UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE AGUASCALIENTES

FUNDAMENTOS DE ESTRÉS OXIDATIVO CELULAR

Fernando Jaramillo Juárez
Arturo Gerardo Valdivia Flores

UNA INTRODUCCIÓN PARA ZOMBIS

Fundamentos de estrés oxidativo celular

Fundamentos de estrés oxidativo celular

Fernando Jaramillo Juárez
Arturo Gerardo Valdivia Flores

UNIVERSIDAD AUTONOMA
DE AGUASCALIENTES

Fundamentos de estrés oxidativo celular

Primera edición 2016

D.R. © Universidad Autónoma de Aguascalientes
Av. Universidad 940
Ciudad Universitaria
Aguascalientes, Ags. 20131
www.uaa.mx/direcciones/dgdv/editorial/

© Fernando Jaramillo Juárez
Arturo Gerardo Valdivia Flores

ISBN 978-607-8457-80-9

Hecho en México
Made in Mexico

Los autores agradecen a la Universidad Autónoma
de Aguascalientes por el apoyo otorgado
para la publicación de este libro,
a través de su Departamento Editorial.

Índice

Prólogo	11
Introducción	15
Generación de radicales libres	23
Estrés oxidativo y daño a estructuras celulares	43
Estrés oxidativo y enfermedades de humanos	71
Mecanismos antioxidantes de las células	83
Antioxidantes exógenos	99
Funciones celulares de los radicales libres	109
Fuentes de consulta	113

Prólogo

Las células de los mamíferos están expuestas de manera constante a la acción nociva de sustancias oxidantes o radicales libres que se derivan tanto de los procesos bioquímicos celulares, ejemplo: la generación de energía en las mitocondrias, como de la exposición a sustancias exógenas (xenobióticos) y a la radiación, por citar algunos ejemplos.

Los radicales libres son especies químicas con uno o más electrones desapareados, lo que los hace altamente reactivos. Algunos de ellos reaccionan de manera covalente con macromoléculas de las células, como las proteínas, y son llamados compuestos electrofílicos; a su vez, las especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno (ROS y RNS, por sus siglas en inglés) pueden originar reacciones en cadena de tipo

óxido-reducción o redox que conducen a la oxidación de lípidos, proteínas y ácidos nucleicos.

En este contexto, debe señalarse que desde hace décadas se ha acumulado un gran número de evidencias experimentales relacionadas con el daño estructural y funcional que producen los radicales libres sobre las células. Este fenómeno es conocido como estrés oxidativo o estrés oxidante. Para protegerse del estrés oxidativo, los humanos, y en general los organismos aerobios, han desarrollado defensas antioxidantes que incluyen sustancias endógenas (enzimas antioxidantes, glutatión reducido, ácido úrico, etc.) y sustancias exógenas ingeridas con los alimentos, como algunas vitaminas y los flavonoides. Es conveniente subrayar que los antioxidantes de la dieta desempeñan un papel importante en el control del daño oxidativo, ya que funcionan como agentes profilácticos, es decir, ayudan a prevenir la aparición de enfermedades.

El estrés oxidativo, importante área del conocimiento que originalmente fue investigada por químicos, biólogos y físicos, posteriormente fue abordada también por

médicos y profesionales de la salud. Por ello, actualmente sabemos que el desequilibrio persistente entre las sustancias pro-oxidantes y las antioxidantes puede conducir a la aparición de enfermedades crónico-degenerativas, como el cáncer y la hipertensión, así como a la aceleración del proceso de envejecimiento.

Como lo señalan los autores de este libro, el estudio de los radicales libres no debe ser abordado solamente desde una perspectiva patológica, ya que también se deben analizar las importantes funciones que estas sustancias realizan en las células. Ciertamente, las ROS y las RNS son radicales libres que pueden generar efectos benéficos y nocivos. Los efectos benéficos de estas especies generalmente se presentan a concentraciones bajas, ejemplos: son sustancias de defensa contra bacterias y virus al ser liberadas por los neutrófilos (fagocitos) y, además, dilatan o abren los vasos sanguíneos (óxido nítrico), participando con ello en el control de la presión arterial.

El libro *Estrés oxidativo celular* presenta una versión actualizada sobre lo anteriormente descrito y analiza de manera amena los

siguientes tópicos: a) aspectos históricos del estrés oxidativo, b) generación de radicales libres, c) estrés oxidativo y daño a estructuras celulares, d) enfermedades producidas por el estrés oxidativo en los humanos, e) mecanismos antioxidantes de las células, f) sustancias antioxidantes exógenas y g) funciones celulares de los radicales libres. Además, incluye un gran número de figuras para facilitar al lector la comprensión de los conceptos que se describen en cada uno de los apartados. El libro incluye también una extensa bibliografía para quienes quieran profundizar en el tema.

Finalmente, esta obra pretende difundir o dar a conocer los fundamentos del estrés oxidativo celular, entre todas las personas que estén interesadas sobre este tema, sin que necesariamente tengan antecedentes básicos sobre el mismo.

Dr. Arturo Villegas Navarro

Introducción

De manera sencilla y muy atrevida, se puede afirmar que el oxígeno que respiramos ayuda a vivir pero también ayuda a morir. Es decir, el oxígeno molecular (O_2) desempeña papeles contradictorios: uno esencial para la vida y otro como sustancia tóxica. En el primer caso, el O_2 es requerido por las células para la producción de energía, como en la cadena del transporte de electrones de las mitocondrias; en el segundo caso, el O_2 posee toxicidad para el organismo humano, tal como lo describió Priestly en 1775, comparando su efecto nocivo con el de "una vela que se quema"; es decir, si la vela arde más rápido en el O_2 que en el aire, el cuerpo humano también se consume con mayor rapidez en el O_2 puro.

En este contexto, Margaret Briehl (2015), Investigadora del Departamento de

Patología de la Universidad de Arizona-USA, señala que "en ausencia de oxígeno la vida humana se mide en minutos y en su presencia el trabajo normal de las células (metabolismo) genera especies reactivas capaces de generar daño a las células, contribuyendo con ello al envejecimiento y a la aparición de enfermedades" (2015).

Debe recordarse que la oxidación es un proceso químico en el cual un compuesto pierde electrones y se oxida, mientras que otro los gana y se reduce. Este proceso es fundamental para la vida; sin embargo, cuando la oxidación es intensa o prolongada puede aparecer el estrés oxidativo (EO), es decir, un daño celular y el deterioro funcional del organismo producido por los radicales libres.

Conviene señalar que "un radical es una especie química con uno o más electrones desapareados o libres". Los radicales libres (RL) son sustancias inestables y muy reactivas, pues para conseguir su estabilidad reaccionan con moléculas cercanas a las que les sustraen o quitan electrones y las oxidan, generando con ello la aparición de nuevos radicales; esta acción crea una reacción en cadena que daña

a las células, a menos que sea bloqueada por las sustancias llamadas antioxidantes.

Los RL normalmente se generan en diversas rutas metabólicas de las células; ejemplos de ellos son las especies reactivas derivadas del oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) y las derivadas del nitrógeno (RNS). Todos ellos tienen funciones importantes en las células, aunque las ROS son de mucho interés para la medicina y la biología, ya que se ha encontrado que el oxígeno (O_2) causa la mayoría de los procesos oxidativos de las células. Las ROS más conocidas incluyen a los radicales superóxido ($O_2^{\bullet}$), hidroxil ($^{\bullet}OH$) y óxido nítrico ($NO^{\bullet}$).

Asimismo, los RL desempeñan doble función en las células, ya que pueden actuar como sustancias tóxicas o como sustancias benéficas. El delicado equilibrio entre estos dos efectos antagónicos es fundamental para la vida. A concentraciones bajas, las ROS y las RNS ejercen efectos benéficos, ya que participan en la defensa contra las infecciones y como mensajeros en las respuestas de las células; sin embargo, a concentraciones altas, generan estrés oxidativo y daño a las estruc-

turas celulares. Existen enfermedades relacionadas con la generación de RL y el estrés oxidativo, entre ellas se pueden citar: la insuficiencia renal crónica, asma, artritis reumatoide, Parkinson, Alzheimer, cáncer, diabetes, inflamación, hipertensión, etc. (Valko *et al*., 2007; Pham-Huy *et al*., 2008).

En este contexto, desde el inicio del siglo XX, algunos RL fueron conocidos en el área de la química como compuestos intermediarios en las reacciones de sustancias orgánicas e inorgánicas. En el trabajo publicado por Rebecca Gerscham y Daniel Gilbert (1954), se sugirió que los RL podrían ser agentes importantes en los sistemas biológicos, así como especies químicas responsables de procesos nocivos para las células. Gerschman postuló en su teoría lo siguiente:

— Los radicales libres derivados del oxígeno son el mecanismo común de las toxicidades del oxígeno y de la exposición a rayos X.
— El aumento de la presión parcial de oxígeno o la disminución de la defen-

sa antioxidante llevan igualmente al daño celular y tisular.

— La toxicidad del oxígeno es un fenómeno continuo.

La teoría de Gerschman no fue aceptada en esos años, ya que se consideraba que los RL eran demasiado reactivos y tóxicos para existir en los sistemas biológicos en condiciones fisiológicas. Químicamente, el oxígeno era reconocido como un oxidante y la radiación X era identificada como reductora. Adicionalmente, en ese tiempo no había un reconocimiento al trabajo de la mujer en la ciencia (Boveris, 2005); sin embargo, poco después, Denham Harman (1956), luego de realizar estudios bien fundamentados, postuló que los radicales libres podrían participar en procesos fisiológicos, particularmente en el envejecimiento, como consecuencia del daño producido a las macromoléculas de las células. Su hipótesis sobre los radicales libres y el envejecimiento estimuló el desarrollo de muchas investigaciones y contribuyó a establecer el conocimiento sobre estas especies,

de manera particular las ROS y otros radicales que no se derivan del oxígeno.

Posteriormente, se supo que los RL participan como agentes intermediarios en reacciones bioquímicas, en respuestas de las células y en diversas enfermedades. Por ello, a partir de esos años, los términos "estrés oxidante u oxidativo", "daño oxidante u oxidativo", "radical libre" y "antioxidante" se integraron al lenguaje científico y también fueron usados por los químicos, físicos, biólogos y médicos; además, el estudio de los RL y del estrés oxidativo en el área biomédica se desarrolló de manera importante.

Debe señalarse que en condiciones normales, los sistemas antioxidantes de las células neutralizan o minimizan las alteraciones causadas por los RL, debido a que previenen o retardan la oxidación de componentes celulares. Pueden actuar atrapando radicales (como el radical $O_2^{\bullet}$) o activando una batería de proteínas protectoras contra la oxidación. Sin embargo, cuando aumenta la generación de radicales libres y se supera la capacidad protectora de los antioxidantes celulares, aparece el estrés oxidativo u estrés oxidante.

En resumen, la protección de un organismo contra las acciones nocivas de las ROS y RNS involucra la actividad de varias enzimas (catalasa, superóxido dismutasa, glutatión peroxidada, glutatión reductasa, etc.) y de algunas sustancias como el glutatión reducido (GSH), el ácido úrico, las vitaminas E y C, etc. Por lo tanto, la alteración del equilibrio entre la producción de radicales libres y la actividad de los sistemas de protección antioxidante produce estrés oxidativo.

En este libro, se analizan las fuentes celulares de los RL, las reacciones con las estructuras de las células, sus acciones nocivas y benéficas, algunas enfermedades producidas por ellos, así como los mecanismos de protección antioxidante.

Generación de radicales libres

Como ya se señaló, los radicales libres son átomos o moléculas que tienen un electrón libre o desapareado en su orbital exterior, lo que les confiere una configuración muy inestable (Figura 1). Los electrones desapareados proporcionan una gran reactividad a los radicales libres (RL), ya que tienden a capturar un electrón de cualquier molécula disponible para alcanzar su estabilidad electroquímica (Avello y Suwalsky, 2006; Hernández-Rodríguez *et al.*, 2014).

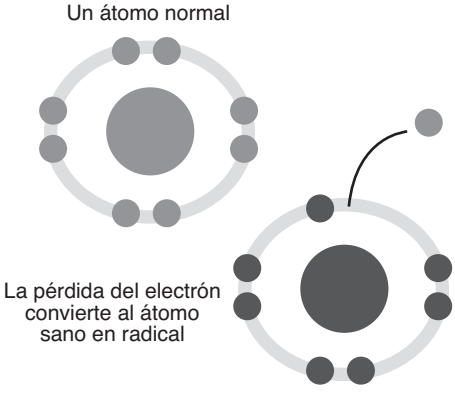

Figura 1. Formación de un radical libre por pérdida de un electrón.

En este contexto, conviene recordar que "la oxidación es un proceso en el que ocurre pérdida de electrones, captación de oxígeno o cesión de hidrógeno (deshidrogenación), mientras que la reducción es el proceso en el cual se captan electrones o se pierde oxígeno". Por ello, todo proceso de oxidación se acompaña de otro de reducción y, por lo tanto, son reacciones de óxido-reducción o reacciones redox entre pares conjugados.

En las últimas décadas, el estudio de los RL y del estrés oxidativo en el área biomédica ha avanzado de manera importante.

Conviene subrayar que las especies reactivas de oxígeno (ROS) y las de nitrógeno (RNS), se producen normalmente en el organismo como productos del metabolismo celular, mediante procesos muy regulados por enzimas como las oxidasas dependientes de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) y la sintasa de óxido nítrico (NOS). Estas especies son de importancia biológica porque participan en diversas funciones de las células, aunque también son agentes nocivos para ellas cuando se producen en exceso (Rahal *et al.,* 2014).

En general, los efectos benéficos de los RL se presentan a concentraciones bajas. Por ejemplo, las ROS participan en los procesos de señalización celular, en la defensa contra microorganismos patógenos y en la inducción de la respuesta mitogénica (división o proliferación celular). A su vez, el efecto nocivo de los RL se puede ilustrar con su capacidad para generar estrés oxidativo o nitrosativo en las células. Esto ocurre en los sistemas biológicos cuando se presenta una producción elevada de ROS (o de RNS), y una disminución o deficiencia de los mecanismos antioxidantes de

las células (enzimáticos y no enzimáticos). Es decir, el estrés oxidativo es el resultado de una alteración del equilibrio entre las reacciones pro-oxidantes y las antioxidantes que se realizan en los organismos vivos. Dicho de otra manera, cuando aumenta la generación de RL hasta un nivel que supera a los antioxidantes celulares, aparece el estrés oxidativo (Valko *et al.*, 2007) (Figura 2).

Si la producción de radicales libres supera la capacidad antioxidante se produce estrés oxidativo y daño celular.

Figura 2. El estrés oxidativo es el resultado de un desequilibrio entre la generación de radicales libres y la capacidad antioxidante de las células.

El exceso de ROS, por incremento de su formación en las mitocondrias o estimula-

ción persistente de las NADPH-oxidasas, daña estructuras celulares como lípidos y membranas, proteínas y al ADN, lo que altera sus funciones normales. A causa de ello, el estrés oxidativo ha sido implicado en diversas enfermedades y en el proceso de envejecimiento. Por ello, el equilibrio fino entre los efectos pro-oxidantes de los RL y los antioxidantes es un proceso muy importante en los organismos vivos, y se realiza por mecanismos conocidos como "homeostasis redox" o "equilibrio redox". Este proceso regulador mantiene la homeostasis óxido-reductora de las células y protege a los seres vivos del daño generado por el estrés oxidativo (Biber *et al.,* 2012). Conviene señalar que el término homeostasis se refiere a la capacidad de los organismos vivos para mantener estable una condición interna.

a) Radicales derivados del oxígeno

Este grupo incluye a las ROS, entre ellas los radicales: superóxido ($O_2^{\bullet}$), peroxilo ($ROO^{\bullet}$), alcoxilo ($RO^{\bullet}$), hidroxilo ($^{\bullet}OH$) y al óxido nítrico ($NO^{\bullet}$). Estas especies son transitorias y su elevada reactividad química puede producir

la oxidación de estructuras de las células. El papel de las ROS en el daño y muerte celular ha sido reconocido paulatinamente. Los radicales $O_2^{\bullet}$ y $^{\bullet}OH$ están involucrados en muchos cambios degenerativos asociados a los procesos oxidativos y a una concentración baja de antioxidantes. Además de las ROS, hay otras especies de radicales importantes, como el oxígeno singulete ($^1O_2$), el ácido hipocloroso (HOCL) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el cual es el principal precursor del radical $^{\bullet}OH$ (Tamagno, 1998; Mayor-Oxilia, 2010).

La adición de un electrón al oxígeno molecular (O_2) genera el radical superóxido ($O_2^{\bullet}$), el cual, como ya se señaló, ha sido implicado en la fisiopatología de diversas enfermedades (Kovacic *et al.,* 2005). Este anión es considerado un radical primario, ya que luego puede interactuar con otras moléculas para generar ROS secundarias, ya sea de manera directa o a través de reacciones catalizadas por enzimas y metales. En la Figura 3 se esquematiza la formación de ROS.

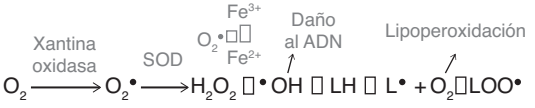

Figura 3. Generación de especies reactivas de oxígeno y daño celular (modificado de Valko *et al.,* 2007). SOD = superóxido dismutasa, LH = ácido graso poliinsaturado de lípidos, $L^{\bullet}$ = radical lipídico, $LOO^{\bullet}$ = radical peroxilo.

Los procesos oxidativos son inevitables en los organismos que dependen del O_2 para vivir. Se calcula que del 1-3% del oxígeno respirado se usa para formar radicales $O_2^{\bullet}$. Al respecto, conviene recordar que la cadena respiratoria de las mitocondrias (transporte de electrones en la membrana interna), es la principal fuente de energía en las células de los mamíferos y produce trifosfato de adenosina o ATP, proceso esencial para la vida (Figura 4). Así, durante la generación de ATP, un reducido número de electrones escapan hacia el oxígeno molecular y forman los radicales $O_2^{\bullet}$. Este radical se produce principalmente a nivel del transporte de electrones (complejos I y III) de la cadena respiratoria.

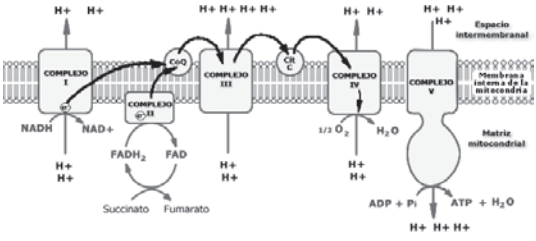

Figura 4.- Cadena respiratoria y síntesis de ATP en las mitocondrias.

Debido a la carga eléctrica de los radicales formados en la cadena respiratoria, difícilmente cruzan la membrana interna de las mitocondrias. Por lo que se ha propuesto que el ADN mitocondrial (ADN-mt) puede ser el mayor sitio del daño producido por las ROS (con repercusiones nocivas en enfermedades crónico degenerativas). Esta propuesta concuerda con estudios realizados en ratones, donde se encontró una correlación entre el nivel de ROS y el daño al ADN-mt del corazón y del músculo esquelético. El daño fue mayor en el corazón, debido a que sus defensas antioxidantes son menores que las del músculo esquelético (Cadenas y Sies, 1998; Esposito *et al.,* 1999; Sarma *et al.,* 2010).

Aunque la carga negativa del radical $O_2^{\bullet}$ limita su difusión a través de las mem-

branas, algunas evidencias señalan que este radical puede ser transportado del interior de las mitocondrias al citoplasma celular a través de canales aniónicos dependientes de voltaje (VDAC, por sus siglas en inglés). Asimismo, el radical $O_2^{\bullet}$ tiene alta afinidad por las proteínas que contienen Fe y grupos tioles en su estructura y, además, reacciona con ellas a velocidades limitadas solamente por su difusión. Esto puede liberar Fe y promover cambios estructurales que alteran la actividad de las proteínas (Winterbourn y Metodiewa, 1999; Han *et al.,* 2003; Briehl, 2015).

Como ya se señaló, la cadena respiratoria mitocondrial es la principal fuente de ROS, aunque existen reacciones óxido-reductoras que se realizan en otros organelos de las células y que son catalizadas por enzimas como la NADPH-reductasa, la citocromo C-reductasa y algunas deshidrogenasas que pueden generan RL (Hernández-Rodríguez *et al.,* 2014). Parte de estos radicales también se producen durante la reacción de moléculas endógenas (como la adrenalina y la dopamina) con el oxígeno; además, el radical $O_2^{\bullet}$ es producido por células del sistema inmune, ya que los fa-

gocitos lo utilizan para destruir organismos extraños como las bacterias. Asimismo, algunas enzimas que participan en el metabolismo intermediario pueden transferir electrones al O_2 y generar radicales $O_2^{\bullet}$ y H_2O_2, ejemplo de ello es la reacción catalizada por la xantina oxidasa para la generación de ácido úrico y especies reactivas de oxígeno. La producción de uno u otro producto es el resultado de las condiciones y composición del medio en el que se realiza la reacción (Waud y Rajagopalan, 1976; Parks y Granger, 1986).

$$\text{Xantina} \xrightarrow{\text{Xantina oxidasa}} H_2O + O_2 \rightarrow \text{Ácido úrico} + O_2^{\bullet} \ (\text{o } H_2O_2)$$

En este contexto, debe señalarse que la xantina oxidasa (XO) y la xantina deshidrogenasa (XD) son formas intercambiables de la misma enzima: la xantina oxidorreductasa (XOR). Esta enzima es una flavoproteína (contiene flavín adenín dinucleótido o FAD) que puede sufrir ciclos de oxidorreducción, en los cuales el O_2 es un sustrato oxidante muy eficiente. En el catabolismo de las purinas, la XOR cataliza la hidroxilación oxida-

tiva de la hipoxantina a xantina, y luego de xantina a ácido úrico. El ácido úrico actúa como un antioxidante potente y secuestrador de radicales libres. Por lo tanto, la XOR tiene funciones importantes en la defensa celular contra el estrés oxidativo. Así, la síntesis de un antioxidante (ácido úrico) y de radicales libres (ROS y RNS) hacen de la XOR un importante regulador del potencial redox de las células (Parks y Granger, 1986; Vorbach *et al.,* 2003).

De interés particular entre las ROS es el radical hidroxil ($^{\bullet}OH$), el cual se genera mediante radiaciones ionizantes, la reacción del oxígeno con el peróxido de hidrógeno o H_2O_2 (reacción de Haber-Weiss) y, posiblemente, en el desarrollo de procesos patológicos. La participación de este radical en los efectos biológicos de las radiaciones y otros fenómenos bioquímicos ha aumentado el interés por el estudio de la toxicidad del oxígeno.

En efecto, desde 1984, Fenton propuso la existencia del radical $^{\bullet}OH$ y sugirió que se formaba como producto de la oxidación del Fe^{2+} al reaccionar con el H_2O_2. El radical $^{\bullet}OH$ es la primera causa de toxicidad, debido

a que es muy reactivo y nocivo, a pesar de que su vida media es extremadamente corta ($1x10^{-9}$ segundos); por ello, in vivo reacciona con las estructuras de las células cercanas al sitio de su formación. Como consecuencia de esto, oxida prácticamente a cualquier componente celular y produce daño oxidativo (Pastor *et al.,* 2000; Briehl, 2015).

En este contexto, el estado redox (óxido-reductor) de la célula es mantenido dentro de límites fisiológicos estrechos y está ligado de manera estrecha y precisa al estado redox del Fe. Se ha sugerido que los mecanismos de regulación del Fe aseguran que éste no se encuentra libre en el interior de la célula; sin embargo, in vivo y bajo condiciones de estrés, el exceso de radicales $O_2^{\bullet}$ libera Fe de moléculas que lo contienen, como las enzimas de la familia deshidratasas-liasas (Valko *et al.,* 2005). El catión Fe^{2+} libre puede participar en la reacción de Fenton, generando al radical $^{\bullet}OH$, como se aprecia en la reacción siguiente:

$$Fe^{2+} + H_2O_2 \longrightarrow Fe^{3+} + {}^{\bullet}OH + {}^{-}OH$$

Asimismo, el radical $O_2^{\bullet}$ participa también en la reacción de Haber-Weiss, en la cual se generan radicales $^{\bullet}OH$ a partir del H_2O_2 (Halliwell y Gutteridge, 1990; Liochev y Fridovich, 2002). El primer paso del ciclo de dos reacciones se produce por la reducción del Fe^{3+} a Fe^{2+}:

$$Fe^{3+} + O_2^{\bullet} \longrightarrow Fe^{2+} + O_2$$

El segundo paso es una reacción de Fenton:

$$Fe^{2+} + H_2O_2 \longrightarrow Fe^{3+} + {}^{\bullet}OH + {}^{-}OH$$

La reacción neta es:

$$O_2^{\bullet} + H_2O_2 \longrightarrow O_2 + {}^{\bullet}OH + {}^{-}OH$$

La catálisis de estas reacciones se ha demostrado con Fe libre en los líquidos corporales y con Fe asociado a la transferrina (proteína que transporta Fe en la sangre), lactoferrina o ferritina (proteína que almacena Fe). Sin embargo, conviene señalar que la producción in vivo del radical $^{\bullet}OH$, median-

te la reacción de Fenton, puede realizarse en presencia de iones de otros metales como el cobre (Cu), cromo (Cr) y cobalto (Co). El níquel (Ni) también puede catalizar esta reacción en presencia de un ligando adecuado, por ejemplo cuando este elemento se une a la histidina (Datta *et al.,* 1991; Kasprzak, 1991).

El daño celular causado por los radicales $O_2^{\bullet}$ y por el H_2O_2, mediante la formación de radicales $^{\bullet}OH$, depende del sitio donde se encuentren los metales con actividad catalítica en la reacción de Haber-Weiss. Por ejemplo, si la reacción ocurre en la proximidad de los lípidos de las membranas, se desarrollará lipoperoxidación, pero si se localizan cerca del ADN, se modificarán las bases o habrá ruptura de la cadena.

Otras ROS que se generan en los seres vivos son los radicales peroxilo ($ROO^{\bullet}$). El más simple de ellos es el radical hidroperoxil o perhidroxilo ($HOO^{\bullet}$), forma protonada del radical $O_2^{\bullet}$, el cual participa en la oxidación de los fosfolípidos de las membranas celulares; además, aumenta el estrés oxidativo por reacciones que conducen a la formación de diferentes ROS y RNS (De Grey, 2002). De acuerdo

a Aikens y Dix (1991), los radicales peroxilo se forman por la actividad oxidativa de otros RL e inician la oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados de las membranas celulares (peroxidación lipídica o lipoperoxidación).

Una fuente adicional de ROS son los peroxisomas, organelos del citosol (citoplasma) ricos en oxidasas, los cuales participan en varias funciones metabólicas de las células. En estos procesos se consume oxígeno y se produce H_2O_2, el cual puede oxidar a las estructuras celulares; sin embargo, estos organelos también contienen catalasa (CAT), enzima que transforma al H_2O_2 en H_2O, la cual previene la acumulación de este compuesto tóxico (H_2O_2) mediante una reacción de dismutación:

$$2H_2O_2 \xrightarrow{\text{CAT}} 2H_2O + O_2$$

De esta manera, los peroxisomas mantienen un equilibrio delicado respecto a las concentraciones o actividades de estas enzimas, para asegurar que no se produzcan ROS en exceso. Cuando los peroxisomas se dañan y disminuyen sus enzimas que consumen

H_2O_2, esta sustancia se acumula en el citosol contribuyendo de manera importante al establecimiento del estrés oxidativo (Schrader y Fahini, 2006). Al respecto, la carencia congénita de CAT produce la enfermedad de Takahara o acatalasemia o acatalasia, la cual se manifiesta por la ausencia de actividad de esta enzima en los glóbulos rojos, y por afecciones de la boca como la gangrena y la pérdida de los dientes.

b) Especies reactivas derivadas del nitrógeno

Estas especies son radicales libres que contienen nitrógeno (RNS) y un elevado potencial oxidativo. Entre ellas se encuentran el óxido nítrico ($NO^{\bullet}$) y el dióxido de nitrógeno ($NO_2^{\bullet}$). Las RNS pueden generar "estrés nitrosante o nitrosativo", lo que ocurre cuando su producción en un sistema biológico es mayor que la capacidad para neutralizarlas y eliminarlas. Este tipo de estrés produce la nitrosilación de las proteínas (adición de un grupo nitrosilo para dar Proteína-N=O), lo que altera su estructura y función; además, las RNS también pueden

nitrosilar las moléculas del ADN provocando, junto con las ROS, ruptura de la cadena de nucleótidos (Figura 5). Cuando el daño nitrosilante es extenso, la célula deja de funcionar y muere por necrosis o apoptosis (Ridnour *et al.*, 2004; Hernández-Rodríguez *et al.*, 2014; Bausal y Kaushal, 2014).

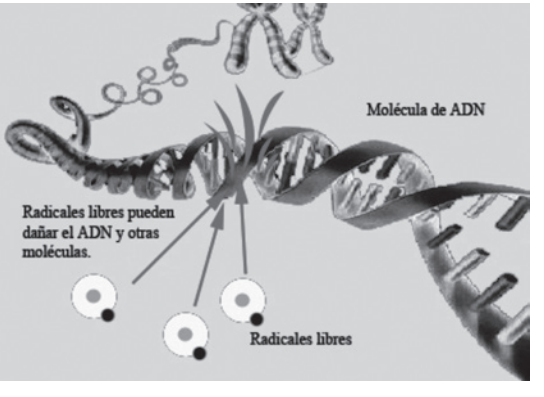

Figura 5.- Daño a la estructura del ADN por ruptura de la cadena de nucleótidos producido por los radicales libres.

Por otra parte, debe señalarse que las células del sistema inmune producen y liberan radicales $O_2^{\bullet}$ y $NO^{\bullet}$ durante el "estallido respiratorio" o "explosión oxidativa" que se presenta en el proceso inflamatorio. Bajo

estas condiciones, el $NO^{\bullet}$ y el radical $O_2^{\bullet}$ reaccionan entre sí produciendo cantidades significativas de una sustancia mucho más oxidante: el anión peroxinitrito ($ONOO^{\bullet}$); el cual, sin ser un radical libre en el sentido estricto de la palabra, genera RL mediante varias reacciones químicas (Gilgun-Sherki *et al.,* 2001; Pacher *et al.,* 2007). El anión peroxinitrito es altamente reactivo y puede dañar la estructura y función de moléculas de las células como los aminoácidos y las enzimas; además, es capaz de inducir la fragmentación del ADN y la oxidación de los lípidos. De esta manera, la toxicidad del $NO^{\bullet}$ está ligada estrechamente a su capacidad para combinarse con los radicales $O_2^{\bullet}$ (Halliwell y Gutteridge, 1990; Carr *et al.,* 2000).

Asimismo, el $NO^{\bullet}$ se une con facilidad a los iones de los metales de transición y, por ello, algunos de sus efectos (ejemplo, la vasodilatación) se ejercen como resultado de su enlace con los grupos Fe^{2+}-Hemo de la enzima guanilato ciclasa (Archer, 1993; Elahi y Matata, 2013). También se sabe que varios metales de transición como el zinc, fierro, cobre, cobalto y manganeso contribuyen a que

diversas rutas metabólicas y de señalización intracelular funcionen de manera adecuada; sin embargo, las propiedades químicas y óxido-reductoras de estos metales les permiten escapar de los mecanismos de control de esos procesos, como la homeostasis y la unión específica a estructuras de las células. El daño de estos mecanismos de control puede conducir a que el metal se enlace con sitios diferentes a los que normalmente se unen en las proteínas o al desplazamiento de otros metales de sus sitios de unión específicos. Además, la actividad biológica de los metales de transición está asociada a la presencia de electrones desapareados, lo que favorece su participación en reacciones de óxido-reducción. Por estos motivos, los metales de transición han sido incluidos en la generación del estrés oxidativo (Valko *et al.,* 2005).

Estrés oxidativo y daño a estructuras celulares

Por su elevada inestabilidad, los radicales libres pueden reaccionar con moléculas de las células quitándoles un electrón, lo que las oxida y conduce a la pérdida de la función celular. La protección de un organismo contra las ROS y las RNS involucra la actividad de varias enzimas antioxidantes como la catalasa (CAT), la superóxido dismutasa (SOD), la glutatión peroxidada (GPX) y la glutatión reductasa (GRd), así como de algunas sustancias endógenas y exógenas como el glutatión reducido (GSH), el ácido úrico, los flavonoides, las vitaminas E y C, entre otros.

El desequilibrio entre el incremento de la producción de radicales libres y la incapacidad o insuficiencia de los mecanismos de protección antioxidante para neutralizarlos,

genera estrés oxidativo o nitrosativo, lo que daña estructuras vitales de las células como los lípidos, las proteínas y el ADN. Esto puede favorecer el desarrollo de enfermedades crónicas como el cáncer, diabetes, asma, artritis reumatoide, etc., así como acelerar el envejecimiento (Dhalla *et al.,* 2000; Uttara *et al.,* 2009; Nowak, 2013).

En este contexto, el papel de las ROS en el daño o muerte celular ha sido paulatinamente reconocido, ya que los radicales $O_2^{\bullet}$ y $^{\bullet}OH$ están involucrados en cambios degenerativos, a menudo asociados con un incremento en los procesos oxidantes en presencia de niveles bajos de antioxidantes (Tamagno *et al.,* 1998). En el Cuadro 1 se resumen las alteraciones que las ROS pueden generar sobre algunas estructuras de las células.

Cuadro 1. Estructuras celulares alteradas por la acción de las especies reactivas de oxígeno (ROS).

Compuesto	Alteración
Lípidos	Oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados de las membranas y orgánulos de las células.
Proteínas	Inactivación de enzimas por oxidación de los grupos sulfhidrilo. Lo mismo ocurre en las proteínas estructurales.
Carbohidratos	Despolimerización de polisacáridos.
Ácidos nucleicos	Hidroxilación de bases, entrecruzamientos y rotura de las bandas del ADN, lo que causa mutaciones e inhibición de la síntesis de proteínas.

Adaptado de Zentella de Piña *et al.,* 1994.

a) Oxidación de lípidos

Entre los mayores efectos nocivos producidos por las ROS se encuentra la oxidación de los lípidos, proceso que induce su desnaturalización y afecta la viabilidad de las células. Los radicales libres pueden desencadenar la oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados de las membranas celulares, por el secuestro de un átomo de hidrógeno de la cadena de metilenos de estas estructuras (—CH=CH—). El radical lipídico

formado reacciona luego con el oxígeno para producir el radical lipoperoxil ($LOO^{\bullet}$).

La oxidación de los lípidos (ácidos grasos poliinsaturados) afecta a las estructuras ricas en ellos, como las membranas celulares y las lipoproteínas. En el primer caso, se altera la permeabilidad, lo que puede conducir al edema y muerte de las células; mientras que en el segundo caso, la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) contribuye a la generación de la placa ateromatosa (acumulación de grasa en la pared arterial) (Birben *et al.,* 2012).

La oxidación de los lípidos por los RL se produce mediante una reacción en cadena, en la que el ácido graso al ser oxidado, se convierte en un radical de ácido graso capaz de oxidar a otra molécula vecina. Este proceso se conoce como "peroxidación lipídica o lipoperoxidación" y genera diversos subproductos, entre ellos el malondialdehído (MDA), cuya determinación en los tejidos, plasma sanguíneo u orina es útil para evaluar el estrés oxidativo. Se ha reportado que la peroxidación lipídica se produce en tres etapas: iniciación, propagación y terminación (Aikens y Dix, 1991). La reac-

ción en cadena (Figura 6) se detendrá cuando dos radicales reaccionan entre sí y produzcan un compuesto que no sea radical o cuando los radicales sean neutralizados por los antioxidantes (Biber *et al.*, 2012).

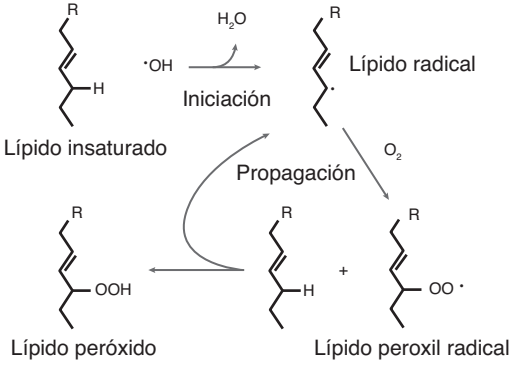

Figura 6. Oxidación en cadena de los ácidos grasos poliinsaturados de las membranas de las células.

Además del MDA, en este proceso se generan otros aldehídos (como el 4-hidroxi-2,3-nonenal), que pueden reaccionar con las proteínas y los ácidos nucleicos, produciendo efectos citotóxicos, genotóxicos y mutagénicos (Mao *et al.*, 1999). Asimismo, los

isoprostanos también son compuestos derivados de la oxidación de lípidos y se producen por la peroxidación del ácido araquidónico. Entre otros tejidos y fluidos corporales, se han encontrado en concentraciones altas en el plasma y en las secreciones respiratorias de pacientes asmáticos. De la misma manera que el MDA, los isoprostanos son utilizados como biomarcadores del estrés oxidativo (Wood *et al.*, 2000).

Como ya se señaló, los organismos vivos producen sustancias antioxidantes que aceleran el proceso de finalización de la oxidación de lípidos de las membranas celulares, al atrapar y neutralizar a los radicales libres, protegiendo con ello a la membrana celular. Así, la prevención de la peroxidación de lípidos es un proceso esencial en los organismos aeróbicos, ya que los productos derivados de este proceso oxidativo pueden dañar al ADN.

En efecto, al disminuir la protección antioxidante, aumenta la peroxidación de lípidos, y los epóxidos formados reaccionan con estructuras de la célula uniéndose de manera covalente al ADN, ARN y a las proteínas. Un epóxido es un compuesto cíclico formado por un átomo de oxígeno unido a dos átomos

de carbono, los que a su vez se unen entre sí mediante un enlace covalente. La peroxidación de lípidos conduce a la citotoxicidad (toxicidad celular), alergia, mutagenicidad y/o carcinogenicidad (generación de cáncer), dependiendo de las propiedades del epóxido. Además, los procesos oxidantes también pueden contribuir a la sensibilización de las células hacia los fármacos (Halliwell y Gutteridge, 1996). Los efectos de la peroxidación lipídica sobre la estructura y función de las membranas celulares incluyen (Drehmer, 2007):

— Disminución del contenido de ácidos grasos.
— Formación de peróxidos lipídicos que estimulan o inhiben enzimas asociadas a las membranas.
— Oxidación de grupos tioles (–SH) que dañan las proteínas membranales.
— Disminución de la fluidez de las membranas.
— Liberación de sustancias reactivas capaces de afectar a otras estructuras de las células.

En resumen, cuando aumenta la formación de RL, éstos reaccionan con macromoléculas de las células y modifican su estructura y función. Las ROS oxidan los ácidos grasos de las membranas celulares, lo que daña su fluidez y permeabilidad; además, pueden alterar la unión de enzimas y receptores a la membrana (Saltman, 1989; Hernández-Rodríguez *et al.*, 2014).

b) Oxidación de proteínas

Brevemente, debe señalarse que las proteínas son moléculas formadas por cadenas de aminoácidos. Desempeñan un papel fundamental para la vida, ya que son imprescindibles para el crecimiento y, además, realizan diversas funciones como: la transportadora, contráctil, enzimática, estructural, transducción de señales, etc. Respecto al daño producido por los radicales libres, se ha descrito que una cantidad importante de proteínas oxidadas se genera en los animales y en cultivos de células, luego de su exposición a diversas condiciones que generan estrés oxidativo como: el humo del cigarro, los rayos X, la hiperoxia (exceso de

oxígeno), el ejercicio forzado, la isquemia-reperfusión de los tejidos, el consumo crónico de alcohol, la activación de neutrófilos, la exposición a sustancias ambientales como el ozono o el herbicida paraquat, etc. (Schuessler y Schilling, 1984; Berlett y Stadtman, 1997).

Bajo las condiciones antes citadas, las ROS y las RNS dañan a las moléculas de las células, siendo las proteínas uno de sus blancos principales. Los radicales libres alteran la estructura de las proteínas mediante diversas reacciones oxidativas que incluyen:

- Ataque a los enlaces insaturados.
- Escisión o rotura de la cadena de polipéptidos.
- Formación de enlaces cruzados y de hidroperóxidos.
- Hidroxilación de anillos aromáticos y de las cadenas laterales de aminoácidos.
- Nitración de aminoácidos (introducción de un grupo nitro, $-NO_2$).
- Oxidación de grupos sulfhidrilo (–SH) y de residuos de metionina.
- Transformación de aminoácidos en grupos carbonilo.

Estas modificaciones de las proteínas conducen a la pérdida de su función (enzimas) y a la inhibición de su degradación; además, su acumulación ha sido identificada en varias enfermedades humanas, en el envejecimiento y en la apoptosis celular. De esta manera, algunos productos de la oxidación de proteínas pueden ser usados como biomarcadores del estrés oxidativo (Ponczek y Wachowicz, 2005; Terrill *et al.,* 2013).

Ampliando lo antes expuesto, las proteínas ricas en algunos aminoácidos (como triptófano, tirosina, fenilalanina, metionina y cisteína) pueden sufrir modificaciones estructurales y funcionales. En efecto, los grupos –SH se transforman en puentes disulfuro (–S–S–), lo que conduce a la inactivación de las enzimas. En el colágeno (proteína que forma fibras), las fibrillas pueden ser rotas por los radicales $O_2^{\bullet}$ y $HOO^{\bullet}$, lo que inicia la acción de las proteasas (hidrólisis de proteínas) y facilita la pérdida de la estructura helicoidal del colágeno. En el caso de las hemoproteínas, como la hemoglobina, el radical $O_2^{\bullet}$ o el H_2O_2 pueden reaccionar con el fierro (Fe^{2+}) del grupo hemo para formar metahemoglobi-

na (hemoglobina con Fe^{3+}) y otros productos de oxidación. La catalasa (CAT), otra hemoproteína importante, es inhibida por el radical $O_2^{\bullet}$, mientras que el H_2O_2 inhibe a la superóxido dismutasa (SOD) citosólica (Holgado *et al.,* 1994; Zorrilla García, 2002; Lushchak, 2007).

Como ya se señaló, el ataque de las ROS sobre las proteínas de las células puede modificar su estructura y función. Este daño aumenta la actividad de los sistemas proteolíticos intracelulares, ya que las proteínas oxidadas son más sensibles a la hidrólisis, proceso en el que los aminoácidos liberados pueden ser reutilizados en la síntesis de nuevas proteínas. Sin embargo, cuando persiste el estrés oxidativo, la capacidad proteolítica de las células es insuficiente e ineficiente frente al gran número de moléculas oxidadas (Berlett y Stadtman, 1997). En estas condiciones, las proteínas oxidadas que no han sido hidrolizadas se unen mediante enlaces hidrofóbicos y forman acúmulos que conducen al funcionamiento anormal de la célula. Un enlace o interacción hidrofóbica es la tendencia que presentan las moléculas no polares para agruparse cuando se encuentran en un medio

acuoso, ya que el agua tiende a comprimirlas hasta que se unen. La Figura 7 muestra las acciones nocivas antes descritas.

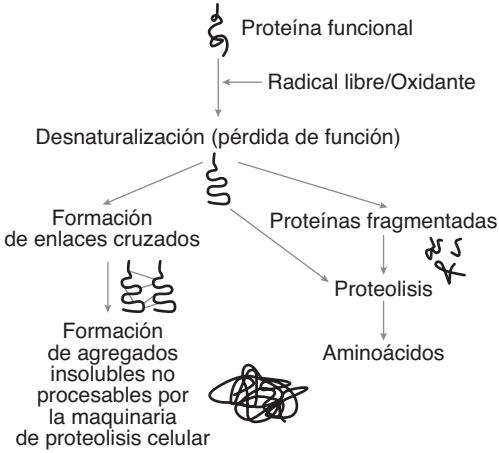

Figura 7. Estrés oxidativo y alteración del proceso de hidrólisis de proteínas oxidadas.

Los mecanismos involucrados en la oxidación de proteínas por las ROS han sido identificados mediante estudios en los cuales los aminoácidos, los péptidos simples y las proteínas son expuestos a radiaciones ionizantes para formar radicales $^{\bullet}OH$ o una mezcla de radicales $^{\bullet}OH/O_2^{\bullet}$. En este proceso, las cadenas latera-

les de aminoácidos de las proteínas se oxidan, particularmente los residuos de cisteína y metionina. Es importante señalar que estos aminoácidos son muy sensibles a la oxidación por casi todas las formas de ROS y las RNS (Schuessler y Schilling, 1984; Stadtman, 2004).

Al respecto, la oxidación de los residuos de cisteína conduce a la formación reversible de mezclas de disulfuros (R-S-S-R*), por la reacción entre los grupos tiol (–SH) de las proteínas y los tioles de peso molecular bajo, en particular el glutatión reducido (GSH). Debe señalarse que la cisteína es un aminoácido muy propenso a la auto-oxidación en presencia de metales. De esta manera, al oxidarse dos cisteínas adyacentes en una proteína, se forman enlaces disulfuro y generan una proteína rígida (Berlett y Stadtman, 1997; Stadtman, 2004).

Asimismo, si los enlaces disulfuro se forman entre dos o más proteínas, producen grandes moléculas inactivas, como por ejemplo, en la unión de enzimas a otras proteínas. De esta manera, se ha encontrado que la alteración del equilibrio tiol/disulfuro disminuye diversos efectos biológicos, incluyendo

cambios en las propiedades cinéticas (Km o Vmax) de algunas enzimas (Andreu *et al.*, 2012; Nagy, 2013). Los grupos disulfuro son los mayores productos de la oxidación de los grupos tiol, los cuales participan de manera importante en los mecanismos de defensa contra el estrés oxidativo y en la regulación redox de la señalización celular (Nagy, 2013).

La oxidación de la metionina a sulfóxido de metionina por los RL es otro proceso oxidativo de las proteínas, catalizado por cationes óxido-reductores (como el Fe^{2+}/Fe^{3+} y el Cu^{+}/Cu^{2+}). Esto altera la superficie hidrofóbica de la proteína oxidada y, por lo tanto, sus propiedades fisicoquímicas. Debe señalarse que la mayoría de los sistemas biológicos tienen reductasas de sulfóxido de metionina, las cuales transforman las formas oxidadas de metionina en su estructura original o forma reducida. Éste es uno de los pocos procesos celulares que reparan la oxidación de las proteínas. De esta manera, dado que en algunas proteínas la oxidación de la metionina se realiza de manera preferente, con poco efecto sobre su función biológica, se ha postulado que el ciclo oxidación-reducción de la metionina

funciona como un sistema que atrapa a las ROS para proteger a las proteínas de alteraciones oxidativas más severas e irreversibles. Por lo tanto, la inter-conversión de metionina y sulfóxido de metionina es útil para regular la actividad biológica de las proteínas, mediante la alteración de la eficiencia catalítica y la modulación de la superficie hidrofóbica (Garrison *et al.,* 1962; Levine *et al.,* 1996; Levine *et al.,* 2000).

Además, los grupos funcionales de las proteínas pueden reaccionar con productos de la oxidación de ácidos grasos poliinsaturados y con sustancias derivadas de los carbohidratos (glicación/glicoxidación) para producir compuestos inactivos. Conviene recordar que la "glicación" es un término que describe la reacción de azúcares del metabolismo, como la glucosa, con aminoácidos de las proteínas, los ácidos nucleicos y los lípidos. Este proceso conduce a la acumulación de productos de la glicación avanzada o AGEs (por sus siglas en inglés). A su vez, la "glicoxidación" es un fenómeno sinérgico entre dos procesos: la glicación y las reacciones oxidativas. Asimismo, respecto al daño oxidativo de las proteínas,

la presencia de grupos carbonilo (R-CO-R´), generada por diferentes mecanismos, es útil para medir la oxidación de estas moléculas por las ROS. La pérdida de los grupos sulfhidrilo de los aminoácidos y la unión de los grupos carbonilo con las cadenas laterales son efectos nocivos de la oxidación de proteínas (Stadtman y Levine, 2003). Al respecto, la oxidación de los grupos –SH de la enzima Ca^{2+}–ATPasa del retículo endoplásmico conduce a su inhibición y, con ello, al daño celular originado por la pérdida de la homeostasis del Ca^{2+}.

Cabe aclarar que la reacción de las proteínas con las ROS puede generar subproductos que aumentan el daño inicial. Además, respecto a la glicación de proteínas, es pertinente señalar que la medición de la hemoglobina glicosilada, proteína de la sangre que reacciona o se une a la glucosa, es una prueba de laboratorio útil para valorar la eficacia del tratamiento farmacológico en el control de la glucemia (azúcar en la sangre) de pacientes diabéticos.

En este contexto, se ha descrito que la acumulación de proteínas oxidadas (carbonilación) se asocia con varias enfermedades

que incluyen: esclerosis lateral amiotrófica, Alzheimer, Parkinson, hipertensión esencial, síndrome de distrés respiratorio (insuficiencia respiratoria), distrofia muscular, formación de cataratas y artritis reumatoide (Schuessler y Schilling, 1984; Berlett y Stadtman, 1997). En el Cuadro 2 se resumen las alteraciones funcionales de las proteínas por la acción del estrés oxidativo.

Cuadro 2. Posibles consecuencias del estrés oxidativo en la función de las proteínas.

Oxidación de proteínas	**Tipo**	**Consecuencias**
Carbonilación	Irreversible	
Nitración	Irreversible	
Formación de enlaces proteína-proteína	Irreversible	Degradación o agregación
Ruptura de enlaces peptídicos	Irreversible	
Unión al glutatión y S-Nitrosilación	Reversible	Protección de cisteínas o regulación de función proteica

Adaptado de Díaz-Acosta y Membrillo-Hernández, 2006.

Ahora bien, el envejecimiento es un proceso que representa el mayor factor de riesgo respecto al desarrollo de patologías crónico degenerativas como el cáncer, alteraciones neurológicas, enfermedades cardiovasculares, etc. Por ello, es evidente que la identificación de los mecanismos moleculares que conducen al envejecimiento sea fundamental para entender muchas enfermedades. En este contexto, se ha propuesto que la oxidación y nitración de proteínas intracelulares, así como la formación de agregados de estas estructuras, representen la causa fundamental de la pérdida de la función celular y la capacidad reducida de humanos y animales viejos para resistir la acción nociva del estrés fisiológico (Squier, 2001).

Asimismo, la restitución de proteínas es un proceso que ocurre en las mitocondrias, el citoplasma y en el núcleo. En las mitocondrias hay enzimas proteolíticas que degradan a las proteínas dañadas. A su vez, en el citoplasma y en el núcleo, las proteínas oxidadas son degradadas por un complejo poli-enzimático. Este sistema reconoce solamente a las proteínas oxidadas para que sean degradadas y

constituye un proceso continuo que actúa durante la vida de las células. Esto puede ser una explicación de la senescencia o envejecimiento, ya que al dejar de funcionar los procesos de renovación celular, existe pérdida de moléculas funcionales para los procesos bioquímicos y fisiológicos (Cynshi y Stocker, 2005).

La importancia de la oxidación de proteínas en el envejecimiento se apoya en la observación de que los niveles de proteínas oxidadas aumentan con la edad. Esta acumulación de proteínas oxidadas puede reflejar aumento en la velocidad de generación de ROS, decremento en la actividad y eficacia de los sistemas antioxidantes o la pérdida en la capacidad para degradar a las proteínas oxidadas (Stadtman, 2006). Debe señalarse que el daño a las proteínas influye de manera importante sobre la viabilidad celular, ya que si no se repara, tiene consecuencias nocivas sobre la estructura y función de las proteínas. Además, las proteínas dañadas y modificadas forman enlaces cruzados y proporcionan una base para muchas alteraciones asociadas con el envejecimiento, contribuyendo con ello a la aparición y desarrollo de diversas patologías.

En este contexto, dos sistemas proteolíticos son responsables de asegurar el mantenimiento de las funciones celulares: el sistema proteosómico y el sistema lisosomal. Conviene subrayar que estos sistemas de degradación proporcionan la última línea de protección antioxidante, al remover a las proteínas dañadas de manera irreversible y reciclar sus aminoácidos para la síntesis continua de proteínas. Sin embargo, durante el envejecimiento, ambos sistemas son afectados y su actividad proteolítica disminuye significativamente.

En síntesis, el aumento de la oxidación de proteínas y el daño en los sistemas proteolíticos conduce a la acumulación de proteínas oxidadas y, finalmente, a la formación de agregados de proteínas no degradables, lo que favorece la aparición de enfermedades crónico degenerativas (Höhn *et al.,* 2013; Höhn *et al.,* 2014; Ott y Grune, 2014).

c) Oxidación del ADN

Como es bien sabido, el ácido desoxirribonucleico (ADN) se encuentra en el núcleo de las células. El ADN contiene la información genética usada en el desarrollo y funcionamiento de los organismos vivos y es responsable de la transmisión de la herencia. Se divide en dos conjuntos de 23 cromosomas y cada persona recibe un conjunto de cromosomas de su madre y de su padre. Cuando las células se dividen, la información es copiada en las nuevas células. La función principal del ADN es el almacenamiento de la información para construir otros componentes de las células como las proteínas. Los segmentos del ADN que llevan esta información genética son conocidos como genes.

En relación con su estructura, el ADN es un polímero de nucleótidos enlazados entre sí, es decir, es un polinucleótido. Cada nucleótido está formado por un azúcar (la desoxirribosa), una base nitrogenada (puede ser adenina, timina, citosina o guanosina) y un grupo fosfato que enlaza cada nucleótido con el siguiente, de manera semejante a como

lo hacen los ganchos o acoples que unen los carros del ferrocarril. La Figura 8 muestra algunos elementos estructurales del núcleo.

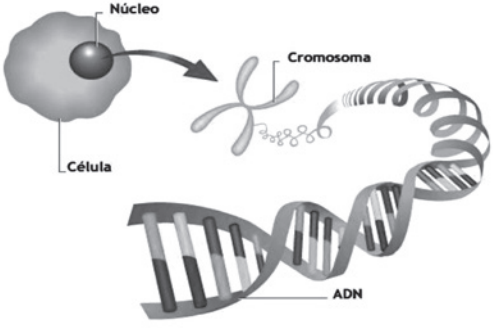

Figura 8. Estructura del ADN formada por una secuencia de nucleótidos en forma de doble hélice.

Los radicales libres y la alteración del equilibrio redox son factores bioquímicos involucrados en la generación de daño al ADN. En efecto, las especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno pueden oxidar y dañar al ADN. Además, como ya fue señalado, durante la lipoperoxidación se generan compuestos electrofílicos (aceptan electrones) y genotóxicos, que al interactuar con el ADN forman aductos, como el malondialdehído (MDA), el 4-hi-

droxi-2-nonenal (HNE) y el trans-2,4-decadeinal (DDE). En condiciones normales, los aductos formados se reparan continuamente para mantener la integridad del ADN; sin embargo, cuando esto no ocurre, la replicación del ADN conduce a diferentes mutaciones. Las modificaciones genéticas resultantes pueden iniciar una serie de eventos que conducen a la generación de cáncer (Starvridis, 2008; Barrera, 2012).

Los aductos del ADN son útiles para medir el daño oxidativo sobre esta estructura, ya que aparecen en la orina y se pueden identificar mediante métodos no invasivos. Con este propósito, se ha cuantificado la concentración de aductos de MDA y de 8-hidroxidesoxiguanosina (8-OHdG), base hidroxilada del ADN, en la orina de pacientes con cáncer, para valorar la eficacia del tratamiento con radiación y quimioterapia (Bergman *et al.,* 2004). En efecto, numerosas evidencias indican que la 8-OHdG, biomarcador del estrés oxidativo celular, también representa un factor de riesgo para el cáncer, la aterosclerosis y la diabetes, porque: a) se ha detectado una concentración alta de 8-OHdG en la orina de pacientes con varios tipos de cáncer,

b) en las placas ateroscleróticas de los humanos hay incrementos de ADN modificado por oxidación y de 8-OHdG, y c) se han identificado concentraciones altas de 8-OHdG y de ADN leucocitario en la orina de pacientes diabéticos con hiperglicemia (azúcar elevada en la sangre), además, la concentración urinaria de 8-OHdG en los diabéticos correlaciona con la severidad de la nefropatía y retinopatía diabética (Wu *et al.,* 2004).

En general, se acepta que los radicales libres dañan la estructura del ADN produciendo mutaciones en los pares de bases, rompimientos del ADN, daño a genes supresores de tumores y amplificación de la expresión de proto-oncogenes, entre otros efectos nocivos. Por ello, se ha encontrado que el estrés oxidativo conduce a la transformación maligna de las células. Asimismo, la acumulación del daño al ADN se relaciona con el proceso de envejecimiento.

d) Mecanismos de daño oxidativo del ADN

El estrés oxidativo que afecta al ADN se atribuye a los radicales $^{\bullet}OH$ que son producidos por el cobre (Cu) y el fierro (Fe), presentes en la cromatina del núcleo. El daño oxidativo sobre el ADN también es atribuido a cambios en los procesos metabólicos que activan nucleasas (enzimas que rompen las cadenas del ADN). Al respecto, se sabe que las sustancias conocidas como quinonas rompen la estructura del ADN luego de la activación de las endonucleasas que dependen de calcio. Debe señalarse que durante el estrés oxidativo, se incrementa la concentración de calcio en el citoplasma, debido a la incapacidad de este catión para incorporarse al retículo endoplásmico celular.

Asimismo, como ya se señaló, las ROS que inician la lipoperoxidación, conducen a la degradación oxidativa de los fosfolípidos del colesterol y otros lípidos insaturados de las membranas celulares, generando hidroperóxidos de lípidos (LOOHs). La citotoxicidad de los hidroperóxidos está involucrada en el desarrollo de procesos patológicos, debido a cambios como la fluidez de la mem-

brana y la permeabilidad a los iones a través de esta estructura, así como las alteraciones en la actividad de algunas enzimas.

Resumiendo, se ha documentado que las ROS pueden dañar a los ácidos nucleicos. El radical $^{\bullet}OH$ reacciona con los componentes del ADN alterando las bases de purina y de pirimidina, así como la estructura de la desoxirribosa. La lesión más estudiada del ADN se relaciona con la formación de 8-hidroxidesoxiguanosina (8-OHdG) (Figura 9). Asimismo, la modificación permanente del material genético que resulta del daño oxidativo representa la primera etapa involucrada en la mutagénesis, carcinogénesis y en el envejecimiento (Halliwell y Gutteridge, 1999; Rivera *et al.,* 2006; Barrera, 2012).

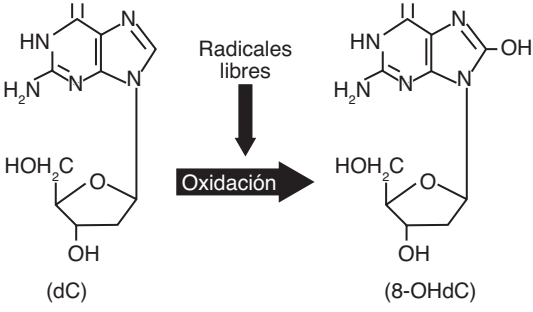

Figura 9. Daño oxidativo del ADN y formación de 8-hidroxi-desoxi-guanosina (8-OHdG).

Estrés oxidativo y enfermedades de humanos

La participación de los radicales libres en la generación de diferentes enfermedades es un fenómeno ampliamente documentado. Se ha demostrado que cuando el estrés oxidativo no es controlado de manera adecuada por los mecanismos antioxidantes de las células y el desequilibrio se mantiene de manera persistente, se acelera el proceso de envejecimiento y se inducen diversas enfermedades crónico-degenerativas. Las enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo incluyen: cáncer, alteraciones cardiovasculares, artritis reumatoide, daño renal, trastornos oculares (degeneración macular por la edad), daño neurológico (Alzheimer y Parkinson), asma, etc. Además, algunas enfermedades metabólicas, como la diabetes, se asocian con un aumento de la li-

poperoxidación (Ballinger, 2005; Pham-Huy *et al.,* 2008; Reuter *et al.,* 2010; Jomova y Valko, 2011).

Cáncer

La generación de cáncer en los humanos es un proceso complejo que incluye cambios celulares y moleculares mediados por diversos estímulos endógenos y exógenos. Como ya se señaló, se ha establecido que el daño oxidativo del ADN puede conducir al desarrollo del cáncer. La ruptura de la cadena de ADN es el mayor daño oxidativo producido por las ROS (Pham-Huy, 2008; Rahal *et al.,* 2014).

Los procesos de iniciación y promoción del cáncer están asociados con defectos de los cromosomas y con la activación de oncogenes inducida por los radicales libres. Los oncogenes son los genes responsables de la transformación de células normales en malignas, las cuales desarrollarán algún tipo de cáncer. Una forma común de daño es la formación de bases hidroxiladas del ADN, lo que representa un evento importante en la carcinogénesis química (Valko *et al.,* 2006, 2007;

Halliwell, 2007; Reuter *et al.,* 2010). La formación de aductos (metabolitos reactivos-ADN) interfiere con el crecimiento normal de la célula, ya que altera la transcripción normal de los genes y causa mutaciones genéticas. El daño oxidativo del ADN también produce otras modificaciones en su estructura, entre ellas, lesiones en bases y azúcares, así como enlaces cruzados DNA-proteínas. Por ejemplo, el humo del tabaco y la inflamación crónica que resulta de enfermedades no infecciosas, como la exposición al asbesto, son fuentes de daño oxidativo del ADN que pueden contribuir al desarrollo de cáncer pulmonar y de otros tumores (Willcox *et al.,* 2004; Valko *et al.,* 2007).

En este contexto, se ha establecido que algunos metales generan estrés oxidativo y daños a la salud. En efecto, durante las dos últimas décadas varios estudios han demostrado la actividad redox de metales como el fierro (Fe), cobre (Cu), cromo (Cr), cobalto (Co), etc. que participan en reacciones de óxido-reducción y tienen la capacidad de producir radicales libres. Por lo tanto, la alteración de la homeostasis de los metales en su forma

iónica puede conducir al estrés oxidativo e inducir daño al ADN, lípidos y proteínas, así como inducir el desarrollo de varias enfermedades, entre ellas el cáncer. El mecanismo de acción básico de estos metales involucra la formación de ROS (como los radicales $O_2^{\bullet}$ y $^{\bullet}OH$), lo que finalmente conduce a la formación de sustancias mutagénicas y carcinógenas como el malondialdehido (MDA), el 4-hidroxinonenal (HNE) y otros aductos del ADN (Jomova y Valko, 2011).

Daño renal

Brevemente, debe señalarse que los riñones son órganos que reciben una gran irrigación sanguínea (25% del gasto cardiaco) y participan de manera importante en el mantenimiento de la homeostasis corporal. Algunas de sus funciones son: regulan el contenido de agua y iones (sodio, potasio, cloro, etc.) del organismo, excretan productos de desecho del metabolismo celular (como la urea y la creatinina), participan en la regulación de la presión arterial y en la eliminación de xenobióticos (fármacos, aditivos de alimentos,

contaminantes ambientales que ingresan al organismo, etc.).

La unidad estructural y funcional de los riñones es la nefrona, la cual está formada por un aparato de filtración o glomérulo (capilares glomerulares), conectado a una porción tubular larga que reabsorbe sustancias útiles para el organismo (glucosa, aminoácidos, electrólitos, agua, etc.), y secreta fármacos y sustancias endógenas que luego se eliminan con la orina. Para desarrollar su trabajo, las nefronas realizan tres procesos fundamentales: 1) filtración glomerular, 2) reabsorción tubular y 3) secreción tubular (Figura 10). Estos procesos determinan la presencia de las sustancias que se excretan con la orina.

Con relación al daño de los riñones, se ha reportado que las ROS participan como mediadores primarios en alteraciones producidas por procesos isquémicos, tóxicos y reacciones antígeno-anticuerpo. Las ROS producen lipoperoxidación de las membranas y organelos de las células renales, especialmente en segmentos del túbulo proximal, dañando su integridad y la producción de energía (ATP), así como alterando el transporte de sustancias

y iones a través de las células tubulares. Además, producen daño microvascular (mediado principalmente por citosinas pro-inflamatorias) y lesiones estructurales, con alteración de la permeabilidad y la hemodinamia de los capilares glomerulares (Castillo *et al.*, 2003).

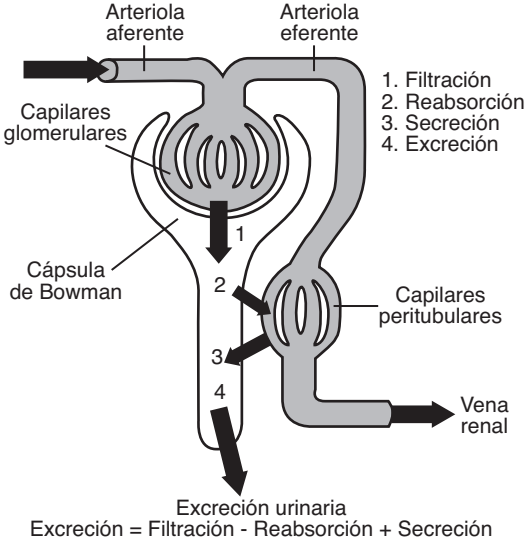

Figura 10. Estructura y funciones de la nefrona.

Al respecto, existen estudios que documentan la relevancia del estrés oxidativo en el desarrollo de varias patologías renales, ya que este proceso oxidante conduce a la activación de factores de transcripción y a la síntesis y/o liberación de citocinas inflamatorias, quimiocinas, factores de crecimiento y proteínas de la matriz extracelular. Estos cambios pueden activar procesos de señalización celular que inducen y propagan el daño renal (Abid *et al.,* 2005).

En efecto, el estrés oxidativo participa en enfermedades renales como la glomerulonefritis, nefritis intersticial, falla renal crónica, proteinuria y uremia (Galle, 2001; Pham-Yu *et al.,* 2008). La nefrotoxicidad de algunos medicamentos como la ciclosporina, la gentamicina y la vinblastina se debe principalmente a la generación de lipoperoxidación (Massicot *et al.,* 1997). En estudios *in vivo* e *in vitro*, se ha demostrado que la gentamicina aumenta la producción de ROS liberando fierro (Fe) de las mitocondrias de células de la corteza renal (Baliga *et al.,* 1999). Asimismo, diferentes formas de nefropatía y cáncer inducidas por metales pesados (cadmio, mercurio, plomo y arsénico) y metales de transición

(fierro, cobre, cobalto y cromo) se relacionan con la liberación de radicales libres producida por estos metales (Valko *et al.,* 2005). Con relación a lo antes descrito, se pueden citar los ejemplos siguientes:

a) El desequilibrio entre las concentraciones de ROS y de antioxidantes conduce a la producción de efectos nocivos en las células mesangiales (glomérulos renales). Este fenómeno se observa con frecuencia en pacientes con glomerulonefritis y síndrome nefrótico. En las nefritis por formación de inmunocomplejos, los leucocitos polimorfonucleares y los macrófagos producen radicales superóxido ($O_2^{\bullet}$) luego de ser estimulados. Así, las ROS desempeñan un papel importante en el desarrollo del daño renal y en la aparición de proteínas en la orina o proteinuria (Sanaka *et al.,* 1997).
b) El daño tubular por isquemia/reperfusión se genera, al menos en parte, por el aumento del estrés oxidativo en la insuficiencia renal aguda. Las ROS producen la activación de la enzima xantina oxidasa y de los neutrófilos. El óxido nítrico (NO) aumenta

en la fase de isquemia y las ROS en la fase de reperfusión, por lo que el equilibrio NO/ROS se relaciona con la magnitud del daño. Es decir, la acumulación de hipoxantina y oxígeno durante la reperfusión tisular daña a las células renales por incremento en la producción de ROS en los pacientes con falla renal aguda. Por ello, los fármacos que donan óxido nítrico pueden tener una acción citoprotectora contra las acciones nocivas de las ROS (Elejal de Guerra, 2001).

c) La nefropatía diabética es otro ejemplo de daño renal asociado con el estrés oxidativo celular, en la que se atribuye un papel importante a los productos finales de la glicosilación (AGES) y a la disminución de los mecanismos antioxidantes. El mecanismo de generación de estrés oxidativo producido por la hiperglucemia es complejo. Al respecto, se ha descrito que las concentraciones elevadas de glucosa en la sangre promueven la glicosilación de proteínas circulantes y celulares, lo que puede iniciar una serie de reacciones de auto-oxidación que culminan en la formación y acumulación de AGES en los tejidos. Como ya fue

descrito, estas sustancias son potencialmente oxidantes y promueven el daño celular por la generación de ROS (Mansouri *et al.*, 2011).

Cada una de las condiciones patológicas antes descritas puede conducir a la enfermedad renal crónica (ERC), lo que requiere de terapia sustitutiva, aunque ésta tiene sus desventajas. En efecto, a pesar de la aplicación de diversas técnicas de detoxicación en los pacientes con ERC, ninguna de ellas ha sido totalmente inocua, debido a que, de acuerdo a los resultados de varios estudios, todas inducen reacciones nocivas por los radicales libres que se generan en el curso de las diálisis y disminuyen el potencial antioxidante del plasma (Pedzik *et al.,* 2010). Finalmente, se ha reportado que en los pacientes con insuficiencia renal crónica, aumenta la peroxidación de lípidos de la membrana de los eritrocitos, lo cual es un reflejo del aumento del estrés oxidativo producido por las ROS (Elejal de Guerra, 2001).

Degeneración macular relacionada con la edad (AMD, por sus siglas en inglés)

Esta enfermedad es la causa principal de ceguera en el mundo occidental y su prevalencia tiende a aumentar como consecuencia del incremento de vida o longevidad del humano; su etiología es poco conocida, aunque existe consenso generalizado de que el estrés oxidativo participa en su patogénesis. En efecto, la retina es particularmente susceptible al daño generado por el estrés oxidativo, debido a su elevado consumo de oxígeno, a su gran contenido de ácidos grasos poliinsaturados concentrados en los fotorreceptores y a su exposición prolongada a la luz. Esto último puede inhibir la mitosis (reproducción celular) en el epitelio pigmentario de la retina y en la coroides, además, genera daño a los segmentos externos de los fotorreceptores (Beatty *et al.,* 2000; Phamhuy *et al.,* 2008; Khandhadia y Lotery, 2010).

Estudios experimentales han mostrado de manera consistente que el daño fotoquímico a la retina se puede atribuir al estrés oxidativo. Además, se ha postulado que la lipofuscina se deriva, al menos en parte, de

los segmentos externos de los fotorreceptores dañados por oxidación y que es una sustancia fotorreactiva por sí misma. La lipofuscina es un pigmento lipídico, de color marrón amarillento, que se forma como resultado de la degradación oxidativa de los ácidos grasos insaturados; su acumulación en la retina es un factor de riesgo muy importante para el desarrollo de la AMD, dado que puede lesionar a los fotorreceptores (Beatty *et al.,* 2000). Con relación al daño oxidativo, se ha demostrado que los gránulos de lipofuscina producen radicales superóxido ($O_2^{\bullet}$), oxígeno singulete ($^1O_2$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) e incremento de la lipoperoxidación (Sparrow *et al.,* 2012; Jarret y Boulton, 2012).

Mecanismos antioxidantes de las células

Los efectos nocivos de los radicales libres son controlados en los seres vivos por diversos sistemas de protección antioxidante que involucran procesos o mecanismos encaminados a evitar la oxidación de estructuras de las células. Estos sistemas funcionan con los antioxidantes producidos en el organismo (endógenos) y con los que se obtienen de los alimentos (exógenos). Los antioxidantes endógenos de las células se clasifican en enzimáticos y no enzimáticos. En el primer caso, las enzimas involucradas directamente en la neutralización de las ROS y RNS son las siguientes:

–Superóxido dismutasa (SOD).
–Catalasa (CAT).

–Glutatión peroxidasa (GPX).
–Glutatión reductasa (GRd).

La SOD es la primera línea de defensa contra los radicales libres y cataliza la dismutación (oxidación y reducción simultánea de un sustrato) del radical $O_2^{\bullet}$, produciendo peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y oxígeno (O_2) (McCord J. M. y Fridovich, 1969):

$$O_2^{\bullet} + O_2^{\bullet} + 2\,H \xrightarrow{SOD} H_2O_2 + O_2$$

El H_2O_2 es un compuesto oxidante que es transformado en H_2O por la CAT o por la GPX, proceso en el que se genera glutatión oxidado (GSSG):

$$H_2O_2 + 2GSH \xrightarrow{GPx} GSSG + 2H_2O$$

A su vez, la GRd transforma al GSSG a su forma reducida original (GSH), mediante una reacción en la que participa el NADPH (fosfato de nicotinamida adenina dinucleótido) como agente reductor:

$$GSSG + 2\ NADPH \xrightarrow{GRd} 2\ GSH + 2\ NADPH^{+}$$

Los antioxidantes enzimáticos al interactuar con el anión $O_2^{\bullet}$, el H_2O_2 y los lipoperóxidos previenen la formación del radical tóxico $^{\bullet}OH$ (Pham-Huy *et al.,* 2008; Birben *et al.,* 2012).

A su vez, los antioxidantes no enzimáticos se dividen en compuestos endógenos y exógenos (presentes en los alimentos). Los antioxidantes endógenos son producidos por el metabolismo celular y entre ellos se encuentra el glutatión reducido (GSH), la melatonina, el ácido úrico, las proteínas transferrina y ferritina (enlazan Fe), los tioles de las proteínas plasmáticas, etc. Los antioxidantes exógenos son compuestos que no se producen en el organismo y, por ello, requieren ser obtenidos de los alimentos o de suplementos nutricionales, ejemplos: vitamina C (ácido ascórbico), vitamina E (α-tocoferol), flavonoides, etc. (Willcox *et al.,* 2004; Pham-Huy *et al.,* 2008; Nimse y Pal, 2015).

Conviene señalar que las defensas antioxidantes se complementan entre sí, ya que

pueden actuar simultáneamente contra diferentes especies reactivas en los compartimientos celulares. Por esta razón, en condiciones normales, los sistemas antioxidantes de las células neutralizan o minimizan las alteraciones causadas por los radicales libres. No obstante, a pesar de la presencia de antioxidantes, algunas ROS escapan y causan daño celular. Por ello, los sistemas antioxidantes de los seres vivos también incluyen mecanismos de reparación del daño, basados en la actividad de proteasas, lipasas, transferasas y enzimas reparadoras del ADN.

a) Glutatión

El glutatión reducido (GSH) es el principal compuesto endógeno no proteico que participa en la defensa antioxidante celular; abunda en el citoplasma, en el núcleo y en las mitocondrias. El GSH es un tripéptido compuesto de cisteína, ácido glutámico y glicina, con un grupo activo tiol (–SH) presente en la cisteína (Figura 11). El GSH es una molécula producida en todos los órganos y tejidos, especialmente en el hígado; tiene un gran poder antioxidante y amortiguador redox de las

células. Su forma oxidada es el disulfuro de glutatión (GSSG) (Pastore *et al.,* 2003; Masella *et al.,* 2005).

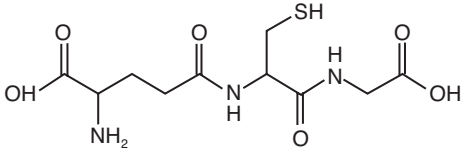

Figura 11. Estructura del glutatión reducido (L-γ-glutamil-L-cisteinil-glicina o GSH).

El GSH es sintetizado en el citoplasma celular mediante dos reacciones secuenciales: 1) la enzima γ-glutamilcisteína sintetasa forma la γ-glutamilcisteína, y 2) la enzima GSH-sintetasa añade la glicina al C-terminal de la γ-glutamilcisteína (Pastore *et al.,* 2003). La actividad y la expresión de las enzimas encargadas de la síntesis del GSH son modificadas por diversos factores, entre ellos, el estrés oxidativo, citocinas proinflamatorias, cáncer, quimioterapia, radiación ionizante, metales pesados, entre otros.

En las células, el GSH se encuentra libre o unido a proteínas. El glutatión libre se encuentra principalmente en su forma reducida

(GSH), la cual es convertida a la forma oxidada (GSSG) durante el estrés oxidativo. La transformación de GSSG en GSH lo realiza la glutatión reductasa. Esta enzima emplea a la coenzima NADPH como fuente de electrones (Figura 12).

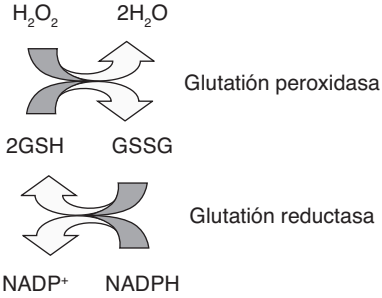

Figura 12. Ciclo redox y homeostasis del glutatión.

El estado redox del glutatión depende de las cantidades relativas de sus formas oxidada y reducida (GSSG/GSH), lo que representa un factor de importancia para las células. En efecto, como ya se señaló, en condiciones normales, la concentración de GSH predomina sobre la concentración de GSSG; sin embargo, cuando aumentan las ROS, la actividad de la glutatión reductasa es superada y la capacidad de las células es insuficiente para reducir

al GSSG, lo que conduce a un aumento de su concentración. Debido a que el GSSG atraviesa o cruza las membranas de las células, puede llegar a la sangre y producir un aumento del cociente GSSG/GSH; por ello, este cociente es útil para valorar el estrés oxidativo de los tejidos (Jones, 2002; De Tursi *et al.,* 2013).

Asimismo, dado que el GSH se sintetiza en el citoplasma de las células, para ingresar al interior de las mitocondrias, requiere ser transportado a través de las membranas de este organelo. Hay dos proteínas que lo transportan a través de estas membranas: la proteína acarreadora dicarboxilada y el acarreador 2-oxoglutarato. De esta manera, en años recientes, ha sido demostrado que la adición de GSH externo es captado fácilmente por las mitocondrias, a pesar de que en la matriz de las mismas la concentración de GSH es alta (≈ 8 mM) (Shen *et al.,* 2005).

El GSH funciona como antioxidante por diferentes acciones, entre las que se incluyen las siguientes (Masella *et al.,* 2005; Birben *et al.,* 2012):

- Es un cofactor o componente que estimula la acción catalítica de enzimas que neutralizan a los radicales libres, como la GPX y la GST.
- Neutraliza al radical $^{\cdot}OH$ y al oxígeno singulete ($^1O_2$).
- Detoxifica o neutraliza al H_2O_2 y a los peróxidos de lípidos por la acción catalítica de la GPX.
- Regenera vitaminas antioxidantes importantes (como la C y la E), transformándolas en su forma activa.
- Regula y activa varios factores de transcripción como la proteína activadora-1 (AP-1) y el factor nuclear kapa-B (FN-kB).

Además, en el núcleo, el GSH mantiene el equilibrio redox de las proteínas que tienen en su estructura grupos tiol (-SH) y que son necesarias para la reparación y la expresión del ADN (Jones *et al.,* 2000; Nogueira *et al.,* 2004). La capacidad del GSH para regenerar a los antioxidantes más importantes se relaciona con el estado redox de sus formas oxidada y reducida (GSSG/GSH) (Pastore *et al.,* 2003). En la Figura 13, se muestran algunas

rutas para el manejo del estrés oxidativo por el GSH y otros antioxidantes.

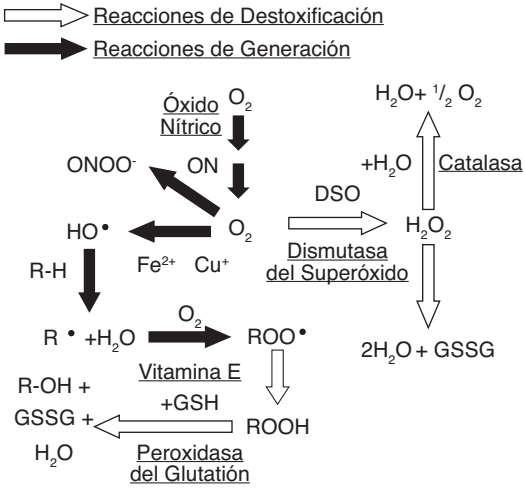

Figura 13. Participación del GSH en la neutralización de especies reactivas de oxígeno.

b) Transferasas de glutatión

Muchas sustancias, al ser biotransformadas en el organismo, generan metabolitos electrófilos altamente reactivos y tóxicos. Estos compuestos forman aductos con algunas macromoléculas de las células, alterando con ello su fun-

ción; sin embargo, el GSH neutraliza a muchos metabolitos reactivos, ya sea por conjugación espontánea o mediante una reacción catalizada por las transferasas de glutatión (GST). Estas proteínas son una familia de enzimas involucradas en la detoxificación de xenobióticos (sustancias exógenas y ajenas al organismo) y de sustancias reactivas endógenas (producidas por las células). Las GST inactivan a los radicales libres catalizando la reacción de estas sustancias con el grupo tiol (–SH) del GSH; con ello, se neutralizan los sitios electrófilos de los radicales libres y aumenta su hidrosolubilidad. Los epóxidos, los hidroperóxidos orgánicos y los metabolitos oxidados son los sustratos de las GST.

La transferencia del GSH a los compuestos electrofílicos es el mecanismo principal de detoxificación de los intermediarios reactivos generados por las oxidasas, enzimas que pertenecen a la familia del citocromo P450 (CYP450). Por lo tanto, las GST son un mecanismo de protección de las células que se encarga de detoxificar a una gran variedad de xenobióticos y de sustancias electrofílicas endógenas (Pastore *et al.,* 2003; Oakley, 2011).

Las GST se localizan principalmente en el citoplasma de las células y, en menor cantidad, en la membrana del retículo endoplásmico. El hígado, los riñones, los testículos, el intestino y las glándulas suprarrenales son los órganos con mayor actividad de estas enzimas. La reducción de un 20-30% del GSH intracelular produce una marcada incapacidad de las células para contrarrestar las acciones de los radicales libres (Oakley, 2011).

Un buen ejemplo de producción de radicales libres y daño celular, que puede ser contrarrestado por el GSH y las GST, es la biotransformación del tetracloruro de carbono (CCl_4). En este proceso, mediado por el CYP450, se forman los radicales triclorometilo ($Cl_3C^{\bullet}$) (Gruebele *et al.,* 1996). La ruta de eliminación más importante de estos radicales es su reacción con el O_2, lo que genera radicales peroxitriclorometilo ($Cl_3COO^{\bullet}$) (McCay *et al.,* 1984). Este compuesto intermediario es más reactivo aún que el radical triclorometilo, y puede interactuar con los lípidos de las membranas, causando lipoperoxidación (Comporti *et al.,* 1984). La reacción de estos radicales

con los lípidos de las membranas ocurre principalmente en el hígado y en la corteza y médula de los riñones. El daño hepático produce cirrosis, mientras que el daño renal genera oliguria (disminución en la formación de orina) y edema (Shertzer *et al.,* 1988).

c) Glutatión peroxidasa

La enzima glutatión peroxidasa (GPX) contiene selenio como cofactor y cataliza la reducción de varios hidroperóxidos (ROOH y H_2O_2), utilizando para ello al GSH. A pesar de tener un sustrato común con la catalasa (H_2O_2), reacciona con mayor eficacia con los lípidos y otros hidroperóxidos orgánicos. Esta enzima fue identificada por Millis (1957) en los eritrocitos de bovino y, posteriormente, fue encontrada en eritrocitos de humanos, así como en el pulmón e hígado de la rata (Zachara, 1991; Vertechy *et al.,* 1993). Se han identificado por lo menos cuatro isoenzimas de GPX en los mamíferos, cuya expresión varía dependiendo del tipo de tejido (Cuadro 3). Las isoenzimas son enzimas que difieren en la secuencia de aminoácidos pero catalizan la misma reacción. Debe señalarse que la

GPX es una de las principales defensas contra el estrés oxidativo.

Cuadro 3. Ubicación de las isoenzimas de la glutatión peroxidasa (GPX) en el organismo.

Isoenzima	Localización	
	Célula	**Órganos**
GPX 1	Mitocondrias	Riñones e hígado
GPX 2	Citosol	Tracto gastrointestinal
GPX 3	Medio extracelular	Riñones
GPX 4	----------	Testículos y epitelio renal

Adapatado de Birben *et al.*, 2012.

d) Superóxido dismutasa (SOD)

Esta enzima fue descubierta en 1968 por Irwin Fridovich y Joe McCord, investigadores de la Universidad de Duke-USA. Se encarga de neutralizar a los radicales superóxido ($O_2^{\bullet}$). En los organismos aerobios, el radical $O_2^{\bullet}$es producido por diferentes fuentes: cuando el oxígeno recibe radiación ionizante, durante la conver-

sión de la xantina en ácido úrico por acción de la xantina oxidasa, como subproducto de reacciones de oxidasas, en la autooxidación de hidroquinonas (ubiquinonas) y catecolaminas, en la combinación del oxígeno con la hemoglobina y la mioglobina, etc. (Valko *et al.*, 2007).

El radical $O_2^{\bullet}$ da origen a otras ROS capaces de oxidar distintas biomoléculas. Por ello, para evitar la propagación de la cadena oxidativa, la SOD transforma los radicales $O_2^{\bullet}$ en peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y oxígeno molecular (O_2); además, protege a las enzimas deshidratasas de la inactivación producida por el radical superóxido. De esta manera, la SOD es una enzima antioxidante de importancia en células vivas expuestas al oxígeno.

El radical $O_2^{\bullet}$ tiene un tiempo de vida muy corto gracias a la acción de la SOD. En este contexto, se han identificado cuatro tipos de esta enzima, y todas ellas tienen en común la presencia de cofactores como Cu y Zn (dinucleares) y Fe, Mn o Ni (mononucleares). En el humano, existen varias formas de esta enzima: SOD-Cu y SOD-Zn en el citosol; SOD-Mn en las mitocondrias y SOD-Cu o SOD-Zn de

localización extracelular (Birben *et al.,* 2012). La clave de la acción de estas enzimas es el ion metálico con estados de oxidación variable que puede actuar como agente oxidante o como agente reductor (ejemplos: Cu^{2+}/Cu^{+}, Fe^{3+}/Fe^{2+}). Por otra parte, se ha relacionado la sobreexpresión de la SOD con el síndrome de Down y la disfunción de esta enzima con el desarrollo de esclerosis lateral amiotrófica (enfermedad de Lougehring).

e) Catalasa

Como ya se señaló, la destrucción del radical superóxido genera peróxido de hidrógeno (H_2O_2). La acción metabólica de otras enzimas, como la D-amino-oxidasa, también genera H_2O_2. Este compuesto es nocivo para la célula, ya que cruza la membrana plasmática y los poros nucleares; por ello, puede formar aductos con el ADN, lo que modifica la expresión de proteínas. En este contexto, la catalasa (CAT) es una enzima tetramérica, con cuatro subunidades de 60 KDa, que cataliza la transformación de H_2O_2 en agua y oxígeno molecular:

La CAT es una de las enzimas más eficientes, ya que no se satura en presencia de concentraciones altas de su sustrato. La acción de la catalasa sobre el peróxido de hidrógeno evita que éste reaccione con macromoléculas y dañe la estructura y función de la célula. Conviene señalar que esta enzima es la mejor defensa contra el estrés oxidativo.

Antioxidantes exógenos

Además de los antioxidantes ya descritos (endógenos), existen compuestos exógenos que al ser ingeridos reaccionan con los radicales libres y los inactivan, desarrollando así una gran actividad antioxidante, ejemplos de ellos son: los polifenoles, la N-acetilcisteína, el resveratrol, las vitaminas C (ácido ascórbico), E (α-tocoferol) y A (β-caroteno), etc. Estos antioxidantes previenen o interrumpen el estrés oxidativo celular donando electrones a los radicales libres (Figura 14). Como consecuencia de ello, los antioxidantes se oxidan y se transforman en radicales libres generalmente débiles. Al respecto, cuando los carotenoides y las vitaminas E y C son oxidadas, requieren ser regeneradas en los sistemas biológicos y, por ello, es necesario que se acoplen posteriormente a sistemas reductores como: GSH/

GSSG, dihidrolipoato/lipoato, NADPH/NADP$^+$ y NADH/NAD$^+$.

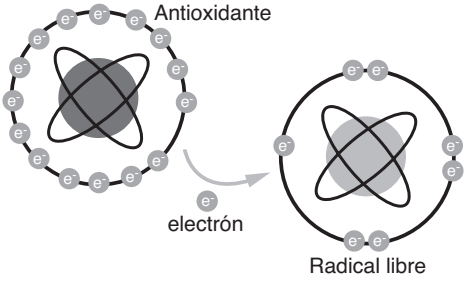

Figura 14. Neutralización de un radical libre por un antioxidante.

De esta manera, las acciones de los antioxidantes se asocian con la prevención y disminución del daño estructural y funcional de las células. Por ello, son útiles como agentes que previenen o retrasan la aparición de enfermedades crónicas como la hipertensión arterial (Sies *et al.,* 1992; Rahal *et al.,* 2014).

a) Vitamina E (α-tocoferol)

La vitamina E pertenece al grupo de las vitaminas liposolubles y se encuentra en una gran variedad de alimentos. Sus fuentes naturales

son los aceites de soya, cacahuate, algodón y girasol; además, se encuentra en las lentejas, el trigo, la avena y el arroz integral, así como en la mantequilla y el huevo.

La vitamina E está constituida por ocho compuestos cuyas estructuras tienen un anillo cromano y una cadena lateral larga. Estos compuestos se dividen en dos grupos: cuatro tocoferoles y cuatro tocotrienoles que se diferencian en la saturación de la cadena lateral. La actividad biológica de los tocotrienoles es menor que la de los tocoferoles y, por ello, tienen menor importancia nutricional. De los cuatro tocoferoles, el a-tocoferol es la forma más activa (Figura 15).

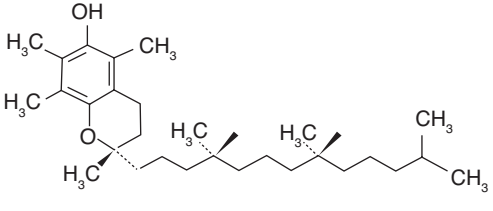

Figura 15. Estructura molecular del α-tocoferol.

Los tocoferoles protegen a los lípidos de las membranas celulares contra la oxidación generada por los radicales libres; por lo tanto, participan de manera importante en el mantenimiento de la integridad de estas estructuras. Sin embargo, debe señalarse que también pueden actuar como agentes pro-oxidantes en presencia de metales de transición. Durante la lipoperoxidación, la vitamina E dona un electrón al radical peroxilo y lo neutraliza; además, esta vitamina inhibe la formación de radicales libres.

En resumen, los tocoferoles son eficientes atrapadores o secuestradores de radicales peroxilo en las membranas biológicas. El α-tocoferol es el principal antioxidante que neutraliza a estos radicales en los lípidos orgánicos, como las membranas de las células y las lipoproteínas de baja densidad (LDL). En este proceso se generan radicales a-tocoferilo. La vitamina C reduce a estos radicales apoyando así la acción antioxidante de la vitamina E. Lo anterior también puede ser realizado por otros compuestos reductores como el GSH o el dihidrolipoato. El GSH puede reducir directamente al radical a-tocoferilo de la vitamina E

o de manera indirecta a través de la reducción del ascorbilo en ascorbato (Figura 16) (White *et al.,* 1994; Birben *et al.,* 2012).

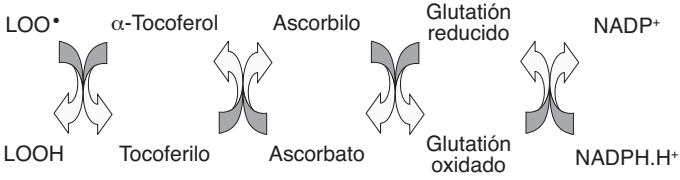

Figura 16. Acción del α-tocoferol sobre peróxidos lipídicos y su regeneración en presencia de ascorbato y glutatión reducido. LOO•: radical peroxilo; LOOH: lipoperóxido; NADP+: nicotin adenin dinucleótido fosfato (forma oxidada); NADPH.H+ (forma reducida).

b) Vitamina C (ácido ascórbico o L-ascorbato)
La vitamina C o ácido ascórbico es una vitamina hidrosoluble sintetizada por los vegetales a partir de la glucosa (Figura 17). Los humanos y algunos animales lo obtienen de los alimentos que consumen, ya que son incapaces de sintetizarla. Esta vitamina es esencial para la síntesis de colágeno y algunos neurotransmisores como la noradrenalina (Li y Schellhorn, 2002).

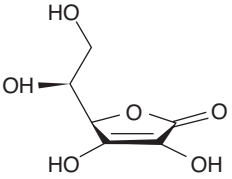

Figura 17. Estructura del ácido ascórbico o vitamina C.

El ácido ascórbico es un buen antioxidante y quelante (secuestrante) de algunos iones metálicos. Como antioxidante, atrapa y neutraliza de manera eficiente a las ROS. En este proceso se transforma en un radical ascorbilo, el cual es transformado en ácido ascórbico o ascorbato. El ácido ascórbico captura radicales libres potencialmente tóxicos como el $^{\bullet}OH$ y el $O_2^{\bullet}$ (Bunker, 1992; Mezzetti *et al.,* 1996; Nimse y Pal, 2015). Además, como antes se describió, el ascorbato puede reducir al radical tocoferilo en a-tocoferol.

La vitamina C es un nutriente esencial para los mamíferos. Su deficiencia crónica produce escorbuto, caracterizado por un defecto en la síntesis de colágeno, que se manifiesta por la falta de cicatrización de las heridas (sangrados) y defectos en la formación de los dientes (Zaragozá y Villaescusa, 2009). De allí la

importancia de consumir con frecuencia frutas (naranja, guayaba, toronja, manzana, etc.) y vegetales (col, tomate, repollo, etc.) ricos en vitamina C para evitar esta patología.

c) Flavonoides

Flavonoide es el término genérico que identifica a un grupo de metabolitos secundarios de las plantas. Son sintetizados en los vegetales a partir de los aminoácidos aromáticos fenilalanina y tirosina, así como del malonato. En la Figura 18 se muestran las estructuras de algunos flavonoides.

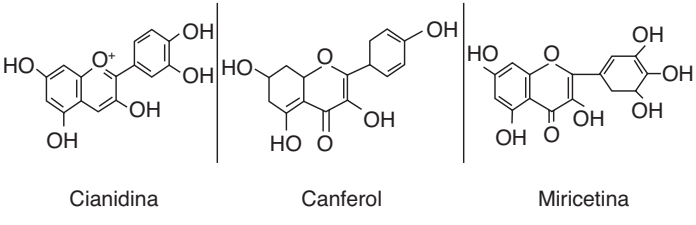

Figura 18. Estructura molecular de tres flavonoides.

Los flavonoides se encuentran en los vegetales, frutas, semillas, nueces, granos, en diferentes plantas medicinales, así como en algunas bebidas como el vino (particularmente

el tinto), el té y la cerveza (a concentraciones bajas). Las acciones benéficas de estos compuestos han sido evidenciadas por estudios *in vitro* e *in vivo*.

La acción antioxidante de los flavonoides incluye mecanismos como: 1) suprimir la formación de ROS por inhibición de enzimas que las generan o por quelación (secuestro) de elementos traza involucrados en su producción, 2) atrapar y neutralizar a las ROS, 3) regular la expresión de genes y 4) aumentar la protección de las defensas antioxidantes. Además, se ha reportado que los flavonoides tienen otras acciones, entre ellas antiinflamatoria, anticarcinógena y vasodilatadora (Laughton *et al.,* 1991; Hoult *et al.,* 1994; Lin *et al.,* 2000; Pal y Verma, 2013).

En efecto, ha sido reportado que los flavonoides protegen al ADN contra el daño oxidativo producido por los radicales $^{\bullet}OH$. Uno de los mecanismos que explican esta acción protectora es la capacidad de los flavonoides para quelar o atrapar iones de metales como el cobre (Cu^{2+}) y el fierro (Fe^{2+}). Así, el complejo formado flavonoide-metal es inactivo, es decir, los iones antes citados pierden su ca-

pacidad para generar ROS (Rubens de Souza y De Giovani, 2004; Armida *et al.,* 2005).

Funciones celulares de los radicales libres

Como ya se describió, las ROS y las RNS desempeñan en las células doble función: son especies con efectos benéficos y nocivos. Los efectos benéficos de estas especies se presentan a concentraciones bajas. Las funciones importantes realizadas por los radicales libres incluyen: a) ser sustancias de defensa contra bacterias y virus al ser liberadas por los neutrófilos (fagocitos); b) dilatar o abrir los vasos sanguíneos (ejemplo, el óxido nítrico), participando con ello en el control de la presión sanguínea; c) ser mediadores en la síntesis de sustancias celulares importantes como las prostaglandinas; d) poder actuar como moléculas señalizadoras de las células; e) participar en la activación de genes; f) ser mediadores del crecimiento celular;

y g) ser inductores de la apoptosis (DeCoursey y Ligeti, 2005; Valko *et al.,* 2007).

Al respecto, el óxido nítrico ($NO^{\bullet}$) es una molécula pequeña, con un electrón no apareado y vida media muy corta, que actúa como molécula señalizadora en varios procesos fisiológicos, entre ellos: la neurotransmisión (comunicación de células nerviosas), la regulación de la presión arterial, los mecanismos de defensa, la relajación del músculo liso y la regulación del sistema inmunológico (Bergendi *et al.,* 1999; Tousolis *et al.,* 2012). En la Figura 19 se presenta la relajación del músculo liso de las arterias producida por el óxido nítrico.

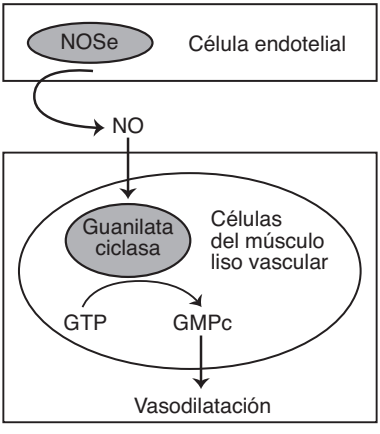

Figura 19. Acción vasodilatadora del óxido nítrico que disminuye la presión arterial.

Debido a su solubilidad en medios acuosos y lipídicos, el $NO^{\bullet}$ se difunde con facilidad en el citoplasma y a través de las membranas celulares (Chiueh, 1999). En el medio extracelular, el $NO^{\bullet}$ puede reaccionar con el oxígeno y el agua para formar los aniones nitrato ($-NO_3$) y nitrito ($-NO_2$).

El $NO^{\bullet}$ es producido en los tejidos por la sintasa de óxido nítrico (NOS), la cual existe en tres isoformas: neuronal (nNOS), inducible (iNOS) y endotelial (eNOS) (Xie *et al.,* 1992). Muchos tejidos expresan una o más de estas

isoformas. La nNOS y la eNOS son expresadas de manera constitutiva y su actividad es regulada por la concentración de calcio intracelular, en cambio, la isoforma iNOS se expresa en los macrófagos luego de ser estimulados por lipopolisacáridos, citocinas y otros agentes.

En función de lo antes descrito, el estudio de las ROS y las RNS no debe ser abordado solamente desde una perspectiva patológica, se deben analizar también las funciones importantes que realizan en las células.

Fuentes de consulta

Abid, M. R., Razzaque, M. S., Taguchi, T. (2005). Oxidant stress in renal pathophysiology. *Contrib Nephrol*, 148, 135-153.

Aikens, J. & Dix, T. A. (1991). Perhydroxyl radical initiated lipid peroxidation. The role of fatty acid hydroperoxides. *J Biol Chem*, 266(23), 15091-15098.

Álvarez Camacho, G. L., Olivas Sarabia, A. (2006). Filósofos, alquimistas y químicos. *Revista Universitaria-UABC*, 54.

Andreu, C. I., Woehlbier, U., Torres, M., Hetz, C. (2012). Protein disulfide isomerases in neurodegeneration: From disease mechanisms to biomedical applications. *FEBS Letters*, 586, 2826-2834.

Archer, S. (1993). Measurement of nitric oxide in biological models. *FASEB J*, 7, 349-360.

Armida, T., Maurizio, T., Andrea, T., Sergio, B. (2005). Copper (II)–Quercetin complexes in aqueous solutions: spectroscopic and kinetic properties. *J Mol Struct*, 44, 759–766.

Auten, R. L. & Davis, J. M. (2009). Oxygen toxicity and reactive oxygen species: the devil is in the details. *Pediatr Res*, 66(2), 121-127.

Avello, M. & Suwalsky, M. (2006). Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección. *Atenea*, 494, 161-172.

Baliga, R., Ueda, N., Walker, P. D., Shah, S. V. (1999). Oxidant mechanisms in toxic acute renal failure. *Drug Metab Rev*, 31(4), 971-997.

Ballinger, S. W. (2005). Mitochondrial dysfunction in cardiovascular disease. *Free Radic Biol Med*, 38(10), 1278-1295.

Bansal, M. & Kaushal, N. (2014). Oxidative Stress Mechanisms and their Modulation. *Springer-India*, (Cap. 1, pp. 6-7.

Barrera, G. Oxidative stress and lipid peroxidation products in cancer progression and therapy. ISRN *Oncology*. doi: 10.5402/2012/137289.

Beatty, S., Koh, H. H., Phil, M., Henson, D., Boulton, M. (2000). The role of oxidative stress in the pathogenesis of age-re-

lated macular degeneration. *Surv Ophtalmol*, 45(2), 115-134.

Bergendi, L., Benes, L., Durackova, Z., Ferencik, M. (1999). Chemistry, physiology and pathology of free radicals. *Life Sci*, 65, 1865-1874.

Bergman, V., Leanderson, P., Starkhammar, H., Tagesson, C. (2004). Urinary excretion of 8-hydroxydeoxyguanosine and malondialdehyde after high dose radiochemotherapy preceding stem cell transplantation. *Free Radic Biol Med*, 36, 300-306.

Berlett, B. S. & Stadtman, E. R. (1997). Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J Biol Chem*, 272(33), 20313-20316.

Birben, E., Sahiner, U. M., Sackesen, C., Erzurum, S., Kalayci, O. (2012). Oxidative stress and antioxidant defense. *WAO Journal*, 5, 9-19.

Blair, I., Lawson, J. A., Ischiropoulos, A. (2007). *Biomarkers of oxidant stress in vivo: oxidative modifications of lipids, proteins and* DNA (Cap. 6, pp. 131-173). USA: Springer.

Boveris, A. (2005). La evolución del concepto de radicales libres en biología y medicina. *Ars Pharm*, 46(1), 85-95.

Briehl, M. M. (2015). Oxygen in human health from life to death. An approach to teaching redox biology and signaling to graduate and medical students. *Redox Biology*, 5, 124-139.

Bunker, V. W. (1992). Free radicals, antioxidants and ageing. *Med Lab Sci*, 49, 299-312.

Cadenas, E. (1997). Basic mechanisms of antioxidant activity. *Biofactors*, 6, 391-397.

Carr, A., McCall, M. R., Frei, B. (2000). Oxidation of LDL by myeloperoxidase and reactive nitrogen species-reaction pathways and antioxidant protection. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 20, 1716-1723.

Castillo, R., Huerta, P., Carrasco, R., Rodrigo, R. (2003). Estrés oxidativo y daño renal. *CIMEL*, 8(1), 43-52.

Castillo, R., Rodrigo, R., Pérez, F., Cereceda, M., Asenjo, R., Zamorano, J., Navarrete, R., Villalabeitia, E., Sanz, J., Baeza, C.,

Aguayo, R. (2011). Antioxidant therapy reduces oxidative and inflammatory tissue damage in patients subjected to cardiac surgery with extracorporeal circulation. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 108(4), 256-262.

Chiueh, C. C. (1999). Neuroprotective properties of nitric oxide. *Acad Sci*, 890, 301-311.

Cimen, M. Y. (2008). Free radical metabolism in human erythrocytes. *Clin Chim Acta*, 390(1-2), 1-11.

Comporti, M., Benedetti, A., Ferrali, M., Fulceri, R. (1984). Reactive aldehydes (4-hydroxyalkenals) originating from the peroxidation of liver microsomal lipids-biological effects and evidence for their binding to microsomal protein in CCl_4 or $BrCCl_3$ intoxication. *Front. Gastrointest. Res.*, 8, 46-62.

Cynshi, O. & Stocker, R. (2005). Inhibition of lipoprotein lipid oxidation. *Springer-Verlag*, 170, 563-590.

Datta, A. K., Misra, M., North, S. L., Kasprzak, K. S. (1991). Enhancement by nickel (II) and L-histidine of 2´-deoxyguano-

sine oxidation with hydrogen peroxide. *Carcinogenesis*, 13(2), 283-287.

De Grey, A. D. (2002). HO2•, the forgotten radical. *DNA Cell Biol*, 21(4), 251-257.

De Tursi, R. L., Vázquez, T. A., Vázquez, P. A., Sáenz, T. G., Mahmound, I. A., Gumbau, P. V. (2013). Estrés oxidativo, estudio comparativo entre un grupo de población normal y un grupo de población obesa mórbida. *Nutr Hosp*, 28(3), 671-675.

Dhalla, N. S., Temsah, R. M., Netticadan, T. (2000). Role of oxidative stress in cardiovascular diseases. *J Hypertens*, 18, 655-673.

Díaz-Acosta, A. E. & Membrillo-Hernández, J. (2006). Consecuencias fisiológicas de la oxidación de proteínas por carbonilación en diversos sistemas biológicos. *TIP Rev Esp Cienc Quím Biol*, 9(1), 34-44.

Dix, T. A. & Aikens, J. (1993). Mechanisms and biological relevance of lipid peroxidation initiation. *Chemical Research in Toxicology*, 6(1), 2-18.

Drehmer, R. E. (2007). *Estudio comparativo de aceite de oliva y maíz sobre el meta-*

bolismo oxidativo de rata (Tesis doctoral). Universidad Politécnica de Valencia, Valencia, España.

Dröge, W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev*, 82(1), 47-95.

Elahi, M. M. & Matata, B. M. (2013). Significance of the nitrosative-oxidative stress disequilibrium on endothelial dysfunction during cardiac development. *Oxid Antioxid Med Sci*, 2, 73-82.

Elejal de Guerra, J. I. (2001). Estrés oxidativo, enfermedades y tratamientos antioxidantes. *An Med Interna*, 18(6), 326-335.

Esposito, L. A., Melov, S., Panov, A., Cottrell, B. A., Wallace, D. C. (1999). Mitochondrial disease in mouse results in increased oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci*, 96, 4820-4825.

Galle, J. (2001). Oxidative stress in chronic renal failure. *Nephrol Dial Transplant*, 16, 2135-2142.

Garrison, W. M., Jayko, M. E., Bennett, W. (1962). Radiation-induced oxidation

of protein in aqueous solution. *Radiat Res*. 16, 487-502.

Gerschman, R., Gilbert, D. L., Nye, S. W., Dwyer, P., Fenn, W. O. (1954). Oxygen poisoning and x-irradiation: a mechanism in common. *Science*, 119, 623-626.

Gilbert, D. L. (Ed.). (1981). Perspective on the history of oxygen and life. En *Oxygen and the Living Process. An Inter Disciplinary Approach* (pp. 1-43). Nueva York: Springer Verlag.

Gilgun-Sherki, Y., Melamed, E., Offen, D. (2001). Oxidative stress induced-neurodegenerative diseases: the need for antioxidants that penetrate the blood brain barrier. *Neuropharmacology*, 40, 959-975.

Gruebele, A., Zawaski, K., Kapalan, D., Novak, R. F. (1996). Cytochrome P4502E1 and cytochrome P4502B1/2B2-catalysed carbon tetrachloride metabolism. *Drug Metab. Dispos.*, 24, 15-22.

Halliwell, B. & Gutteridge, J. M. C. (1990). Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: An overview. *Methods Enzimol*, 186, 1-85.

Halliwell, B. (1996). Antioxidants in human health and disease. *Annu Rev Nutr*, 16, 33-50.

Halliwell, B. (2007). Biochemistry of oxidative stress. *Biochem Soc Trans*, 35, 1147-1150.

Han, D., Antunes, F., Canali, R., Rettori, D., Cadenas, E. (2003). Voltage-dependent anion channels control the release of the superoxide anion from mitochondria to cytosol. *J Biol Chem*, 278(8), 5557-5563.

Han, S. G., Kim, Y., Kashon, M. L., Pack, D. L., Castranova, V., Vallyathan, V. (2005). Correlates of oxidative stress and free-radical activity in serum from asymptomatic shipyard welders. *Am J Resp Crit Care Med*, 172(12), 1541-1548.

Harman, D. (1956). Aging, a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol*, 11(3), 298-300.

Hernández-Rodríguez, S., Gutiérrez-Salinas, J., García-Ortiz, L., Mondragón-Terán, P., Ramírez-García, S., Núñez-Ramos, N. R. (2014). Estrés oxidativo y nitro-

sativo como mecanismo de daño al hepatocito producido por el metabolismo del etanol. *Med Int Méx*, 30, 295-308.

Höhn, A., König, J., Grune, T. (2013). Protein oxidation in aging and the removal of oxidized proteins. *J Proteomics*, 92, 132-159.

Höhn, A., Jung, T., Grune, T. (2014). Pathophysiological importance of aggregated damaged proteins. *Fre Radic Biol Med*, 71, 70-89.

Holgado, M., DeLuis, M., Macías, J. F. (1994). Características de los radicales libres. *Rev Esp Geriatr Gerontol*, 29(3), 155-167.

Hoult, J. R. S., Moroney, M. A., Paya, M. (1994). Actions of flavonoids and coumarins on lipoxygenase and cyclooxygenase. *Methods Enzymol*, 234, 443-454.

Jarrett, S. G., Boulton, M. E. (2012). Consequences of oxidative stress in age-related macular degeneration. *Mol Aspects Med*, 33(4), 399-417.

Jomova, K. & Valko, M. (2011). Advances in meta-induced oxidative stress and human disease. *Toxicol*, 283(2-3), 65-87.

Jones, D. P., Carlson, J. L., Mody, V. C., Cai, J. Y., Lynn, M. J., Sternberg, P. (2000). Redox state of glutathione in human plasma. *Fre Radic Biol Med*, 28, 625-635.

Jones, D. P. (2002). Redox potential of GSH/GSSG couple: assay and biological significance. *Methods Enzymol*, 348, 93-112.

Kasprzak, K. S. (1991). The role of oxidative damage in metal carcinogenicity. *Chem Res Toxicol*, 4, 604-615.

Kasprzak, K. S. (1995). Possible role of oxidative damage in metal-induced carcinogenesis. *Cancer Invest*, 13411-13430.

Kehrer, J. P. (1993). Free radicals as mediators of tissue injury and disease. *Critical Reviews in Toxicology*, 23(1), 21-48.

Khandhadia, S., Lotery, A. (2010, octubre). Oxidation and age-related macular degeneration: insights from molecular biology. *Expert Rev Mol Med*. doi: 10.1017/S146239941000164X.

Kohen, R., Nyska, A. (2002). Oxidation of biological systems: oxidative stress

phenomena, antioxidants, redox reactions and methods for their quantification. *Toxicol Pathol*, 30(6), 620-650.

Kong, A. N., Yu, R., Chen, C., Mandlekar, S., Primiano, T. (2000). Signal transduction events elicited by natural products-role of MAPK and caspase pathways in homeostatic response and induction of apoptosis. *Arch Pharm Res*, 23, 1-16.

Lahiry, L., Saha, B., Chakraborty, J., Adhikary, A., Mohanty, S., Hossain, D. M., Banerjee, S., Das, K., Sa, G., Das, T. (2010). Thea flavins target Fas/caspase-8 and Akt/pBad pathways to induce apoptosis in p53-muted human breast cancer cells. *Carcinogenesis*, 31(2), 259-268.

Landis, G. N., Tower, J. (2005). Superoxide dismutase evolution and life span regulation. *Mech Ageing Dev*, 126, 365-379.

Laughton, M. J., Evans, P.J., Moroney, M. A., Hoult, J. R. S., Halliwell, B. (1991). Inhibition of mammalian 5-lipoxygenase and cyclo-oxygenase by flavonoids and phenolic dietary additives. Relationship to antioxidant activity and to

iron-reducing ability. *Biochem Pharmacol*, 42(9), 1673-1681.

Levine, R. L., Mosoni, L., Berlett, B.S., Stadtman, E. R. (1996). Methionine residues as endogenous antioxidants in proteins. *Proc Natl Acad Sci*, 93, 15036-15040.

Levine, R. L., Moskovitz, J., Stadtman, E. R. (2000). Oxidation of methionine in proteins: roles in antioxidant defense and cellular regulation. *IUBMB Life*, 50(4-5), 301-307.

Li, Y. & Schellhorn, H. E. (2007). New developments and novel therapeutic perspectives for vitamin C. Critical Review. *J Nutr*, 137, 2171-2184.

Lin, A. P., Tsai, W. J., Fan, C. Y., Lee, M. J. (2000). Vandellia cordifolia regulated cell proliferation and cytokines production in human mononuclear cells. *Am J Chinese Med*, 28(3-4), 313-323.

Liochev, S. I. & Fridovich, I. (2002). The Haber-Weiss cycle—70 years later: an alternative view. *Redox Rep*, 7(1), 55-57.

Lushchak, V. I. (2007). Free radical oxidation of proteins and its relationship with

functional state of organisms. *Biochem*, 72(8), 809-827.

Mansouri, E., Panahi, M., Ghaffari, M. A., Ghorbani, A. (2011). Effects of grape seed proanthocyanidin extracto on oxidative stress induced by diabetes in the kidney. *Iranian Biomed J*, 15(3), 100-106.

Masella, R., Di Benedetto, R., Vari, R., Filesi, C., Giovannini, C. (2005). Novel mechanisms of antural antioxidant compounds in biological systems-Involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *J Nutr Biochem*, 16, 577-586.

Massicot, F., Lamouri, A., Marin, C., Pham-Huy, C. *et al*. (1997). Preventive effects of two PAF-antagonists PMS 536 and PMS 549, on cyclosporine-induced LLC-PK1 oxidative injury. *J Lipid Mediat Cell Signal*, 15, 203-214.

Matés, J. M. (2000). Effects of antioxidants enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicol*, 153, 83-104.

Mayor-Oxilia, R. (2010). Estrés oxidativo y sistema de defensa antioxidante. *Rev Inst Med Trop*, 5(2), 23-29.

McCay, P. B., Lai, E. K., Poyer, J. L., DuBose, C. M., Janzen, E. G. (1984) Oxygen-and-carbon-centered free radical formation during carbon tetrachloride metabolism. Obsevations of lipid radicals in vivo and in vitro. *J. Biol. Chem*., 259, 2135-2143.

McCord, J. M., Fridovich, I. (1969). Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem*, 244(22), 6049-6055.

Mezzetti, A., Lappena, D., Romano, F., Costantini, F., Pierdomenico, S. D., Cesare, D. D., Cuccurullo, F., Riario-Sforza, G., Zuliani, G., Fellini, R. (1996). Systemic oxidative stress and its relationship with age and illness. *J Am Geriatr Soc*, 44, 823-827.

Michiels, C., Raes, M., Toussaint, O., Remacle, J. (1994). Importance of Se-glutathione peroxidase, catalase and Cu/Zn-SOD for cell survival against oxidative stress. *Free Radic Biol Med*, 17(3), 235-248.

Moncada, S., Palmer, R. M. J., Higgs, E. A. (1991). Nitric oxide-physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev*, 43, 109-142.

Morgan, M. J. & Liu, Z. (2011). Crosstalk of reactive oxygen species and NF-κB signaling. *Cell Res*, 21, 103-115.

Nagy, P. (2013). Kinetics and mechanisms of thiol-disulfide exchange covering direct substitution and thiol oxidation-mediated pathways. *Antioxid Redox Signal*, 18(13), 1623-1641.

Neustadt, J. (2006). Mitochondrial dysfunction and disease. *Integrat Med*, 5(3), 14-20.

Nimse, S. B. & Pal, D. (2015). Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. *RSC Adv*, 5, 27986-28006.

Nogueira, C. W., Zeni, G., Rocha, J. B. T. (2004). Organoselenium and organotellurium compounds: toxicology and pharmacology. *Chem Rev*, 104(12), 6255-6285.

Nowak, J. Z. (2013). Oxidative stress, polyunsaturated fatty acids-derived oxidation

products and bisretinoids as potential inducers of CNS diseases: focus on age-related macular degeneration. *Pharmacological Reports*, 65, 288-304.

Oakley, A. J. (2011). Glutathione transferases: a structural perspective. *Drug Metabol Rev*, 43(2), 138-151.

Ott, C. & Grune, T. (2014). Protein oxidation and proteolytic signalling in aging. *Curr Pharm Des*, 20(18), 3040-3051.

Pacher, P., Beckman, J. S., Liaudet, L. (2007). Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev*, 87(1), 315-424.

Pal, D. & Verma, P. (2013). Flavonoids a powerful and abundant source of antioxidants. *IJPPS*, 5(3).

Parks, D. A. & Granger, D. N. (1986). Xanthine oxidase: biochemistry, distribution and physiology. *Acta Physiol Scand*, 548, 87-99.

Pastor, A., Weinstein, H., Jamison, E., Brenowitz, M. (2000). A detailed interpretation of OH radical footprints in a TBP-DNA complex reveals the role of dynamics in the mechanisms of se-

quence-specific binding. *J Mol Biol*, 304(1), 55-68.

Pastore, A., Federici, G., Bertini, E., Piemonte, F. (2003). Analysis of glutathione-Implication in redox and detoxification. *Clin Chim Acta*, 333, 19-39.

Pedzik, A., Paradowski, M., Rysz, J. (2010). Oxidative stress in nephrology. *Pol Merkur Lekarski*, 28(163), 56-60.

Pham-Huy, L. A., He, H., Pham-Huy, C. (2008). Free radicals, antioxidants in disease and health. *Int J Biomed Sci*, 4(2), 89-96.

Ponczek, M. B. & Wachowicz, B. (2005). Interaction of reactive oxygen and nitrogen species with proteins. *Postepy Biochem*, 51(2), 140-145.

Priestly, J. (1775). Experiments and observations on different kids of air. En *Alembic Club Reprint 7* (pp. 168-169, Vol. II, section III).

Quintanar-Escorza, M. A., González-Martínez, M. T., Navarro, L., Maldonado, M., Arévalo, B., Calderón-Salinas, J. V. (2007). Intracellular free calcium concentration and calcium transport

in human erythrocytes of lead-exposed workers. *Toxicol Appl Pharmacol*, 220(1), 1-8.

Quintanar-Escorza, M. A., González-Martínez, M. T., Del Pilar, I. O., Calderón-Salinas, J. V. (2010). Oxidative damage increases intracellular free calcium [Ca2+]i concentration in human erythrocytes incubated with lead. *Toxicol in Vitro*, 24(5), 1338-1346.

Radjendirane, V., Joseph, P., Jaiswal, A. K. (1997). *Oxidative stress and signal transduction* (441-469). En E. Cadenas y H. P. Forman (Eds.). Nueva York: Chapman and Hall.

Rahal, A., Kumar, A., Singh, V., Yadav, B., Tiwary, R., Chacraborty, S., Dhama, K. Oxidative stress, prooxidants, and antioxidants: The interplay. *BioMed Research International*, Article ID: 761264. dx.doi.org/10.1155/2014.

Rapoport, R. M., Draznin, M. B., Murad, F. (1983). Endothelium-dependent relaxation in rat aorta may be mediated through cyclic GMP-dependent protein phosphorylation. *Nature*, 30, 174-176.

Reed, J. D. (1990). Glutathione-Toxicological Implications. *Ann Rev Pharmacol Toxicol*, 30, 603-631.

Reed, J. D. (1994). Chemical toxicity and glutathione regulation. *Crisp Data Base* (NIOH).

Reuter, S., Gupta, S. C., Chaturvedi, M. M., Aggarwal, B. B. (2010). Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they Linked? *Free Radic Biol Med*, 49(11), 1603-1616.

Ridnour, L. A., Thomas, D. D., Mancardi, D., Espey, M. G., Miranda, K. M., Paolocci, N. *et al*. (2004). The chemistry of nitrosative stress induced by nitric oxide and reactive nitrogen oxide species. *Biol Chem*, 385, 1-10.

Rubens de Souza, F. V., De Giovani, F. W. (2004). Antioxidant properties of complexes of flavonoids with metal ions. *Redox Rep*, 9, 97-104.

Russo, A., Acquaviva, R., Campisi, A., Sorrenti, V., Giacomo, C. D., Virgata, M. L. (2000). Bioflavonoids as antiradicals, antioxidants and DNA cleavage protectors. *Cell Biol Toxicol*, 16, 91-98.

Sahnoun, Z., Jamoussi, K., Zeghal, K. M. (1998). Free radicals and antioxidants: physiology, human pathology and therapeutic aspects (part II). *Therapie*, 53(4), 315-339.

Sakac, V. & Sakac, M. (2000). Free oxygen radicals and kidney diseases (part I). *Med Pregl*, 53(9-10), 463-474.

Saltman, P. (1989). Oxidative stress: a radical view. *Semin Hematol*, 26, 249-256.

Sanaka, T., Nakano, Y., Nishimura, H., Shinobe, M., Higuchi, C., Omata, M., Nihei, H., Sugino, N. (1997). Therapeutic effect of a newly developed antioxidative agent (OPC-15161) on experimental immune complex nephritis. *Nephron*, 76, 315-322.

Sánchez-Pérez, Y., Carrasco-Legleu, C., García-Cuéllar, C., Pérez-Carreón, J., Hernández-García, S., Salcido-Neyoy, M., Alemán-Lazarini, L., Villa-Treviño, S. (2005). Oxidative stress in carcinogenesis. Correlation between lipid peroxidation and induction of preneoplastic lesions in rat hepatocarcinogenesis. *Cancer Lett*, 217(1), 25-32.

Sarma, A. D., Mallick, A. R., Ghosh, A. K. (2010). Free radicals and their role in different clinical conditions: an overview. *Inter J Pharma Sci Res*, 1, 185-192.

Schrader, M. & Fahini, H. D. (2006). Peroxisomes and oxidative stress. *Biochim Biophys Acta*, 1763, 1755-17666.

Schrauzer, G. N. (2006). Interactive effects of selenium and chromium on mammary tummor development and growth in MMTV-infected female mice and their relevance to human cancer. *Biol Trace Element Res*, 109, 281-292.

Schuessler, H. & Schilling, K. (1984). Oxygen effect in the radiolysis of proteins. *Int J Radiat Biol*, 45(3), 267-281.

Shen, D., Dalton, T. P., Nebert, D. W., Shertzer, H. G. (2005). Glutathione redox state regulates mitochondrial reactive oxygen production. *J Biol Chem*, 280, 25305-25312.

Shertzer, H. G., Reitman, F. A., Tabor, M. W. (1988). Influence of diet on the expression of hepatotoxicity from carbon tetrachloride in ICR mice. *Drug-Nutr. Interact*., 5, 275-282.

Sies, H., Stahl, W., Sundquist, A. R. (1992). Antioxidants functions of vitamins. Vitamin E and C, beta-carotene, and other carotenoids. *Ann N Y Acad Sci*, 669, 7-20.

Smith, A. R., Shenvi, S. V., Widlansky, M., Suh, J. H., Hagen, T. M. (2004). Lipoic acid as a potential therapy for chronic diseases associated with oxidative stress. *Curr Med Chem*, 11, 1135-1146.

Sparrow, J. R. *et al*. (2012). The bisretinoids of retinal pigment epithelium. *Prog Retin Eye Res*, 31, 121-135.

Squier, T. C. (2001). Oxidative stress and protein aggregation during biological aging. *Exp Gerontol*, 36(9), 1539-1550.

Stadtman, E. R. (1990). Metal ion-catalyzed oxidation of proteins: biochemical mechanisms and biological consequences. *Free Radic Biol Med*, 9, 315-325.

Stadtman, E. R. & Levine, R. L. (2003). Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino Acids*, 25(3-4), 207-218.

Stadtman, E. R. (2006). Protein oxidation and aging. *Free Radic Res*, 40(12), 1250-1258.

Starvridis, J. C. (2008). Oxidative stress. Oxidation-The cornerstone of carcinogenesis. *Springer* (Cap. 2, pp. 31-48).

Tavares, A. F., Teixeira, M., Romao, C. C., Seixas, J. D., Nobre, L. S., Saraiva, L. M. (2011). Reactive oxygen species mediate bactericidal killing elicited by carbon monoxide-releasing molecules. *J Biol Chem* (Epub ahead of print).

Terrill, J. R., Radley-Crabb, H. G., Iwasaki, T., Lemckert, F. A., Arthur, P. G., Grounds, M. D. (2013). Oxidative stress and pathology in muscular dystrophies: focus on protein thiol oxidation and dysferlinopathies. *FEBS J*, 280(17), 4149-4164.

Tousoulis, D., Kampoli, A. M., Tentolouris, C., Papageorgiou, N., Stefanadis, C. (2012). The role of nitric oxide on endothelial function. *Curr Vasc Pharmacol*, 10(1), 4-18.

Uttara, B., Singh, A. V., Zamboni, P., Mahajan, R. T. (2009). Oxidative stress and neurodegenerative diseases: A review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. *Curr Neuropharmacol*, 7, 65-74.

Valko, M., Morris, H., Cronin, M. T. (2005). Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr Med Chem*, 12(10), 1161-1208.

Valko, M., Rhodes, C. J., Moncol, J., Izakovic, M., Mazur, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact*, 160, 1-40.

Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T., Mazur, M., Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*, 39(1), 44-84.

Vertechy, M., Cooper, M. B., Ghirardi, O., Rammacci, M. T. (1993). The effect of age on the activity of enzymes of peroxide metabolism in rat brain. *Exp Gerontol*, 28(1), 77-85.

Vives-Bauza, C., Starkov, A., Garcia-Arumi, E. (2007). Measurements of the antioxidant enzyme activities of superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase. *Methods Cell Biol*, 80, 379-393.

Vorbach, C., Harrison, R., Capecchi, M. (2003). Xanthine oxidoreductase is

central to the evolution and function of the innate immune system. *Trends Immunol*, 24, 512-517.

Waud, W. R. & Rajagopalan, K. V. (1976). Purification and properties of the NAD^+ dependent (type 0) forms of rat liver xanthine dehydrogenase. *Acta Biochem Biophys*, 172, 747.

White, E., Shannon, J. S., Patterson, R. E. (1997). Relationship between vitamin and calcium supplement use and colon cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 6, 769-774.

Willcox, J. K., Ash, S. L., Catignani, G. L. (2004). Antioxidants and prevention of chronic disease. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 44, 275-295.

Winterbourn, C. C., Metodiewa, D. (1999). Reactivity of biologically important thiol compounds with superoxide and hydrogen peroxide. *Free Radic Biol Med*, 27(3-4), 322-328.

Wood, L. G., Fitzgerald, D. A., Gibson, P. G., Cooper, D. M., Garg, M. L. (2000). Lipid peroxidation as determined by plasma isoprostanes is related to disea-

se severity in mild asthma. *Lipids*, 35, 967-974.

Wu, L. L., Chiou, C. C., Chang, P. Y., Wu, J. T. (2004). Urinary 8-OHdG: a marker of oxidative stress to DNA and a risk factor for cancer, atherosclerosis and diabetics. *Clin Chim Acta*, 339(1-2), 1-9.

Xie, Q. W., Cho, H. J., Calaycay, J., Mumford, R. A., Swiderek, K. M., Lee, T. D. (1992). Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages. *Science*, 256, 225-228.

Zachara, B. A. (1991). Mamalian selenoproteins. *J Trace Elem Electrolytes Health Dis*, 6(3), 137-145.

Zaragozá, F. & Villaescusa, L. (2009). Vitaminas, fitoterapia. En P. Lorenzo, A. Moreno e I. Lizasoain (Eds.), *Farmacología básica y clínica* (Cap. 58, 1009-1022). México: Panamericana.

Zentella de Piña, M., Corona García, S., Saldaña Balmori, Y. (1994). Toxicidad del oxígeno. Papel de los radicales libres en la peroxidación de los lípidos. *Bol Ed Bioquím*, 13, 87-93.

Zentella de Piña, M. & Saldaña Balmori, Y. (1996). Papel fisiológico de los radicales libres. *Bol Ed Bioquim*, 15(4), 152-161.

Zorrilla García, A. E. (2002). El envejecimiento y el estrés oxidativo. *Rev Cubana Invest Biomed*, 21(3), 178-185.

http://www.bvs.sld.cu

http://www.ethesis.helsinki.fi

http://www.highered.mcgraw-hill.com/sites/dl/free

* Todas las figuras del presente libro fueron tomadas de: Wikipedia, la enciclopedia libre.

Fundamentos de estrés oxidativo celular

Primera edición 2016

El cuidado de la edición estuvo a cargo
del Departamento Editorial de la Dirección General
de Difusión y Vinculación de la Universidad
Autónoma de Aguascalientes.