

Niveles de superóxido dismutasa amigdal y eritrocitaria en niños con y sin amigdalitis de repetición

F.J. García Callejo^a, M.H. Orts Alborch^a, A. Morant Ventura^a,
I. Costa Alcácer^b, M.M. Velert Vila^c y L. Blay Galaud^a

^aServicio de ORL y ^bDepartamento de Pediatría. Hospital Clínico Universitario. Valencia.

^cCentro de Investigación. Hospital La Fe. Valencia.

(An Esp Pediatr 2002; 56: 310-317)

Antecedentes y objetivos

El estrés oxidativo de la infección amigdal infantil determina la expresión de antioxidantes locales y sistémicos. Su determinación parece tener valor como marcador de padecimiento amigdal previo a la amigdalectomía, pero permanece desconocida, y es ésta nuestra meta, la evolución de este parámetro en niños intervenidos y seguidos a largo plazo.

Métodos

Se estudiaron 136 niños amigdalectomizados, 46 por hipertrofia amigdal sin infección, y 90 por amigdalitis recurrente. En ellos se midieron concentraciones de superóxido dismutasa (SOD) preoperatoria, así como a los 6, 12, 24 y 36 meses postamigdalectomía.

Resultados

La infección generó concentraciones significativamente mayores que la hipertrofia amigdal en tejido amigdal (223,06 ± 30,46 frente a 156,39 ± 54,05 U/l; $p < 0,001$) y sangre (1.124,91 ± 141,73 frente a 1.007,19 ± 97,03 U/g Hb; $p < 0,001$), existiendo muy buena correlación entre las concentraciones amigdales y eritrocitarias en ambos grupos. El seguimiento a 3 años permitió detectar una progresiva tendencia al descenso en los niveles de SOD en sangre en todos los casos hasta su estabilización. Este estado se alcanza antes en el grupo con hipertrofia amigdal a los 6 meses postamigdalectomía, y a los 2 años en el de infecciones. En cualquier caso, en su seguimiento postamigdalectomía los niños con amigdalitis de repetición siempre mostraron concentraciones de SOD más altas.

Conclusiones

El daño oxidativo en tejido amigdal resulta de la incidencia y gravedad de las infecciones focales, y la anulación de éstas redundan en un descenso en los niveles de SOD que no llegan a la normalización, a modo de registro inmune frente a una agresión oxidativa.

Palabras clave:

Amigdalitis. Enfermedades infecciosas. Infancia. Pediatría. Enfermedades otorrinolaringológicas. Superóxido dismutasa. Estrés oxidativo.

SUPEROXIDE DISMUTASE LEVELS FROM TONSIL AND ERYTHROCYTES IN CHILDREN WITH RECURRENT TONSILLITIS

Background and objectives

Oxidative stress secondary to infant tonsillar infection produces the expression of local and systemic antioxidants. Its determination seems to be useful as a marker of tonsillar suffering before tonsillectomy but is currently unknown. The aim of this study was to determine the evolution of this parameter in tonsillectomized children during a long-term follow-up.

Methods

One hundred thirty-six children underwent tonsillectomy, 46 for tonsillar hypertrophy without infection and 90 for recurrent tonsillitis. Superoxide dismutase (SOD) concentrations were measured before tonsillectomy and at 6, 12, 24 and 36 months post-tonsillectomy.

Results

Infection provoked significantly higher SOD concentrations than tonsillar hypertrophy in tonsillar tissue (223.06 ± 30.46 vs 156.39 ± 54.05 U/l, $p < 0.001$) and in blood (1124.91 ± 141.73 vs 1007.19 ± 97.03 U/gr Hb, $p < 0.001$). There was a strong correlation between tonsillar and erythrocyte concentrations. During the 3-year follow-up, SOD concentrations in blood progressively decreased until stabilizing in all patients. Stabilization was reached at 6 months post-tonsillectomy in the group with tonsillar hypertrophy and at 2 years in the group with in-

Correspondencia: Dr. F.J. García Callejo.
Avda. Archiduque Carlos, 111-114. 46014 Valencia.

Recibido en agosto de 2001.

Aceptado para su publicación en noviembre de 2001.

fection. Children with recurrent tonsillitis consistently showed higher SOD concentrations in blood throughout the follow-up.

Conclusions

Oxidative damage in tonsillar tissue results from the incidence and severity of focal infections. Tonsillectomy reduces SOD levels but, as a consequence of oxidative stress, these do not return to normal.

Key words:

Tonsillitis. Infectious diseases. Infancy. Pediatrics. Otorhinolaryngologic diseases. Superoxide dismutase. Oxidative stress.

INTRODUCCIÓN

La distribución linfocitaria difiere en amígdalas y en sangre periférica, ya que en las primeras es menor la proporción de células T citotóxicas y *natural killer*. Sin embargo, en el círculo linfático de Waldeyer el cociente de células B/T y la relación T4/T8 resultan entre 5 y 8 veces mayor que en el territorio sanguíneo¹. Además, en amígdalas coexisten el paquete linfocitario y el sistema reticuloendotelial, cuya combinación para la presentación de antígenos redundan en la producción de anión superóxido.

Este anión ejerce de molécula oxidante o radical libre con capacidad para aceptar electrones. La actividad oxidante resulta del normal funcionamiento intracitoplásmico, pero también del entorno celular reactivo a inflamación y también del efecto de numerosos xenobióticos, bien porque incluyen radicales libres, bien porque inducen su producción. En cualquier caso, la circunstancia inflamatoria que acontece en territorio amigdalares se desencadena tras la identificación del agente hostil por parte de la célula presentadora de antígenos, lo cual determina el incremento de células T con sobreexpresión de interleucinas 2, 6, 10 e interferón- γ y posterior activación y diferenciación de clones de células B, para finalizar con la opsonización y quimiotaxis polimorfonuclear².

La activación linfocitaria culmina pues en la producción excesiva de moléculas derivadas del oxígeno con efecto oxidante altamente tóxicas para membranas, proteínas y ácidos nucleicos. Esta producción aniónica intenta ser bloqueada mediante agentes catalíticos antioxidantes más o menos específicos del estrés oxidativo cuyo objetivo primordial es el mantenimiento del estado reducido del glutatión celular. Éste dispone de radicales sulfhidrilo con capacidad neutralizadora sobre las especies reactivas derivadas del oxígeno. Uno de los principales agentes catalíticos al efecto es la superóxido dismutasa (SOD), cuya presencia en amígdala está descrita de forma precisa con la función específica de modular los niveles de anión superóxido en el anillo de Waldeyer³. Recordemos que este anión se produce no sólo como respuesta a largo plazo a una agresión externa recidivante, sino también como mecanismo habitual homeostático intraamigdalares^{4,5}.

La estandarización y comercialización de patrones para la valoración de niveles de SOD en humores biológicos permite estimar el estado de afectación oxidativa de un tejido. Su aplicación en amígdalas palatinas puede proporcionar información sobre su funcionalidad, así como aventurar un pronóstico tras la aplicación de un tratamiento inflamatorio, antioxidante, antibiótico, o más aún, quirúrgico de la entidad nosológica que se trate. Proponemos el estudio de los niveles de SOD en población infantil antes y después de la amigdalectomía, estudiados tanto en tejido amigdalares como en eritrocitos, con el objeto de obtener correlaciones y establecer eventuales protocolos de comportamiento en el niño con un proceso amigdalares.

MATERIALES Y MÉTODOS

Volumen muestral

El tejido amigdalares obtenido perteneció a 136 pacientes intervenidos quirúrgicamente con dos indicaciones: hipertrofia amigdalares sin infección de repetición (HA, n = 46; edad, $7,2 \pm 5,1$ años) y amigdalitis aguda de repetición en número superior a 6 al año (AR, n = 90, edad $6,3 \pm 4,1$ años), incluidos en un estudio observacional longitudinal y prospectivo, no intervencionista. En todos los casos se informó a los padres o tutores mediante entrevistas individualizadas, para obtener su consentimiento en el procesamiento del tejido extraído en la intervención, así como para el seguimiento evolutivo mediante análisis periódicos de sangre periférica. Fueron excluidos de alguna determinación aquellos niños que hubieran padecido episodios infecciosos del entorno otorinolaringológico o hubieran sido sometidos a tratamientos con potencial actividad moduladora del estrés oxidativo en el mes anterior a la extracción de sangre (vitaminas A, C y E, N-acetil-cisteína, antibióticos, antiinflamatorios no esteroideos [AINE], corticoides), y de forma definitiva aquellos diagnosticados de enfermedad inflamatoria crónica o infecciosa específica.

Obtención de los especímenes

Las amígdalas palatinas fueron obtenidas por amigdalectomía convencional bajo anestesia general. Tras su extracción, se colocaron inmediatamente en buffer fosfato salino PBS estéril con penicilina a 100 U/ml y estreptomina a 100 μ g/ml un mínimo de 12 h, evitándose técnicas de conservación mediante formalización o congelación tisular. Se obtuvo de ellas un extracto tisular por homogeneización en vórtex durante 15 min y posterior cizallamiento en una superficie de vidrio. El macerado histiocelular se filtró cuatro veces con gasa de algodón de 2 mm de espesor dejando sedimentar el filtrado durante 15 min según técnica de Neugebauer⁶.

Los linfocitos amigdalares se obtuvieron tras centrifugación por el método de Ficoll-Conray de gradiente de den-

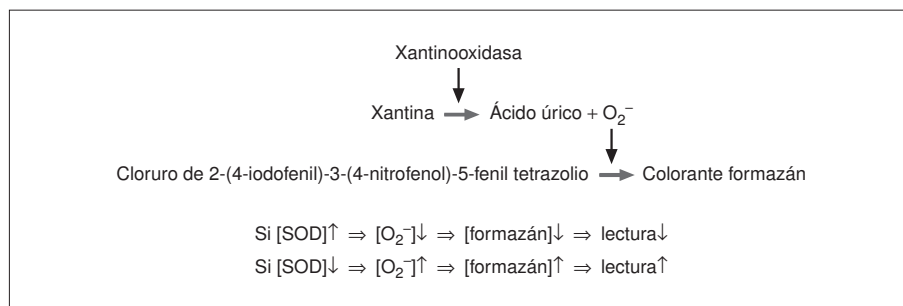


Figura 1. Reacciones acopladas para la determinación espectrofotométrica de la concentración de superóxido dismutasa (SOD) en el kit de trabajo Ransod.

alidad con $d = 1.078$ a 400 g durante 20 min, efectuando después un lavado repetido cinco veces con PBS hasta confirmar a microscopía óptica una proporción de linfocitos superior al 95 %, lo que asegura un volumen de linfocitos viables del orden de 10^7 . El producto celular fue suspendido a una concentración de 10^6 /ml en 2 ml de medio RPMI 1640 enriquecido con suero de ternera fetal al 10 % y 2-mercaptoetanol 5 μ M con penicilina a 100 U/ml y estreptomycin a 100 μ g/ml a 37 °C durante 6 días. Con NH₄-EDTA se evitó la contaminación hemática por hemólisis, previa a la centrifugación.

Las células se cultivaron con mitógenos, como el PMW-pokeweed mitógeno al 1 %, medio de Cowan I de *Staphylococcus aureus* diluido al 1/1.000 y con 100 μ g/ml de extractos de *Streptococcus pyogenes* durante 5 días a 37 °C en una atmósfera con 5 % de CO₂, según método de Ferro⁷. Tras ello se recogió el sobrenadante de los cultivos, el cual resultó estable hasta 7 días a -70 °C.

En todos los casos se obtuvo una muestra de sangre periférica preoperatoria anticoagulada con K₃-EDTA, procesada para la separación de plasma y celularidad hemática, una vez eliminado el *buffy coat* mediante centrifugación selectiva. Esta muestra se empleó en la medida de la concentración de SOD intraeritrocitario. La celularidad hemática debió ser estudiada en menos de 24 h, para lo cual se procedió a su lavado por triplicado con suero salino y solución cianurada de Drabkin, inhibidora de peroxidasa inespecíficas⁸. Esta determinación de la enzima en sangre periférica se repitió en todos los casos en que fue posible en función del consentimiento familiar y la ausencia de criterios de exclusión. Ello se realizó a los 6 meses, al año, y a los 2 y 3 años de la amigdalectomía.

Determinación de SOD

En los sobrenadantes de los cultivos amigdalares y en los eritrocitos de sangre periférica se midió la concentración de SOD mediante espectrofotometría para la lectura a 505 nm de longitud de onda, mediante el kit de trabajo Ransod (Cat N.º SD216) de Randox (Randox Laboratories Ltd., Cruilin Co., Antrim, Reino Unido). Éste detecta un colorante formazán debido a la oxidación que promueve el anión superóxido. Así, si la muestra contiene elevadas concentraciones de SOD, el anión es depurado y apenas

se producirá colorante, y a la inversa. Como el anión superóxido es muy inestable, éste debe ser artificialmente producido *in situ*, lo cual se consigue mediante la oxidación específica de xantinas (fig. 1). Los valores se referenciaron en U/l para el cálculo en sobrenadantes y en U/g Hb para el eritrocitario.

Procesamiento estadístico

Los datos proporcionados hicieron referencia a las concentraciones de SOD en tejido amigdalare y sangre periférica. Con ellos se pudo calcular los valores medios por grupos de estudio, compararlos entre sí y correlacionar los niveles en ambos tejidos. En particular, estos niveles de la enzima en eritrocitos fueron evolucionados a lo largo de 3 años, por lo que pudieron además compararse entre los dos grupos y en un mismo grupo de pacientes en cuanto a incrementos y descensos.

El tratamiento estadístico de los datos se efectuó mediante la prueba de la t de Student y el análisis de la variancia para la comparación de dos o más medias aritméticas. Cuando se correlacionaron dos variables de un mismo volumen muestral se empleó el cálculo e interpretación de las rectas de regresión lineal y los coeficientes de determinación de ajuste R². Los datos se planificaron para gráficos en *Statgraphics* y *Excel* para *Windows 2000*, y formateados en los procedimientos estadísticos t-test, ANOVA-test y Regresión del sistema *SPSS*. Cualquier asociación se consideró estadísticamente significativa si $p < 0,05$.

RESULTADOS

En la tabla 1 se muestran los valores medios de SOD en ambos tejidos y en los dos grupos considerados. El grupo con amigdalitis de repetición siempre evidenció niveles de enzima superiores a los de hipertrofia amigdalare, diferencias que resultaron estadísticamente significativas ($p < 0,001$). En ambos grupos existió muy buena correlación en los niveles entre ambos tejidos (figs. 2 y 3) y también entre amígdala derecha e izquierda (fig. 4).

En el control evolutivo de los pacientes se pudo objetivar una tendencia generalizada a la disminución en las concentraciones de la enzima estadísticamente significativa tanto en el grupo con hipertrofia amigdalare ($p < 0,01$)

TABLA 1. Niveles de superóxido dismutasa (SOD) en sobrenadante de cultivo amigdal y eritrocitos de sangre periférica. Ecuaciones de las curvas de regresión lineal relativas a la correlación de concentraciones en los dos grupos

Grupo	SOD amigdal (U/l)	SOD eritrocitos (U/g Hb)	Correlación SOD eritrocitos/amigdal
Hipertrofia amigdal (n = 46)	156,391 ± 54,051	1.007,195 ± 97,037	$Y = 1,703x + 740,87$ $R^2 = 0,8998^*$
Amigdalitis de repetición (n = 90)	223,066 ± 30,459*	1.124,911 ± 141,730*	$Y = 4,511x + 118,65$ $R^2 = 0,9399^*$

*p < 0,001.

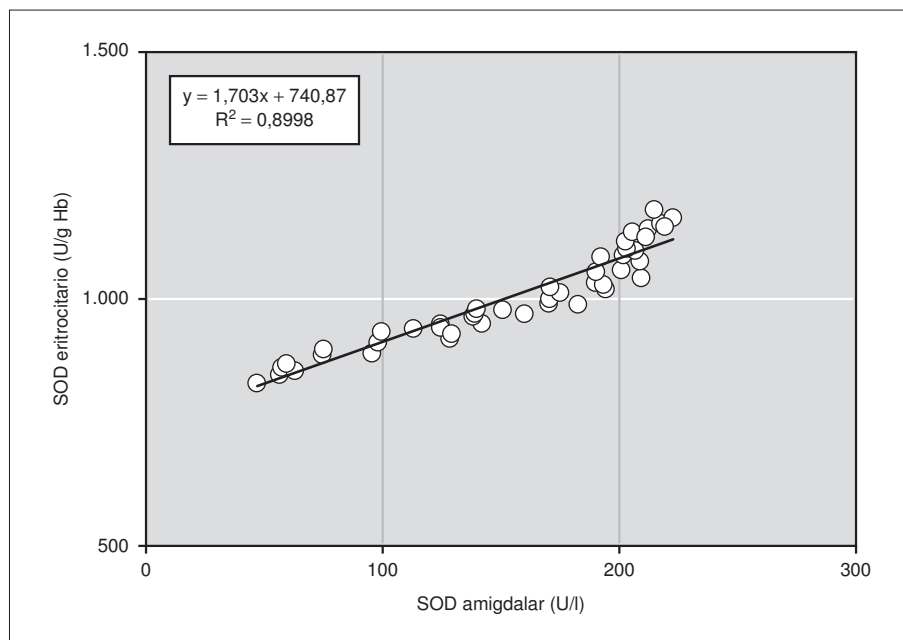


Figura 2. Gráfica y ecuación de la recta de regresión lineal entre las concentraciones de superóxido dismutasa (SOD) eritrocitaria y amigdal en el grupo con hipertrofia amigdal (n = 46; $R^2 = 0,8998$; $p < 0,01$).

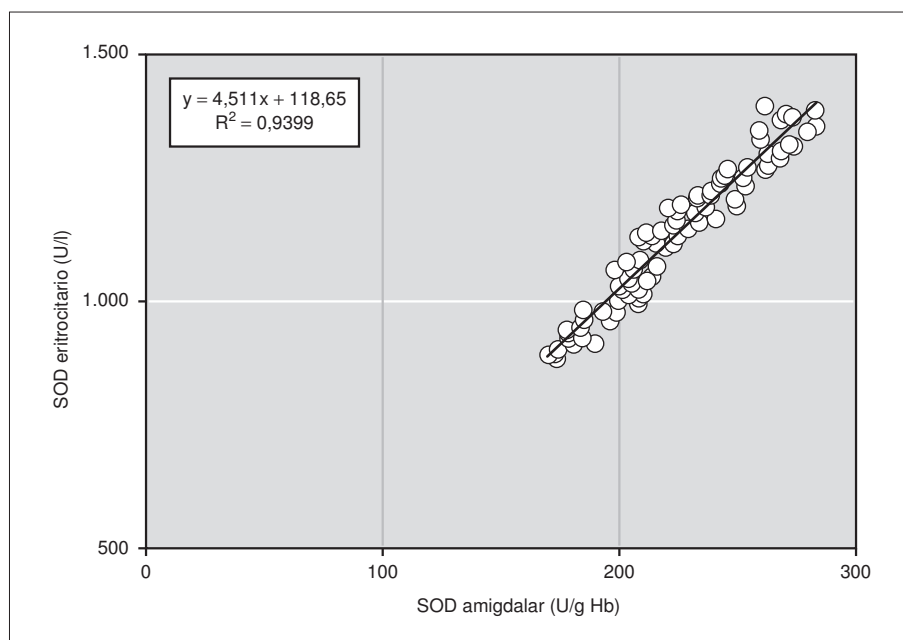


Figura 3. Gráfica y ecuación de la recta de regresión lineal entre las concentraciones de superóxido dismutasa (SOD) eritrocitaria y amigdal en el grupo con amigdalitis de repetición (n = 90; $R^2 = 0,9399$; $p < 0,001$).

como en el de amigdalitis de repetición ($p < 0,01$), si bien en este último el descenso resultó más discreto (fig. 5). Entre los casos con hipertrofia amigdal las concentra-

ciones eritrocitarias se estabilizaron a partir de la segunda determinación practicada, a los 6 meses de la intervención, ya que luego no se detectaron diferencias con sig-

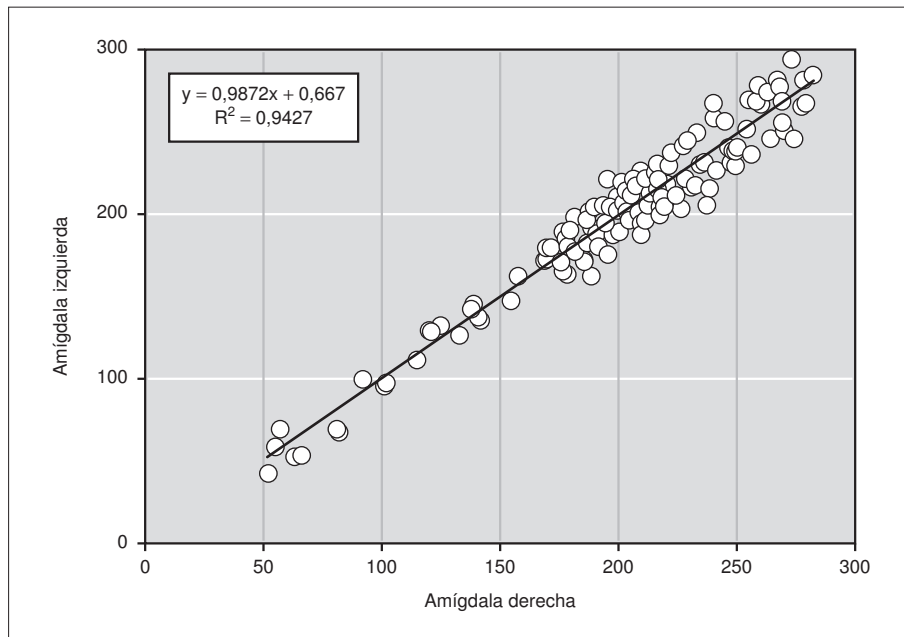


Figura 4. Gráfica y ecuación de la recta de regresión lineal entre las concentraciones de superóxido dismutasa (SOD) amigdalares en amígdala derecha e izquierda ($n = 136$; $R^2 = 0,9427$; $p < 0,001$).

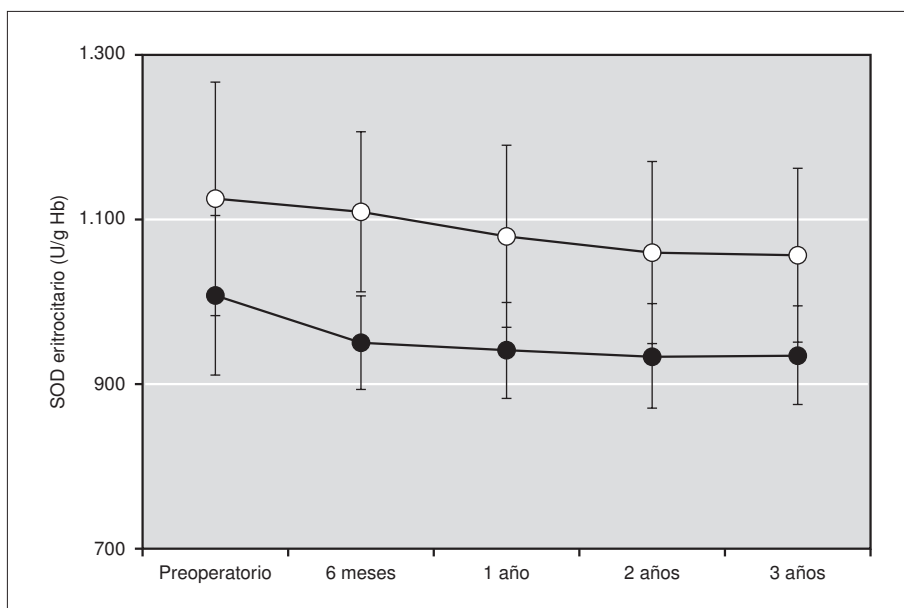


Figura 5. Evolución en el tiempo de las concentraciones de superóxido dismutasa (SOD) eritrocitario en ambos grupos de pacientes (● = hipertrofia amigdalares; ○ = amigdalitis de repetición).

nificación estadística. Entre los niños con hipertrofia amigdalares esta estabilización parece acontecer a lo largo del segundo año tras la amigdalectomía. En todos los momentos en que se efectuaron las determinaciones (preoperatorio, a los 6 meses, al año, a los 2 y a los 3 años) los valores de SOD eritrocitaria resultaron siempre significativamente superiores en el grupo con hipertrofia amigdalares ($p < 0,001$).

DISCUSIÓN

El estrés oxidativo como factor etiopatogénico en patología faringoamigdalares es un acontecimiento previa-

mente documentado. En oído medio está reconocida la elevación en los niveles de SOD en exudados acelulares obtenidos tras miringocentesis⁹. Además, la inoculación de neumococos en la caja y trompa de ratas Wistar genera la sobreproducción enzimática previa a la sintomatología infecciosa¹⁰. Sin embargo, la modulación de la expresión de SOD en mucosa del oído es un fenómeno aún hoy poco conocido. Ovesen sólo detecta aumento de su expresión en ésta en niños con otitis serosa cuando ha sido tratada mediante un drenaje transtimpánico, y lo relaciona a la hiperoxia secundaria a la evacuación de la caja¹¹, aunque Parks detecta similares circunstancias en

otitis experimentales en cobayas provocadas por inoculación de *Streptococcus* sp.¹².

La sobreexpresión de la enzima en mucosa del entorno otorrinolaringológico está igualmente reconocida en patología sinusal crónica¹³. En la nasofaringe el perfil de la SOD en mucosa evoluciona de forma similar en infecciones por *Haemophilus influenzae* tipo b, pero estos incrementos no son objetivados en la infección estreptocócica¹⁴.

En amígdalas existe también disparidad de opiniones y resultados. Nuestro grupo ha observado ya que el padecimiento infeccioso amigdalár tiende a generar elevaciones en la producción de SOD focal, ya que los incrementos detectados en amígdalas con episodios infecciosos recurrentes son significativamente superiores a los de tejido amigdalár sano, y aún mayores en caso de absceso periamigdalino^{5,15}. Hallazgos similares documentan Shukla en adolescentes^{16,17} y Lee en modelos murinos tras inoculación de *Streptococcus pneumoniae*¹⁰. Yokoyama sin embargo no detecta especial correlación entre la amigdalitis crónica o recurrente infantil y las titulaciones sanguíneas de SOD cuando la infección está generada por *S. pyogenes*, lo cual atribuye al efecto depresor de la expresión por parte del ácido lipoteicoico de superficie, acaso propiedad específica del estreptococo del grupo A de Lancefield^{18,19}.

La SOD es en realidad un conjunto de metaloproteasas catalíticas dismutadoras del anión superóxido hacia peróxido de hidrógeno. Supone pues un mecanismo inicial de destoxificación o depuración de especies reactivas derivadas del oxígeno. Ello impide la potencial peroxidación tisular dependiente del anión, aunque su acción no es más que el desencadenante inicial de un ciclo de oxidación y reducción del glutatión, molécula portadora de enlaces sulfhidrilo, de los que obtiene átomos de hidrógeno para formar agua orgánica y anular radicales libres secundarios. La elevación en un tejido de esta actividad enzimática parece razonablemente secundaria a un reto infeccioso focal.

Este estudio evidencia elevaciones en los niveles de SOD amigdalár de forma correlativa al estado de sufrimiento oxidativo en este tejido, es decir, a la incidencia de episodios infecciosos. Nuestra investigación confirma en un adecuado volumen poblacional la estrecha correlación con los niveles de la enzima eritrocitaria en la infancia ya observada previamente. Resulta también válida la medida de SOD en una muestra biopsica tomada bajo anestesia local¹⁵, pero este acto resulta a menudo rechazado por su aparatosidad en niños y tutores, si bien debe resaltarse la ausencia de complicaciones en su realización.

En cualquier caso, el concepto de estrés oxidativo y de monitorización del daño amigdalár mediante la medida de la SOD no es nuevo. En 1996, Lai et al³ identifican la especial distribución en la expresión en amígdala de

la enzima, cuya forma predominante, la asociada a manganeso, se localiza en las mitocondrias del paquete celular linfoide extrafolicular y de las criptas, a modo de protección de los centros germinales. Shukla confirma además la eficacia terapéutica de medidas antioxidantes como el tocoferol y la N-acetil-cisteína en la amigdalitis crónica y recurrente cuando se comparan con la amigdalectomía²⁰. La misma administración de SOD por vía sistémica redundaría en la mejoría clínica de los pacientes con xerostomía y mucrofibrosis faringoamigdalár radioinducida²¹⁻²³, así como en procesos inflamatorios inespecíficos^{24,25}. Además, están reconocidos mecanismos de acción del glutatión y la N-acetil-cisteína semejantes al promover la expresión de interleucina-2 con elevación de la resistencia a la apoptosis celular en amígdalas, así como al deprimir la síntesis de interleucina-4 por las células T colaboradoras^{26,27}, de lo que se deduce la capacidad reguladora de la oxidación amigdalár por la N-acetil-cisteína gracias a su similitud estructural al glutatión. Está identificado asimismo el déficit de cinc en plasma en los niños con amigdalitis de repetición respecto a controles sanos, lo cual se subsana con suplementos del oligoelemento, y se previene con la asociación de tocoferol y ácido ascórbico, ya que, según Onerci, ello redundaría en la activación de la forma de SOD asociada al cinc²⁸.

El sufrimiento amigdalár parece así comprobado mediante valoraciones de SOD focal o incluso en sangre periférica. Ello permite aprovechar la estimación de esta medida como parámetro indicador de la necesidad de amigdalectomía ante la sospecha de insuficiencia funcional de este tejido. Este parámetro mostraría mayor eficiencia diagnóstica que las titulaciones de antiestreptolisinas, sometidas a importantes variaciones en sensibilidad y especificidad según el germen generador de infección y la asociación concomitante de enfermedades.

Hasta la fecha existía consenso en cuanto al mantenimiento de los niveles de SOD elevados tras la amigdalectomía^{3,5,17,29}. Se trataba de valoraciones postoperatorias a corto plazo, no superiores a 6 meses. Este estudio permitió objetivar reducciones postoperatorias a lo largo de los 3 años siguientes, y estos decrementos no fueron significativos hasta los 24 meses entre niños que anteriormente padecían amigdalitis repetitiva.

De esta evolución de las cifras de SOD en sangre a largo plazo se deduce el desconocimiento general sobre los valores base en el ser humano de tales concentraciones. La ausencia de infecciones en niños había sido considerada un patrón de normalidad y por lo tanto sus niveles de SOD eritrocitaria podrían representar los niveles de normalidad sobre los que estudiar y comparar cohortes. Así, se tenía la presunción de que estos niveles oscilaban alrededor de las 1.000 y 1.020 U/g Hb en niños diagnosticados de hipertrofia amigdalár no infecciosa que además no presentaban otros episodios inflamatorios crónicos^{5,15}. Sin embargo, la concentración media en es-

tos niños ya intervenidos disminuye con los años de seguimiento. Además, existe la confirmación de que el valor de SOD amigdalares es inferior a medida que la edad del paciente aumenta¹⁵. Esta tendencia al descenso en la expresión de la enzima se establece de forma paralela a como lo hace el glutatión en sangre con el transcurso de los años, lo cual le atribuye un papel similar a éste como marcador biológico del envejecimiento³⁰⁻³².

Ello debe obligar finalmente a equiparar grupos de estudio por indicaciones quirúrgicas y también por edad con el objeto de realizar la mejor valoración del título de SOD en los análisis en sangre periférica en niños. De ello puede concluirse que: *a)* la determinación de SOD permite una estimación aproximada de la capacidad antioxidante sistémica, en la que influye sólo parcialmente la afectación inflamatoria crónica de las amígdalas; sin embargo, en ausencia de otros procesos inflamatorios concomitantes, los procesos infecciosos amigdalares pueden ser monitorizados mediante SOD amigdalares o eritrocitaria; *b)* la utilidad de una sola determinación en sangre para identificar pacientes con padecimiento amigdalares; *c)* la indicación de terapias antioxidantes como alternativas potenciales a la cirugía amigdalares en niños; *d)* la aportación al conocimiento del estrés oxidativo sistémico que aporta esta prueba en el entorno de enfermedad amigdalares, y *e)* la identificación de circunstancias susceptibles de modificar este estado de oxidación en amígdalas, como por ejemplo, la existencia de absceso periamigdalino, la inhalación de humos y contaminantes o la práctica de actos quirúrgicos en el entorno otorrinolaringológico.

BIBLIOGRAFÍA

- López González MA, Sánchez B, Mata F, Delgado F. Tonsillar lymphocyte subsets in recurrent acute tonsillitis and tonsillar hypertrophy. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 1998; 43: 33-39.
- Agren K, Andersson U, Litton M, Funa K, Nordlander B, Andersson J. The production of immunoregulatory cytokines is localized to the extrafollicular area of human tonsils. *Acta Otolaryngol* 1996; 116: 477-485.
- Lai MT, Ohmichi T, Miyahara S, Mori A, Masuda Y. Superoxide dismutases in human palatine tonsils. *Acta Otolaryngol* 1996; (Suppl 523): 120-123.
- Morikawa K, Morikawa S. Immunomodulatory effect of recombinant human superoxide dismutase (SOD) on human B Lymphocyte function *in vitro*. *Cell Immunol* 1996; 172: 70-76.
- García Callejo FJ, Velert Vila MM, Martínez Beneyto MP, Marco Algarra J. Medida de los niveles de superóxido dismutasa en la amigdalitis de repetición. Utilidad práctica. *Acta Otorrinolaring Esp* 1999; 50: 502-504.
- Neugebauer P, Bonnekoh B, Wevens A, Michel O, Mabrie G, Krieg T et al. Human keratinocyte culture from the peritonsillar mucosa. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 1996; 253: 245-251.
- Ferro LM, Weedon HM, Flego LR, Beroukas D, Zola H. An organ fragment culture model to study lymphocyte activation in human lymphoid tissue. *Immunobiology* 1993; 188: 51-61.
- Kraus RJ, Ganther HE. Reaction of cyanide with glutathione peroxidase. *Biochem Biophys Res Commun* 1980; 96: 1116-1122.
- Zalewski P, Sibinska E, Blaszczyk J, Olszewski J, Olszewska Ziaber A, Kedziora J et al. [Oxygen-derived free radicals of granulocytes in the blood of patients with chronic inflammation of the middle ear and palatine tonsils]. *Otolaryngol Pol* 1995; 49 (Suppl 23): 157-159.
- Lee ES, Woo JS, Hwang SJ, Lim HH, Suh HK. Protective role of superoxide dismutase in rat eustachian tubal mucosa against acute otitis media induced by upper respiratory tract infection. *J Laryngol Otol* 2000; 114: 832-836.
- Ovesen T. Implications of middle ear hyperoxia induced by ventilation tubes in otitis media with effusion. *APMIS (Suppl)* 1995; 541-536.
- Parks RR, Huang CC, Haddad J. Superoxide dismutase in an animal model of otitis media. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 1995; 252: 153-158.
- Doner F, Delibas N, Dogru H, Sari I, Yorgancigil B. Malondialdehyde levels and superoxide dismutase activity in experimental maxillary sinusitis. *Auris Nasus Larynx* 1999; 26: 287-291.
- D'Mello RA, Langford PR, Kroll JS. Role of bacterial Mn-cofactored superoxide dismutase in oxidative stress responses, nasopharyngeal colonization, and sustained bacteremia caused by *Haemophilus influenzae* type b. *Infect Immun* 1997; 65: 2700-2706.
- García Callejo FJ, Blay Galaud L, Platero Zamarreño A, Velert Vila MM, Mallea Cañizares I, Marco Algarra J. Detección de patología amigdalares mediante los niveles de superóxido dismutasa. Estudio comparativo por indicaciones quirúrgicas de amigdalectomía. *Acta Otorrinolaring Esp* 2000; 51: 713-718.
- Shukla GK, Mahajan A, Pandey S, Gujrati VR, Vrat S, Mishra SC et al. A study of free radicals and scavenging enzyme in tonsillitis. *Boll Chim Farm* 1996; 135: 635-636.
- Shukla GK, Garg A, Bhatia N, Pandey S, Kaur G, Shukla RN et al. Significance of free radicals in chronic tonsillitis. *Boll Chim Farm* 2000; 139: 103-105.
- Yokoyama Y, Harabuchi Y, Kukuminato Y, Kataura A. [Superoxide production by neutrophils in patients with recurrent tonsillitis]. *Nippon Jibiinkoka Gakkai Kaiho* 1994; 97: 2259-2265.
- Yokoyama Y, Harabuchi Y, Kodama H, Murakata H, Kataura A. Systemic immune response to streptococcal and staphylococcal lipoteichoic acids in children with recurrent tonsillitis. *Acta Otolaryngol* 1996; (Suppl 523): 108-111.
- Shukla GK, Sharma S, Shukla A, Pandey S, Mishra SC, Chandra M et al. Comparative status of oxidative damage and antioxidant enzymes in chronic tonsillitis patients. *Boll Chim Farm* 1998; 137: 206-209.
- Housset M, Baillet F, Michelson AM, Puget K. Etude de l'action de la superoxyde dismutase dans sa forme liposomiale sur des radiofibres mesurables. *Ann Med Interne* 1989; 140: 365-367.
- Delanian S, Baillet F, Huart J, Lefaix JL, Maulard C, Housset M. Successful treatment of radiation-induced fibrosis using liposomal Cu/Zn superoxide dismutase: clinical trial. *Radiother Oncol* 1994; 32: 12-20.
- Ruiz Martín V, Algara López M, Foro Arnalot P, Reig Castillejo A, Valls Fontanals A. Eficacia de la orgoteína en el tratamiento de la fibrosis y xerostomía radioinducidas. *Oncología* 1995; 18: 60-64.
- Michelson AM, Puget K. Aspects médicaux des superoxyde dismutases. *C R Soc Biol Paris* 1979; 173: 380-393.
- Beckmann R, Flohé L. The pathogenic role of superoxide radicals in inflammation: Efficacy of exogenous superoxide dismutase. *Bull Europ Physiopath Resp* 1981; 17 (Suppl): 275-285.

26. Jeannin P, Delneste Y, Lecoanet Henchoz S, Gauchat JF, Life P, Holmes D et al. Thiols decrease human interleukin (IL) 4 production and IL-4-induced immunoglobulin synthesis. *J Exp Med* 1995; 182: 1785-1792.
27. Borregaard N, Jensen HS, Bjerrum OW. Prevention of tissue damage: Inhibition of myeloperoxidase-mediated inactivation of α -proteinase inhibitor by N-acetylcysteine, glutathione and methionine. *Agents Actions* 1987; 22: 255-260.
28. Onerci M, Kus S, Ogretmenoglu O. Trace elements in children with chronic and recurrent tonsillitis. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 1997; 41: 47-51.
29. Hone SW, Moodley S, Donnelly MJ, Fenton JE, Gormley PK, Walsh M. The effect of tonsillectomy on eustachian tube function. *Clin Otolaryngol* 1997; 22: 511-514.
30. Sies H. Biochemistry of oxidative stress. *Angew Chemie* 1986; 25: 1058-1071.
31. Benzi G, Marzatico F, Pastoris O, Villa RF. Relationship between aging, drug treatment and the cerebral enzymatic antioxidant system. *Exp Gerontol* 1989; 24: 137-148.
32. Cutler RG. Antioxidants and aging. *Am J Clin Nutr* 1991; 53: 373-379.