

# Estrés oxidativo en el recién nacido y su influencia en la fisiología vascular pulmonar

R. Santiago Gómez, M. Domínguez Salgado, E. Barrios Miras, A. de Andrés González, F. Zaragoza Arnáez  
Centro de Salud Alpes. Área 4. IMSALUD. Madrid

## Resumen

El radical libre es cualquier especie química que contenga uno o más electrones no apareados, y es habitual que las reacciones en las que interviene sean procesos en cadena. Los lípidos, los ácidos nucleicos, los hidratos de carbono y las proteínas son susceptibles al ataque de los radicales libres, que sufren un daño oxidativo *in vivo*, lo que degenera en fenómenos de necrosis o de apoptosis celular. En contraposición a tales sistemas de oxidación, las células cuentan con enzimas y moléculas antioxidantes. Este delicado equilibrio existente en el organismo en condiciones de normoxia entre los mecanismos oxidantes y antioxidantes se define como estrés oxidativo. El desequilibrio de estos sistemas, en particular el estrés oxidativo derivado de un déficit en la maduración de los sistemas antioxidantes en el neonato, participa directa o indirectamente en la génesis de la patología clínica, contribuyendo tanto a la patogenia como al pronóstico. Además, hay condiciones inherentes al recién nacido que incrementan su susceptibilidad al daño pulmonar, convirtiendo al pulmón en un órgano crítico en este proceso de adaptación a la vida extrauterina, sobre todo teniendo en cuenta que la maduración pulmonar continúa durante la etapa posnatal. En cualquier caso, se sabe que los recién nacidos tienen una mayor resistencia a la toxicidad por el oxígeno, posiblemente relacionada con su capacidad para aumentar la concentración de las enzimas antioxidantes. Por todo lo anterior, se concluye que el conocimiento de estas vías de señalización puede contribuir en gran manera al desarrollo de futuros tratamientos; aunque en la actualidad la terapéutica con antioxidantes se está estudiando en modelos experimentales, aún no es una práctica habitual en niños recién nacidos.

## Palabras clave

Recién nacido, radical libre, estrés oxidativo, pulmón

## Definición y características de los radicales libres

Se define el radical libre como cualquier especie química que contenga uno o más electrones no apareados. Los radicales libres pueden reaccionar con otras moléculas de forma muy diversa, donando o captando el electrón no apareado, convirtiéndolas en nuevos radicales libres. Por ello, es habitual que las reacciones en las que intervienen sean procesos en cadena.

## Abstract

*Title:* Oxidative stress in the newborn and its influence on pulmonary vascular physiology

A free radical is any chemical species that has one or more unpaired electrons. These species usually take part in chain reactions. Lipids, nucleic acids, carbohydrates and proteins are susceptible to free radical attack, which produces *in vivo* oxidative damage that degenerates into cellular necrosis or apoptosis. To combat these oxidation systems, the cells are equipped with enzymes and antioxidant molecules. The delicate balance between oxidant and antioxidant mechanisms, which exists in the organism under conditions of normoxia, is defined as oxidative stress. An imbalance in these systems, in particular, oxidative stress derived from a lack of maturity of the antioxidant systems in the newborn infant, participates directly or indirectly in the clinical onset of disease, playing a role in both the pathogenesis and the prognosis. Moreover, there are conditions inherent in the newborn infant that increase his or her susceptibility to pulmonary damage, making the lung a critical organ in the process of adaptation of the infant to extrauterine life, especially since the lung continues to mature after birth. In any case, newborn infants are known to be more resistant to oxygen toxicity, possibly due, at least in part, to their ability to increase antioxidant enzyme levels. Thus, the authors conclude that the knowledge of these signalling pathways may contribute substantially to the development of future treatments. Although, at the present time, antioxidant therapy is being studied in experimental models, it is not yet a routine practice in newborn infants.

## Keywords

Newborn, free radical, oxidative stress, lung

Tan sólo al encontrarse 2 radicales libres cesa el proceso. La molécula de oxígeno diatómico ( $O_2$ ), a pesar de ser una especie con características de radical libre y el más importante oxidante en los organismos aeróbicos, es escasamente reactiva. La reducción que se produce *in vivo* catalizada enzimáticamente transforma el  $O_2$  en superóxido ( $O_2^-$ ) y en hidropéroxido ( $H_2O_2$ ) de forma coordinada y seriada. En presencia de metales de transición, como el hierro o el cobre, ambos radicales generan de manera conjunta el extremadamente reactivo ion hidroxilo

(OH<sup>-</sup>), considerado el radical responsable de la destrucción de muchas importantes biomoléculas. Aunque en la práctica, el hidropéroxido se considera un radical libre, en realidad, al igual que los lipoperóxidos, no lo es, pues no posee electrones desapareados. Ambos tienen una alta tendencia a transformarse en ellos induciendo reacciones oxidativas en cadena, al aceptar fácilmente electrones procedentes de metales reducidos, como el Fe<sup>3+</sup> y el Cu<sup>2+</sup>. Al hidropéroxido, el superóxido y el hidroxilo, que presentan una mayor reactividad que la molécula de O<sub>2</sub>, se les conoce como especies reactivas de oxígeno (ERO).

La respiración mitocondrial, la oxidación peroximal de los ácidos grasos, la acción de las enzimas microsomales dependientes del citocromo P<sub>450</sub>, encargadas de metabolizar productos xenobióticos y los medicamentos, y la actividad de las células fagocitarias durante su ataque a gérmenes patógenos son las principales fuentes de radical superóxido *in vivo*. Las principales fuentes de generación de ERO en los sistemas biológicos se resumen en la tabla 1<sup>1</sup>.

Además de las enzimas asociadas a las membranas, hay otras solubles, como la xantina oxidasa, la adenilato oxidasa, la dihidrorotato deshidrogenasa, la flavoproteína deshidrogenasa y la triptófano dioxigenasa, que pueden generar ERO durante sus respectivos ciclos catalíticos. La xantina oxidasa, de hecho, se utiliza ampliamente para generar O<sub>2</sub><sup>-</sup> en estudios *in vitro* y analizar el efecto de las ERO en diversos procesos celulares. En la membrana plasmática, la fuente enzimática más importante de producción del O<sub>2</sub><sup>-</sup> es la fosfato de dinucleótido nicotinamida-adenina (NADPH) oxidasa fagocítica, que funciona como un sistema de defensa contra los microorganismos<sup>2</sup>. La ciclooxigenasa localizada en la membrana plasmática supone también una fuente primordial de radical superóxido.

Los lípidos, los ácidos nucleicos, los hidratos de carbono y las proteínas son susceptibles al ataque de los radicales libres, sufriendo un daño oxidativo *in vivo*. De esta forma, tras la acción del radical libre, se observa en las células una disrupción de la membrana y una lesión de la carga genética, así como procesos de inactivación enzimática, entre otros, que pueden producir fenómenos de necrosis o de apoptosis<sup>3-6</sup>. El daño inducido por el estrés oxidativo en una célula a través de los mecanismos de peroxidación lipídica se produce por la modificación de las propiedades fisicoquímicas de la membrana, lo que altera su permeabilidad y el control de la homeostasis iónica celular. También se ha descrito en la etiopatogenia de estos cambios de la homeostasis iónica la oxidación de los grupos sulfhidrilo de las proteínas implicadas en el transporte iónico y en la inhibición de la síntesis de ATP. Además, se postula que el estrés oxidativo podría incrementar la concentración de calcio intracelular y activar diversas fosfolipasas y proteasas, lo que conduciría a fenómenos de necrosis o de apoptosis celular.

## Equilibrio oxidativo

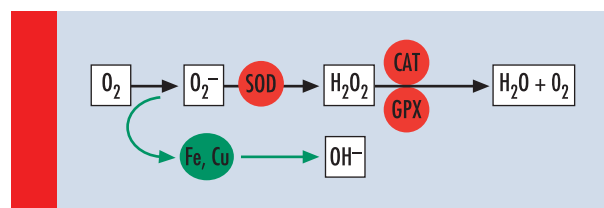
Ante la presencia de tales sistemas de oxidación, las células cuentan con un repertorio impresionante de enzimas antioxi-

TABLA 1

### Principales fuentes de generación de especies reactivas de oxígeno en los sistemas biológicos

Fuente	Localización
Lipoxigenasa Ciclooxigenasa NADPH oxidasa	Membrana plasmática
Sistema de transporte de electrones	Mitocondria
Xantina oxidasa Hemoglobina Catecolaminas Riboflavina Metales de transición (Fe <sup>2+/3+</sup> , Cu <sup>+/2+</sup> )	Citosol y/o medio extracelular
Oxidasa Flavoproteínas	Peroxisoma
Citocromo P <sub>450</sub>	Reticulo endoplásmico

Tomada de Kunsch et al.<sup>1</sup>



**Figura 1.** Sistema de «barredores enzimáticos»: la superóxido dismutasa (SOD) favorece la dismutación del radical superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) a hidropéroxido (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), y la catalasa (CAT) y la glutatión peroxidasa (GPX) convierten el hidropéroxido (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) en agua y oxígeno

dantes, así como de pequeñas moléculas antioxidantes, la mayoría derivadas de la ingesta diaria de frutas o verduras. Entre ellas, destacan las siguientes<sup>7</sup>:

- «Barredores enzimáticos», como la superóxido dismutasa, que favorece la dismutación del radical superóxido a hidropéroxido, y la catalasa o la glutatión peroxidasa, que convierten el hidropéroxido en agua y O<sub>2</sub> (figura 1).
- «Barredores de radicales hidrofílicos», como el ascorbato, el urato y el glutatión.
- «Barredores de radicales lipofílicos», como los tocoferoles, los flavonoides, los carotenoides y el ubiquinol.
- Las enzimas implicadas en la reducción de las formas oxidadas de antioxidantes endógenos, como la glutatión reductasa o la dehidroascorbato reductasa, o las responsables del mantenimiento de los tioles proteicos, como la tioredoxina reductasa.
- La maquinaria celular que mantiene un ambiente de reducción en el interior de la célula, como la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, que regenera la NADPH.

Se define estrés oxidativo como el delicado equilibrio existente en el organismo en condiciones de normoxia entre los mecanismos oxidantes y antioxidantes<sup>8-10</sup>. Las vías de señalización dependientes del estrés oxidativo están presentes en la mayoría de los órganos. El desequilibrio de estos sistemas participa directa o indirectamente en la génesis de la patología clínica. Por ello, el conocimiento de estas vías de señalización puede contribuir en gran manera al desarrollo de futuros tratamientos.

Cuando la producción oxidante excede la capacidad celular antioxidante, las especies reactivas de oxígeno producen el daño celular. El hecho de que este mecanismo se utilice como defensa contra los agentes extraños o con consecuencias nocivas para el propio organismo depende de cada situación y de cada tejido<sup>11</sup>. La presencia de niveles fisiológicos de antioxidantes en el neonato es clave para hacer frente a la acción citotóxica inducida por las especies moleculares oxigénicas (estrés oxidativo) y, por tanto, para el mantenimiento de la homeostasis celular y orgánica. El estrés oxidativo derivado de un déficit en la maduración de los sistemas antioxidantes en el neonato ha sido reconocido como origen de diversos cuadros clínicos<sup>12</sup>. Durante los últimos años la atención se ha centrado en la identificación de antioxidantes naturales del plasma sanguíneo, así como en los parámetros indicativos de los niveles de estrés oxidativo. Además de la reconocida efectividad de los sistemas enzimáticos, como la superóxido dismutasa, la catalasa y la glutatión peroxidasa, y la acción de vitaminas antioxidantes, como la C y la E, se han propuesto como agentes defensivos contra el estrés oxidativo el glutatión reducido, el ácido úrico y la bilirrubina<sup>13</sup>. Se ha descrito también una presencia aumentada de los procesos de peroxidación lipídica y una disminución de la actividad de la superóxido dismutasa en los recién nacidos con retraso del crecimiento intrauterino. Igualmente, en los recién nacidos pretérmino no se ha observado un aumento de la peroxidación lipídica, pero sí una disminución de la superóxido dismutasa y un aumento del glutatión peroxidasa con respecto a los niños control. En los niños con hiperbilirrubinemia se produce un aumento muy significativo de malonaldehído, mientras que los niveles eritrocitarios de glutatión están incrementados. Todos estos resultados indican que algunos trastornos metabólicos del recién nacido se acompañan de alteraciones en el balance proantioxidante, contribuyendo tanto a la patogenia como al pronóstico<sup>14</sup>. Además, de forma experimental se ha demostrado un aumento en los niveles del anión superóxido durante los fenómenos de asfixia-reperfusión, consiguiéndose una inhibición efectiva de su génesis tras la administración de indometacina, y un aumento de éstos tras el aporte de oxipurinol<sup>15</sup>. Se ha estudiado también la interrelación entre el óxido nítrico y las especies reactivas de oxígeno, de gran importancia en la fisiopatología de la hipertensión pulmonar persistente neonatal.

## Estrés oxidativo neonatal

El estrés oxidativo del nacimiento que supone el paso de un ambiente protector, cálido e hipóxico a uno frío y relativamente

hiperóxico reviste unas condiciones especiales en el recién nacido y más aún en el prematuro, debido a su inmadurez anatómica, bioquímica y funcional. Las condiciones inherentes al recién nacido que incrementan su susceptibilidad al daño pulmonar son, entre otras, las siguientes:

- Una distensibilidad disminuida de los espacios aéreos asociada a una alta distensibilidad de las vías respiratorias.
- Un escaso desarrollo de los sistemas antioxidantes y de los sistemas proteasas-antiproteasas.
- Una alteración en los mecanismos de aclaramiento de las vías respiratorias.
- Una disminución del número de macrófagos y de neutrófilos, así como de su función alveolar.
- Un incremento en la permeabilidad de la barrera alvéolo-capilar de forma inversa a la edad gestacional.
- Una deficiencia de los antioxidantes no enzimáticos (vitamina E, betacarotenos, ceruloplasmina,  $\alpha$ -1-antitripsina, cinc, hierro, cobre o selenio) y de los cofactores de las enzimas antioxidantes.

El pulmón es un órgano crítico en el recién nacido en este proceso de adaptación a la vida extrauterina. Dada la urgente necesidad de conseguir una adecuada oxigenación y ventilación en los primeros instantes de vida posnatal, cualquier desequilibrio entre los sistemas antioxidantes y prooxidantes pulmonares puede producir un fracaso en su adaptación a la vida extrauterina<sup>16</sup>. Entre las alteraciones morfológicas generadas directamente por la toxicidad del oxígeno en el territorio pulmonar destacan las siguientes: la inhibición de la septación y de la alveolización, el colapso alveolar, el engrosamiento septal, el incremento de la línea media alveolar, que constituye alvéolos más pequeños a expensas de sáculos más grandes, la disminución del número total de los alvéolos, el aumento del tejido intersticial fibrótico y la disminución del área de superficie interna de intercambio gaseoso total y por gramo de peso corporal.

Coincide además que en el hombre, al igual que en muchos mamíferos, la maduración pulmonar continúa durante los momentos posnatales, por lo que el estrés oxidativo durante esta etapa del desarrollo puede tener consecuencias fatales<sup>11</sup>. Por ejemplo, el pulmón del recién nacido responde de la misma forma a la hipoxia que el del adulto; sin embargo, puesto que en el primero se están llevando a cabo procesos de diferenciación y crecimiento, puede ser que en él los mecanismos reparadores no sean del todo eficaces, lo que explicaría la presencia de la distorsión morfológica pulmonar y la fibrosis observadas en los niños con hipertensión pulmonar persistente neonatal posthipóxica<sup>17</sup>. Además de esta clara disminución del crecimiento pulmonar, se constata en estas condiciones de alto estrés oxidativo un retraso en la maduración pulmonar, expresado por la gran cantidad de vacuolas lipídicas existentes en las células intersticiales, denominadas lipofibroblastos, cuya función está implicada directamente en la maduración pulmonar, en estrecha colaboración con los neumocitos tipo II<sup>18</sup>. Durante el proceso de

maduración pulmonar, el desarrollo de una red de capilares doble es de vital importancia para la formación de los septos alveolares maduros. En el pulmón inmaduro se observa el septo primario, constituido por una red capilar doble con tejido mesenquimal en su centro. Posteriormente, como consecuencia de los procesos de fusión capilar y de reducción de la masa intersticial del septo, en el pulmón maduro tipo adulto se observa una capa capilar única, en continuidad con el parénquima pulmonar, sobre un centro de tejido fibroso. Esta disposición de tejidos parece ser la óptima para el adecuado intercambio gaseoso alvéolo-capilar. La toxicidad por oxígeno puede alterar todo este proceso de maduración, produciendo un trastorno en el intercambio gaseoso. Por otra parte, el surfactante pulmonar es la principal fuente de enzimas antioxidantes, motivo por el cual tiene un importante papel en la defensa contra la toxicidad por oxígeno. Sin embargo, puede ser alterado o inactivado por mecanismos de oxidación<sup>19</sup>. Entre los cambios bioquímicos identificados como consecuencia de la toxicidad del oxígeno en el territorio pulmonar destacan: la disminución del contenido de ADN, la inhibición de su síntesis y la inhibición de la síntesis de proteínas, colágeno y elastina. Además de los cambios estructurales generados en la pared vascular pulmonar, y en relación con los procesos de crecimiento, las especies reactivas de oxígeno son capaces de modular las respuestas contráctiles de las células musculares lisas, vasculares y pulmonares y producir cambios en la estructura del vaso.

## Sistemas antioxidantes y posibilidades terapéuticas

Las enzimas antioxidantes son el mecanismo defensivo primario más importante frente a los radicales libres. Muchos estudios experimentales ponen de manifiesto la importancia y las variaciones de dichas enzimas en situaciones de hiperoxia, si bien no está claro el papel que ejercen en muchas situaciones clínicas<sup>20</sup>. En la etapa final de la gestación, se produce una elevación de las enzimas antioxidantes fetales, paralela a la maduración del sistema del surfactante pulmonar, como preparación frente al estrés que representa el nacimiento<sup>21</sup>. Después del parto disminuyen los niveles de las enzimas antioxidantes y permanecen estables hasta que finaliza el periodo de crecimiento y de desarrollo pulmonar. Posteriormente, con la edad, se incrementa de nuevo la actividad de estos sistemas enzimáticos y aumenta su capacidad de activación en condiciones de hiperoxia, lo que confiere cierta tolerancia ante las situaciones de alto estrés oxidativo. Se sabe que los recién nacidos tienen una mayor resistencia a la toxicidad por el oxígeno, posiblemente relacionada con su capacidad para aumentar la concentración de enzimas antioxidantes en respuesta a las altas concentraciones de oxígeno. La inducción de la tolerancia al oxígeno se basa en el incremento de las defensas antioxidantes o en la disminución de la producción de radicales libres. Se ha sugerido que el aumento de producción de radicales libres puede ser más crítico que el otro factor. En cualquier caso, las diferencias respecto a la tolerancia y la susceptibilidad entre

las especies están determinadas por el grado de madurez alcanzado en el momento del nacimiento. Otro factor probablemente implicado en la tolerancia al oxígeno en edades tempranas es la arquitectura lipídica de las membranas celulares. De hecho, los pulmones neonatales tienen mayor cantidad de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) con efecto defensivo frente a la toxicidad del oxígeno en sus membranas celulares, a diferencia de los del adulto, que poseen una mayor cantidad de ácidos grasos saturados.

La prevención del daño pulmonar oxidativo está enfocada a prevenir la generación de radicales libres, tratando de aumentar las defensas antioxidantes y evitar los procesos inflamatorios secundarios al daño por estas especies reactivas. Se han descrito algunas intervenciones terapéuticas: unas aplicadas antes del parto, como los glucocorticoides o la tiroxina, administrados prenatalmente a la madre gestante; otras posnatales, como el surfactante pulmonar exógeno<sup>21</sup>. En la actualidad, la terapéutica con antioxidantes se está estudiando en modelos experimentales y aún no es una práctica sistemática en niños recién nacidos. Se han realizado estudios con superóxido dismutasa con resultados prometedores, y otros con administración de suplementos de vitamina A y E aún no concluyentes. La administración de corticoides posnatales en modelos experimentales, lejos de bloquear la toxicidad producida por los radicales libres, parece actuar desfavorablemente en el desarrollo pulmonar, alterando el proceso de septación alveolar, con la consiguiente reducción de la superficie de intercambio gaseoso, cambios que perduran en el pulmón adulto<sup>22,16</sup>. Quizás el óxido nítrico inhalado, o las posibles dianas terapéuticas derivadas del conocimiento de su vía de señalización intracelular, permitan obtener fármacos capaces de mejorar las defensas antioxidantes o de reducir las prooxidantes; por ejemplo, en los niños con hipertensión pulmonar neonatal, que presentan un evidente desequilibrio en estos sistemas<sup>23</sup>.

## Bibliografía

1. Kunsch CH, Medford R. Oxidative stress as a regulator of gene expression in the vasculature. *Cir Res*. 1999; 85: 753-766.
2. Babior M. NADPH oxidase: an update. *Blood*. 1999; 93: 1.464-1.476.
3. Halliwell B, Gutteridge JMC, Cross CE. Free radicals, antioxidants and human disease: Where are we now? *J Lab Clin Med*. 1992; 119: 598-620.
4. Li J, Billiar TR. The role of nitric oxide in apoptosis. *Semin Perinatol*. 2000; 24: 46-50.
5. Peiro C, Vallejo S, Cercas E, Llergo JL, Lafuente N, Matesanz N, et al. Thapsigargin induces apoptosis in cultured human aortic smooth muscle cells. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2000; 36(5): 676-680.
6. Thannickal VJ, Fanburg BL. Reactive oxygen species in cell signalling. *Am J Physiol*. 2000; 279: 1.005-1.028.
7. Viña JV, Torres MV. Fisiología básica de los radicales libres de oxígeno. *RELAN*. 1999; 1: 148-149.
8. Gitto E, Reiter RJ, Karbownik M, Tan D, Gitto P, Barberi S, et al. Causes of oxidative stress in the pre- and perinatal period. *Biol Neonate*. 2002; 81: 146-157.

9. Vento M. Estrés oxidativo en el periodo perinatal. En: Saez Torma G, Puig-Parellada P, eds. Radicales libres y estrés oxidativo en biomedicina. Importancia y utilidad de los antioxidantes en la prevención de procesos fisiopatológicos relacionados. Valencia: Fundación Valenciana de Estudios Avanzados, 2000; 91.
10. Vento M, Asensi M, García-Sala F, Catalá J, Viña J. Oxidative stress caused by foetal-neonatal transition in humans. *Pediatr Res.* 1995; 38: 460.
11. Saugstad OD. Oxygen toxicity in the neonatal period. *Acta Paediatr Scand.* 1990; 79: 881-892.
12. Smith CV, Hansen TN, Martin NE, McMicken HW, Elliot SJ. Oxidant stress responses in premature infants during exposure to hyperoxia. *Pediatr Res.* 1993; 34: 360-365.
13. Paredes C, Casas E, Marco V, Duarte J, Martínez F, Brines J, et al. Antioxidantes eritrocitarios y peroxidación lipídica en la fisiopatología perinatal. Papel del crecimiento intrauterino, de la edad gestacional y de la hiperbilirrubinemia neonatal. *RELAN.* 1999; Supl 1: 155-157.
14. Böhles H. Pathophysiology of diseases in the newborn caused by reactive oxygen species (ROS). *RELAN.* 1999; Supl 1: 150-154.
15. Pourcyrous M, Leffler CN, Bada HS, Korones SB, Busija DW. Brain superoxide anion generation in asphyxiated piglets and the effect of indomethacin at therapeutic dose. *Pediatr Res.* 1993; 34: 366-369.
16. Frank L. Developmental aspects of experimental pulmonary oxygen toxicity. *Free Rad Biol Med.* 1991; 11: 463-494.
17. Das M, Dempsey EC, Bouchey D, Reyland ME, Stenmark KR. Chronic hypoxia induces exaggerated growth responses in pulmonary artery adventitial fibroblasts: potential contribution of specific protein kinase C isozymes. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2000; 22: 15-25.
18. Deneke SM, Fanburg BL. Oxygen toxicity of the lung: an update. *Br J Anaesth.* 1982; 54: 737-749.
19. Gilliard N, Heldt GP, Loredó J, Gasser H, Redl H, Merrit TA, et al. Exposure of the hydrophobic components of porcine lung surfactant to oxidant stress alters surface tension properties. *J Clin Invest.* 1994; 93: 2.608-2.614.
20. Pedraz C. Estrés oxidativo en el periodo neonatal. Prevención y tratamiento. *RELAN.* 1999; Supl 1: 158-169.
21. Radi R. Biological antioxidant defenses. *Toxicol Health.* 1993; 9: 53-62.
22. Cras TD, Markham NE, Morris KG, Ahrens CR, McMurtry IF, Abman SH. Neonatal dexametasone treatment increases the risk for pulmonary hypertension in adult rats. *Am J Physiol.* 2000; 278: 822-829.
23. Goldstein SA, Czapski G. The reaction of NO with superoxide and OH<sub>2</sub>: a pulseradiolysis study. *Free Rad Biol Med.* 1995; 19: 505-510.