração de superóxido e peróxido de hidrogénio.

	TRIS/NaCl, pH 9		TRIS/NaCl, pH 10	
	$\mu\text{M O}_2$	% O_2	$\mu\text{M O}_2$	% O_2
S.C.+Mn ²⁺ 0.01 mM	173.3±7.28 n=10	81% c.v.=4.2%	203.9±9.05 n=4	95% c.v.=4.4%
	p* < 0.001		p < 0.001	
S.C.+Mn ²⁺ + Fe(III)Citc 20 mM	140.8± 6.6 n=5	66% c.v.=4.7%		—
	p* < 0.001			
S.C.+ Mn ²⁺ + Fe(III)Citc +SOD	120 U/ml 135.9 240 U/ml 141.2 480 U/ml 133.8	63.5% 66% 62.5%		—
	(n=2)			
S.C. + Mn ²⁺ +SOD 360 U/ml	+169.4±6.2 n=3	79.2% c.v.=3.7%		—
S.C. + Mn ²⁺ +Catalase	122±9.6 n=7	57% c.v.=7.9%		—
	p* < 0.001			
S.C. + Mn ²⁺ + Fe(III)Citc + Catalase	89.9	42%		—
	n=2			
S.C. + Mn ²⁺ + Catalase+SOD	119.84±2.78 n=3	56% c.v.=2.3%		—

Nota: p* foi calculado comparando com os resultados obtidos para S.C. + Mn²⁺

actividade da peroxidase, devido à acção da MAO sobre as catecolaminas que resulta em formação de H₂O₂. Uma vez que os iões divalentes de manganésio podem ser oxidados a formas de valência superiores na presença de peroxidases, fenóis e H₂O₂²⁸, uma possibilidade intrigante é considerar que na *S.nigra* existe um ambiente favorável à oxidação do Mn²⁺ a estados de oxidação superiores.

O manganésio apresenta elevada afinidade para se ligar ao oxigénio (Mn²⁺+O₂→Mn³⁺+O₂⁻), além de poder reagir com o peróxido de hidrogénio, com produção de radical hidroxilo (Mn²⁺ + H₂O₂→HO + HO⁻ + Mn³⁺)^{29,30}.

Os nossos resultados demonstraram que na presença de oxigénio, o manganésio é capaz de potenciar a oxidação da dopamina, aumentando a formação de radical anião superóxido e de peróxido de hidrogénio. Torna-se difícil concluir se esta acção resulta da interacção directa dos iões Mn²⁺ ou se estes foram oxidados a formas de valência superiores, mais capazes de actuar sobre a dopamina.

A reacção de autoxidação da dopamina, a pH 9, na ausência de manganésio segue preferencialmente a via de redução divalente do oxigénio, não havendo produção de O₂⁻.

Assim, enquanto que em alguns sistemas biológicos o manganésio pode ter uma acção protectora, ao proceder à dismutação do O₂⁻ e evitando a lipoperoxidação, na *S.nigra* a acção directa dos iões Mn²⁺ ou a sua oxidação a Mn³⁺ aumenta a oxidação da dopamina, da qual resulta um aumento significativo de formas activadas de oxigénio e de quinonas citotóxicas. Nestas condições, o excesso de radicais livres pode resultar num aumento da lipoperoxidação e na destruição das células dopaminérgicas.

BIBLIOGRAFIA

- BARDEN, H., J.: *Neuropathol. Exp. Neurol.*: 1969, 28: 419-441
- GRAHAM, D.G.: *Arch. Pathol. Lab. Med.*, 1979, 103: 359-362
- GRAHAM, D.G.: Tiffany, S.M., Bell, W.R., Gutknecht, W.F.: *Mol. Pharmacol.* 1978; 14: 644-653
- GRAHAM, D.G., *MOL. Pharmacol.*, 1978, 14, 633-643
- Kalyanaraman, B., Premovic, P.I., Sealy, R.C., *J. Biol. Chem.*, 1987; 262: 11080-11087
- BINDOLI, A., RIGOBELLO, M.P., DEEBLE, D.J.: *Free Rad Biol Med.*: 1992; 13: 391-405
- SEALY, R.C., FELIX, C.C., HYDE, J.S., SWARTZ, H.M.; in: *Free Radicals in Biology*, ed. William A. Pryor. New York, Academic Press. 1980. Vol. IV, pp. 209-259.
- SICHEL, G., CORSARO, C., SCALIA, M., DIBILIO, A., BONOMO, R., *Free Rad. Biol. Med.*, 1991; 11, 1-8
- KORYTOWSKI, W., HINTZ, P., SEALY, R.C., KALYANARAMAN, B.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1985, 131, 659-665
- COHEN, G. J. *Neural Transmission, Suppl.* 1983; 19, 89-103
- Mena, I., Marin, O., Fuenzalida, S., Cotzias, G. *Neurology*, 1967; 17, 128-136.
- LANGSTON, J.W., BALLARD, P., TETRUD, J.W., IRWIN, I.: *Science*, 1983; 219: 979-980
- BURNS, R.S., CHIUEH, C.C., MARKEY, S.P., EBERT, M.H., JACOBOWITZ, D.M., KOPIN, I.J. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; 1983; 80: 4546-4550
- DONALDSON, J., MCGREGOR, D., LABELLA, F., *Can J. Physiol. Pharmacol.* 1982; 60: 1398-1405
- POIRIER, J., DONALDSON, J., BARBEAU, A.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1985; 128: 25-33
- POIRIER, J., DALLAIRE, L., BARBEAU, A., In: *Free Radi-*

cals, Cell Damage and Disease, ed. Catherine Rice-Evans London, Richelieu Press 1986: pp. 273-293.

17. MARINHO, C.R., MANSO, C.F.: Arquivos Portugueses das Ciências Biológicas, Tomo XXV, 1991: 117-123

18. FRIDOVICH, I.J. Biol. Chem., 1970; 245: 4053-4057

19. MASON, H.S.J. Biol. Chem., 1948, 172; 83

20. ARCHIBALD, F.S., Tyree, C., Arch. Biochem. Biophys., 1987; 256, 638-650

21. AUCLAIR, C., VOISIN, E., BANOUN, H., In: Oxy Radicals and Their Scavenger Systems. Molecular Aspects, ed. Gerald Cohen and Robert A. Greenwald, Elsevier Biochemical. 1983 pp. 312-315

22. FRIDOVICH, I., In: Handbook of Methods for Oxygen Radical Research, ed. Robert A. Greenwald, CRC Press, Inc. 1985; pp. 213-215

23. ARCHIBALD, F.S., FRIDOVICH, I., Arch. Biochem. Biophys., 1982, 214: 452-463

24. PERRY, T.L., GODIN, D.V., HANSEN, S., Neurosci. Lett., 33; 1982 305-310

25. COHEN, G., HEIKILLA, R.E., J. Biol. Chem.: 1974; 249: 2447-2452

26. ROTMAN, A., DALY, J. W., CREVELING, C.R., Mol. Pharmacol., 1976; 12, 887-899

27. AMBANI, L.M., VAN WOERT, M.H., MURPHY, S., Arch. Neurol., 1975: 32, 114-118

28. KENTEN, R.H., MANN, P.G. Biochem. J., 1950; 46, 67-73

29. COHEN, G. Photochem. Photobiol., 1978; 28, 669-675

30. DEL MAESTRO, R.F., Acta Physiol. Scand., 1980 Suppl. 492, 153-168