

Trabajos de revisión de un campo de frontera, de manera que sea utilizable para la docencia

Especies reactivas de oxígeno y sistemas antioxidantes: aspectos básicos

Noemí Cárdenas-Rodríguez y José Pedraza-Chaverri*

Abstract (*Reactive oxygen species and antioxidant systems: basic concepts*)

Molecular oxygen is indispensable for aerobic organisms, as the final acceptor of electrons derived from the normal cellular metabolism at the end of the mitochondrial respiratory chain. However, oxygen also is toxic under some conditions. The "oxygen paradox" is that oxygen is dangerous to the same life-forms for which it has become an essential component of energy production.

Oxygen toxicity may be explained by the formation of reactive oxygen species (ROS) (including oxygen free radicals) which may oxidize biological macromolecules when there is an excessive ROS production and/or when the antioxidant systems are decreased. Excessive ROS production is associated with several pathological diseases.

This review provides a basic overview of the ROS chemistry and the antioxidant systems and will introduce the reader to the most important concepts of this broad topic of study.

Introducción

El oxígeno molecular (O_2) o dióxígeno es uno de los gases más importantes de la Tierra. Constituye el 21% de la atmósfera, 89% del peso del agua del mar y al menos el 47% de la corteza terrestre. La atmósfera terrestre está constituida por los siguientes componentes:

- Nitrógeno: 78.08%
- Oxígeno: 20.95%
- Argón: 0.93%
- Bióxido de carbono: 0.03%
- Neón: 0.0018%
- Helio: 0.0005%
- Criptón: 0.0001%
- Hidrógeno: 0.00006%

Autor para recibir correspondencia. Departamento de Biología, Facultad de Química, Edificio B, Lab 209, Ciudad Universitaria, UNAM04510 México, D.F. México.

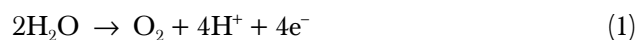
Teléfono y fax: (55) 56 22 35 15

Correo electrónico: pedraza@servidor.unam.mx

Recibido: 23 de junio de 2005; aceptado: 2 de agosto de 2005.

- Ozono: 0.00004 %
- Xenón: 0.000008 %

El oxígeno atmosférico es producido por la oxidación del agua por el complejo de ruptura del agua del fotosistema I de las células fotosintéticas durante la fase luminosa de la fotosíntesis:



En los organismos aerobios el oxígeno es el último aceptor de los electrones en la cadena respiratoria en donde se forma agua. La enzima citocromo c oxidasa, el complejo IV de transporte de electrones, reduce completamente el oxígeno a agua por la adición de cuatro protones y 4 electrones.



A esta reacción también se le conoce como reducción tetra-valente del oxígeno, indicando que este complejo reduce completamente al oxígeno y no libera especies parcialmente reducidas. Las reacciones 1 y 2 establecen un ciclo entre los organismos productores y consumidores de oxígeno.

Dado el uso frecuente de los términos oxidación y reducción en esta revisión, éstos se definen en la tabla 1 junto con los términos agente oxidante y agente reductor

Acoplado al proceso de respiración o consumo de oxígeno, las células sintetizan la mayor parte del adenosín trifosfato (ATP) que se requiere para los diversos procesos celulares. A estos dos procesos acoplados (la oxidación de los acarreadores de electrones reducidos NADH y $FADH_2$ y el transporte de los electrones hasta el O_2 para formar H_2O y la síntesis de ATP a partir del ADP) se le conoce como fosforilación oxidativa.

El oxígeno no sólo se requiere en la respiración; hay muchas enzimas que también lo utilizan. Una lista parcial de estas enzimas se presenta en la tabla 2.

Además el oxígeno juega un papel esencial en la química de los radicales libres, razón por la cual resulta de importancia definir algunos conceptos básicos para entender la importancia del mismo no sólo en el proceso respiratorio sino también en el metabolismo celular.

Tabla 1. Diferencias entre el proceso de oxidación y el proceso de reducción (Halliwell y Gutteridge, 1999).

Término	Definición	Ejemplo
Oxidación	Proceso químico que implica: <ul style="list-style-type: none"> • Ganancia de oxígeno • Pérdida de electrones 	$C + O_2 \rightarrow CO_2$ (El átomo de C se oxida a dióxido de carbono). $Na \rightarrow Na^+ + e^-$ (El átomo de Na se oxida al catión Na con pérdida de un electrón).
Reducción	Proceso químico que implica: <ul style="list-style-type: none"> • Pérdida de oxígeno • Ganancia de hidrógeno • Ganancia de electrones 	$CO_2 + C \rightarrow 2 CO$ (El CO_2 es reducido a CO mientras que el C es oxidado a CO). $C + 2H_2 \rightarrow CH_4$ (El átomo de C es reducido a metano). $Cl + e^- \rightarrow Cl^-$ (El átomo de Cl es reducido al ión Cl con ganancia de un electrón).
Agente oxidante	Es un compuesto químico que oxida a otro compuesto, ya sea tomándole electrones o hidrógeno o bien adicionándole oxígeno con su correspondiente reducción.	
Agente reductor	Es un compuesto químico que reduce a otro compuesto, ya sea donándole electrones o hidrógeno o bien removiéndole oxígeno con su correspondiente oxidación.	

Radicales libres

Un radical libre (RL) se define como cualquier especie química, ya sea atómica o molecular, capaz de existir independientemente, que contenga uno o más electrones desapareados (que ocupan por sí mismos un orbital molecular o atómico), ya sea por ganancia o pérdida de un electrón de un no radical o por la ruptura homolítica de una molécula:

$X \rightarrow e^- + X^+$ Radical formado por la pérdida de un electrón de un no radical.

$Y + e^- \rightarrow Y^-$ Radical formado por la ganancia de un electrón de un no radical.

Tabla 2. Algunas enzimas que requieren oxígeno.

Sintasa de óxido nítrico
Hemo oxigenasa
Xantina oxidasa
NADPH oxidasa
Acil CoA desaturasa
Triptofano 2,3 dioxigenasa
Citocromo P450
Escualeno monooxigenasa
Desmolasa
Fenilalanina hidroxilasa

$A:B \rightarrow A + B$ Radicales formados por la ruptura homolítica de una molécula.

La presencia de electrones desapareados modifica la reactividad química de un átomo o de una molécula, y suele ser más reactiva que su correspondiente no radical. Sin embargo, la reactividad química de los diferentes tipos de radicales libres es muy variable.

Es importante mencionar que los RL existen como derivados de muchos elementos o moléculas químicas, y los más importantes desde el punto de vista biológico son los derivados del oxígeno y del nitrógeno principalmente, aunque también destacan los derivados del hidrógeno y del carbono, así como los formados por los metales de transición como el hierro y el cobre, entre otros.

Toxicidad del oxígeno

Aunque el oxígeno es indispensable para la vida de los organismos aerobios, a altas concentraciones o bajo ciertas condiciones a la concentración normal llega a ser tóxico. A este hecho contrastante se le conoce como la “paradoja del oxígeno”. La toxicidad del oxígeno se puede explicar por la formación de las especies reactivas de oxígeno (ERO). Estas especies, como posteriormente se explicará, son más reactivas que el oxígeno en su estado basal de triplete. Las principales especies son: (a) las que se producen por la ruptura o la excitación del oxígeno (oxígeno atómico, ozono y el oxígeno singulete) y (b) las parcialmente reducidas (anión

superóxido, peróxido de hidrógeno y radical hidroxilo) (Hansberg, 2002).

Así, la presencia de las ERO ha sido asociada al proceso de envejecimiento, a los daños ocasionados por la isquemia-reperusión y a una amplia diversidad de estados patológicos como la enfermedad de Alzheimer, la artritis reumatoide, la hipertensión, la catarogénesis y la carcinogénesis, entre otros.

ERO: estructura electrónica y formación

Como ya hemos visto, el oxígeno es indispensable para la vida de los organismos aerobios pero también puede formar diversas ERO, cuya excesiva producción está asociada a muchos desórdenes patológicos.

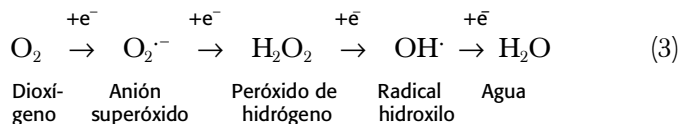
Debido a lo anterior, es muy importante analizar las estructuras del oxígeno y la estructura y la formación de las especies reactivas de oxígeno y conocer las más importantes pues a lo largo de esta revisión serán mencionadas continuamente.

Estructura electrónica del dióxígeno y del oxígeno singulete

Para entender la reactividad del oxígeno molecular o dióxígeno (porque son dos átomos de oxígeno atómico unidos por un enlace covalente, O_2), debemos entender su estructura electrónica. Una de las características interesantes del oxígeno es el hecho de que tiene dos electrones desapareados (que no están unidos cada uno con otro electrón) ocupando cada uno de ellos dos diferentes orbitales moleculares externos (en el orbital π^* –pi antienlace– ver tabla 3). Este tipo de estructura es llamado estado basal o estado triplete y significa que el oxígeno es un birradical, pues los radicales son usualmente más reactivos tratando de encontrar otro electrón con quien establecer un par (recordando que un RL por definición tiene al menos un electrón desapareado). Sin embargo, como se observa en la tabla 3, el dióxígeno posee estos dos electrones en giro paralelo (el espín nuclear –representado por la punta de la flecha– se encuentra hacia arriba) y esto le dificulta tomar dos electrones libres con giro antiparalelo (donde el espín nuclear –representado por la punta de la flecha– se encuentra hacia abajo) a la vez, por ello sólo puede recibir estos electrones de uno en uno para cada orbital molecular externo. Esto explica por qué en su estado basal y a temperatura ambiente el oxígeno reacciona muy poco, a pesar del hecho de ser un birradical.

A la adición sucesiva de electrones a la molécula de oxígeno se le conoce como reducción univalente (reacción 3) y esto produce especies parcialmente reducidas de oxígeno. Esto contrasta con la reducción tetravalente del oxígeno catalizada por la citocromo oxidasa en donde no se producen estas especies parcialmente reducidas.

Cuando uno de los electrones desapareados del oxígeno



absorbe energía e invierte su rotación (giro), se forma el oxígeno singulete (1O_2). Existen dos formas del oxígeno singulete: la sigma (Σ) que es un radical libre, debido a que conserva los dos electrones desapareados en los orbitales moleculares externos $2\pi^*$ (cada electrón en un orbital) como en el caso del dióxígeno, la diferencia radica en que un electrón tiene giro paralelo y otro electrón tiene giro antiparalelo, y la delta (Δ), la cual también posee dos electrones, aunque en este caso se encuentran apareados en un solo orbital $2\pi^*$, por lo que no es un radical libre (de acuerdo con la definición de RL no posee ningún electrón desapareado, por ello ya no se considera radical). El oxígeno singulete en su forma Σ posee una energía de 37.5 kcal, mientras que en su forma Δ es de 22.4 kcal. La forma Σ es muy inestable y por ello en los sistemas biológicos sólo tiene importancia el segundo. En la tabla 3 se puede observar la configuración electrónica del dióxígeno, oxígeno singulete y del anión superóxido.

Formación de las ERO

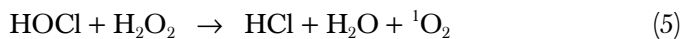
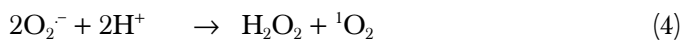
La expresión “especies reactivas de oxígeno” es un término colectivo que involucra no sólo los RL derivados del oxígeno, sino también a los no radicales derivados de la reducción molecular del oxígeno, y que además son muy reactivos, como el H_2O_2 y el ácido hipocloroso (HOCl). En la tabla 4 se presenta una lista más completa de radicales y no radicales

Oxígeno singulete: Como ya vimos anteriormente, existen dos formas, la sigma Σ y la delta Δ , y que es la primera la que es un RL. Esta especie se forma por la inversión en el espín de uno de los electrones desapareados de uno de los orbitales moleculares externos de la molécula de oxígeno (recordando que un electrón tiene un giro paralelo en un orbital y otro electrón tiene un giro antiparalelo en otro orbital), como se explicó anteriormente.

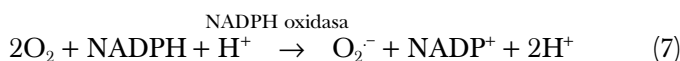
Tabla 3. Configuración electrónica de algunas moléculas de oxígeno diatómico en el orbital $2\pi^*$

Especie de oxígeno	Configuración electrónica en el orbital $2\pi^*$
Dioxígeno (O_2)	$\uparrow \uparrow$
Oxígeno singulete (1O_2)	$\uparrow \downarrow$
forma $^1\Sigma$	$\uparrow \downarrow$
forma $^1\Delta$	$\uparrow \downarrow$ —
Superóxido ($O_2^{\cdot -}$)	$\uparrow \downarrow$ —

De la misma forma, la formación de oxígeno singlete es llevada a cabo por fagocitos activados, los cuales son células que forman parte del sistema inmunológico de los seres vivos (por ejemplo los monocitos y macrófagos), y que son estimuladas cuando ya existe o hay posibilidad de daño a las células (como bien sería la inhalación o consumo de compuestos tóxicos y/o colonización bacteriana) pues liberan enzimas tal como proteasas y ERO para combatir este daño. A continuación se muestran algunas de las reacciones de producción de esta ERO (Eberhardt, 2001):



Anión superóxido: La formación del radical superóxido ocurre por la reducción univalente del oxígeno; es decir, cuando el oxígeno acepta un electrón, reacción que se puede llevar a cabo después de varios eventos. Esta especie es relativamente inestable y se encuentra en equilibrio con su ácido conjugado, el radical hidroperoxilo. El anión superóxido tiene una función importante *in vivo*, ya que participa en la descarga respiratoria (aumento súbito del consumo de oxígeno) de las células fagocíticas activadas por contacto con partículas extrañas en los eventos inmunológicos. Cuando estas células se activan, el complejo enzimático NADPH (forma reducida de nicotinamida adenín dinucleótido fosfato) oxidasa, localizado en la membrana citoplasmática, reduce parcialmente el oxígeno de la siguiente forma:



De la misma forma, la xantina oxidasa (XO) es capaz de reducir la molécula de oxígeno para dar el anión radical superóxido de acuerdo a la siguiente reacción:



Peróxido de hidrógeno: El peróxido de hidrógeno es formado por la enzima superóxido dismutasa (SOD). Aunque no es un radical libre, tiene una gran lipofiliidad que le permite atravesar las membranas celulares y reaccionar con el anión superóxido en presencia de metales de transición, para generar el radical hidroxilo. Por esta razón se le considera un oxidante importante en las células de los organismos aerobios.

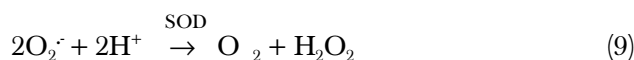
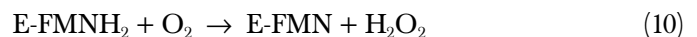
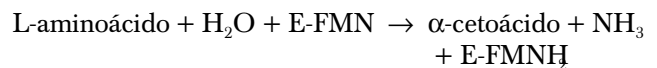
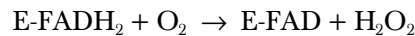


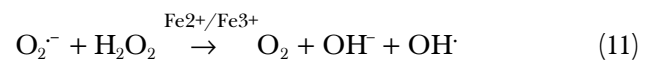
Tabla 4. Especies reactivas de oxígeno.

Radicales	No-radicales
Superóxido ($O_2^{\cdot-}$)	Oxígeno singlete (1O_2) forma ${}^1\Delta$
Hidroxilo ($OH\cdot$)	Peróxido de hidrógeno (H_2O_2)
Peroxilo ($RO_2\cdot$)	Ozono (O_3)
Alcoxilo ($RO\cdot$)	Anión peroxinitrito ($ONOO^-$)
Hidroperoxilo ($HO_2\cdot$)	Ácido hipocloroso ($HOCl$)
	Ácido hipobromoso ($HOBr$)

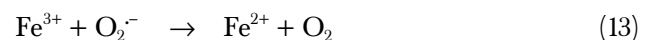
Un grupo de flavoenzimas localizadas en el retículo endoplasmático del hígado y el riñón son importantes en el metabolismo de los aminoácidos y producen peróxido de hidrógeno, de acuerdo con las reacciones (Eberhardt, 2001):



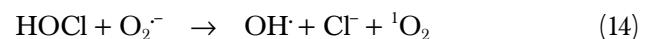
Radical hidroxilo: El radical hidroxilo es considerado una de las especies oxidantes más dañinas por su vida media corta y alta reactividad, y suele actuar en los sitios cercanos a donde se produce. La formación del radical hidroxilo puede lograrse fácilmente por la reacción de Haber-Weiss entre el anión superóxido y el peróxido de hidrógeno catalizada por un metal de transición (Halliwell y Gutteridge, 1999).



La reacción (11) es la suma de la reacción de Fenton (reacción 12) y de la reacción (13):



Ahora bien, el radical hidroxilo también se puede formar a partir del ácido hipocloroso:



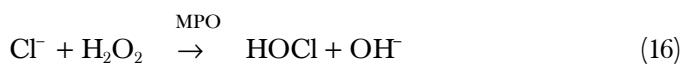
Anión peroxinitrito ($ONOO^-$): Este anión puede formarse por la combinación del radical óxido nítrico ($NO\cdot$) y $O_2^{\cdot-}$:



El $ONOO^-$ es un potente oxidante que induce nitración de tirosina, lipoperoxidación y citotoxicidad. Se ha encon-

trado involucrado en varios estados patológicos (Chirino, Hernández-Pando y Pedraza-Chaverrí, 2004). Un exceso en la producción de O_2^- puede contrarrestar los efectos vasodilatadores del NO (por medio de la reacción 15) induciendo vasoconstricción.

Ácido hipocloroso: Las peroxidasa son un grupo de enzimas que remueven el peróxido de hidrógeno para oxidar a otro sustrato. Una peroxidasa, en este caso, la mielo-peroxidasa (MPO), presente en altas concentraciones en los gránulos de los neutrófilos, cataliza la conversión de peróxido de hidrógeno a ácido hipocloroso de acuerdo a la siguiente reacción:



La MPO también cataliza la oxidación de los iones Br^- , I^- y SCN^- .

El sistema MPO- H_2O_2 - Cl^- ha sido estudiado ampliamente, porque la reacción de ácido hipocloroso y peróxido de hidrógeno puede producir oxígeno singulete (Eberhardt, 2001).

Ozono: El ozono (O_3) es un gas triatómico de color azul pálido y constituye una capa protectora de la radiación solar en la atmósfera superior. El ozono es producido por la fotodisociación de la molécula de oxígeno lo que genera dos átomos de oxígeno monoatómicos, los cuales posteriormente reaccionan con el dióxígeno.



Sin embargo, el ser humano también está expuesto al O_3 pues éste se puede formar por las reacciones fotoquímicas entre los óxidos de nitrógeno y los hidrocarburos. Ya que es un poderoso agente oxidante puede producir inflamación y daño pulmonar.

Hidroperoxilo: Este radical es formado cuando se lleva a cabo la dismutación espontánea del superóxido, y esto ocurre sólo cuando uno de los dos superóxidos se protona.

Peroxilo, alcoxilo: Estos radicales se forman durante la ruptura de los peróxidos orgánicos y durante la reacción de radicales con átomos de carbono con oxígeno (RO_2)

Efectos de las ERO sobre las macromoléculas biológicas

En los organismos aerobios, la producción de ERO está controlada por los mecanismos antioxidantes de defensa (como posteriormente se describirán). Sin embargo, este equilibrio se pierde cuando hay una excesiva producción de ERO o una deficiencia de los mecanismos antioxidantes lo que conlleva a daños a las moléculas. Muchas de estas

moléculas deben ser reparadas (tal como el ADN) o incluso reemplazadas (tal como muchos tipos de proteínas oxidadas). Así, por ejemplo, algunas proteínas en cuya estructura se encuentra el grupo prostético hierro-azufre (Fe-S) importantes para el metabolismo de *E. coli* pueden ser dañadas por los niveles de 0.1-0.2 μM de O_2^- (Halliwell y Gutteridge, 1999).

De acuerdo con lo anterior, es importante dar un panorama general sobre el daño oxidativo de las ERO a las macromoléculas biológicas más abundantes: ADN, lípidos y proteínas, por el papel tan importante que desempeñan en el organismo, recordando que en forma principal el ADN constituye el material genético, los lípidos son una rica fuente de energía durante el ayuno y las proteínas tienen función estructural, entre muchas otras.

Efectos sobre los ácidos nucleicos

Las ERO dañan al ácido desoxirribonucleico (ADN) al reaccionar con las bases nitrogenadas y con la desoxirribosa. El daño oxidativo al ADN es de extrema importancia, debido a que las bases nitrogenadas dañadas pueden generar mutaciones que a su vez pueden resultar en carcinogénesis, apoptosis, necrosis y aun enfermedades hereditarias. En relación con esto, se han detectado más de 20 tipos de modificaciones estructurales de las bases. Se ha observado que en presencia de las ERO se fragmenta el ADN y aparecen fragmentos internucleosomales, formados por la ruptura de ADN entre los nucleosomas (estructuras fundamentales para la organización del ADN dentro de los cromosomas), ocasionando con ello problemas en la compactación y enrollamiento del ADN dentro de la cromatina y con ello, alteraciones en las propiedades funcionales de la misma cromatina, la cual juega un papel importante en la regulación de la transcripción génica.

Existen mecanismos de reparación del ADN que se activan en el momento en que éste sufre modificaciones oxidativas. Cuando las ERO alcanzan el núcleo o se generan dentro de este por reacción de Fenton, estos mecanismos de reparación funcionan de manera eficiente, ya que continuamente revisan que exista una adecuada secuencia de bases en la molécula de ADN y en caso de existir alguna mutación (ya sea ruptura, entrecruzamiento o eliminación de bases) reparan el daño causado. Se ha reportado que el mecanismo de reparación por escisión de bases es el más importante en el caso de la modificación oxidativa. Cuando la modificación afecta regiones más extensas del ADN, actúa el sistema de reparación por escisión de nucleótidos, removiendo todo el segmento dañado a través de una nucleasa, para ser reemplazado por la ADN polimerasa I y la ligasa.

Efectos sobre los lípidos

El efecto principal de las ERO sobre los lípidos es la lipoperoxidación, que se produce al contacto con los lípidos de las membrana con un agente oxidante, como cualquiera de las ERO. En esta reacción el radical libre formado oxida una cadena insaturada de lípido, dando la formación de un lípido hidroperoxidado y un radical alquilo. El alquilo reacciona con una molécula de oxígeno y regenera la especie inicial, constituyendo una reacción que se repite. Esta lipoperoxidación trae como consecuencia alteraciones en la estructura de la membrana, afectando su fluidez y provocando daño en su integridad. La peroxidación de los lípidos genera especies como el malondialdehído y el 4-hidroxi-2-nonenal, los cuales son considerados como citotóxicos, ya que pueden funcionar como agentes electrofílicos capaces de interactuar con otros componentes celulares, principalmente proteínas y ADN. Cabe mencionar que la lipoperoxidación es un proceso identificado en enfermedades cardiovasculares. Uno de los procesos importantes es la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad, efecto que se ha correlacionado con la aterosclerosis.

Efectos sobre las proteínas

Uno de los aspectos más críticos del estrés oxidativo es el daño causado a las proteínas, debido a que puede causar la pérdida de la actividad catalítica de enzimas, daños en la integridad de proteínas estructurales o interrumpir la regulación de las vías metabólicas. A diferencia de los ácidos nucleicos, los sistemas de reparación de las proteínas sólo se limitan a los residuos de metionina, por lo que las proteínas oxidadas deben ser hidrolizadas para evitar su difusión en la red metabólica o su interacción con otras proteínas.

Los efectos de las ERO sobre las proteínas son: la oxidación de residuos de los aminoácidos, el rompimiento de los enlaces peptídicos y la agregación entre proteínas. Se ha vinculado una amplia diversidad de enfermedades con la presencia de las proteínas oxidadas, algunas de éstas son: la enfermedad de Alzheimer, la artritis reumatoide y la catarogénesis.

Estrés oxidativo

Por diversas causas puede perderse el balance entre condiciones oxidantes y defensas antioxidantes. Lo anterior puede deberse a un aumento en la producción de ERO o bien, o una disminución en los sistemas antioxidantes o de reparación, o a una combinación de estos factores. A tal condición se le denomina estrés oxidativo. En esta situación se presentan daños de las macromoléculas por el rompimiento o modificación de su estructura, trayendo como consecuencia una alteración en la función o incluso, la muerte de la célula.

El estudio del estrés oxidativo ha cobrado considerable importancia debido a las consecuencias que puede tener en la salud. También se ha observado que diversos factores

ambientales, como los contaminantes en el aire y la radiación ionizante pueden favorecer el desbalance oxidante/antioxidante. En la clínica se han desarrollado diversos métodos para evaluar las condiciones de estrés oxidativo basados en la acumulación de productos oxidados (tabla 5).

Mecanismos antioxidantes de defensa a nivel celular y extracelular

Un antioxidante es cualquier sustancia que a bajas concentraciones, comparado con el sustrato oxidable, retarda o previene significativamente la oxidación de ese sustrato. Los antioxidantes se pueden clasificar de la siguiente manera (Halliwell y Gutteridge, 1999):

- (a) Agentes que catalíticamente remueven los RL y a otras especies reactivas. Ejemplos: enzimas SOD, catalasa, peroxidasas y antioxidantes específicos para el grupo tiol.
- (b) Proteínas que abaten la disponibilidad de los prooxidantes tal como los iones de hierro o cobre, y el grupo hemo. Ejemplos: ferritina, transferrina, haptoglobinas, hemo-pexina y metalotioneína. Esta clasificación incluye proteínas que oxidan el ion ferroso, como la ceruloplasmina. La ferritina es una proteína intracelular que almacena hierro. La transferrina transporta hierro en los fluidos extracelulares.
- (c) Proteínas que protegen biomoléculas contra el daño (incluyendo estrés oxidativo) por otros mecanismos. Ejemplo: proteínas de choque térmico localizadas en retículo endoplásmico, periplasma y citoplasma. Tienen como función la estabilización y cobertura de la estructura proteica parcialmente protegida.
- (d) Agentes de bajo peso molecular que atrapan ERO y ERN (Especies reactivas de nitrógeno). Ejemplos: glutatión, α -tocoferol, bilirrubina y ácido úrico. Algunos agentes

Tabla 5. Algunos marcadores de estrés oxidativo.

Determinación	Fundamento
Niveles plasmáticos de malondialdehído	El malondialdehído se forma como producto de la lipoperoxidación. A través de su reacción con el ácido tiobarbitúrico se forma un derivado cuantificable por colorimetría.
Alcanos exhalados	La oxidación de los ácidos grasos insaturados presentes en las membranas da como productos alcanos como el etano, el propano y el pentano.
Grupos carbonilo en el plasma	Se cuantifican por colorimetría, a través del producto de reacción entre la 2,4-dinitrofenilhidrazina y los grupos carbonilo generados por oxidación de biomoléculas.

antioxidantes de bajo peso molecular que provienen de la dieta, especialmente la vitamina C y el α -tocoferol, están íntimamente relacionados con la nutrición y la defensa antioxidante.

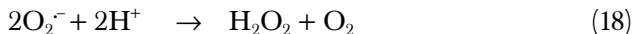
Debido a que la producción de ERO ocurre espontáneamente en los organismos aerobios, se hace necesario la presencia de un sistema de defensa que contrarreste los efectos oxidantes de estas especies. Este sistema de defensa para su posterior explicación puede ser dividido en dos partes: Agentes antioxidantes de alto peso molecular y agentes antioxidantes de bajo peso molecular. A continuación, se dan sus principales características:

Agentes antioxidantes de alto peso molecular

Superóxido dismutasa (SOD): Cu-Zn SOD y Mn SOD

Es una enzima que se encuentra en el citoplasma (Cu-Zn SOD), mitocondria (Mn-SOD) y en el fluido extracelular (Cu-Zn SOD).

La SOD cataliza la conversión del anión superóxido a peróxido de hidrógeno:

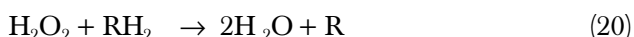


Catalasa (CAT)

Esta enzima se encuentra en las mitocondrias y los peroxisomas, y cataliza la reducción del peróxido de hidrógeno a agua:



Cabe mencionar que esta enzima también tiene actividad de peroxidasa:



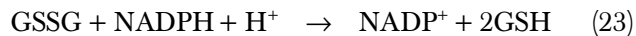
Glutación peroxidasa (GPx)

Es una selenoenzima presente en varias isoformas, entre las que se encuentran la GPx citosólica, la GPx plasmática y la GPx de fosfolípidos. Es posible encontrarla en citoplasma, mitocondria y membrana plasmática. Esta enzima cataliza la reducción de peróxidos empleando dos moléculas de glutación reducido (GSH). Los productos de la reacción son el glutación oxidado (GSSG) y el agua.



Glutación reductasa (GRs)

Es una enzima que se encuentra en citoplasma y tiene a la coenzima FAD en su sitio activo. Esta enzima cataliza la reducción de GSSG empleando la coenzima NADPH:



Aparentemente el NADPH reduce el FAD, el cual transfiere dos electrones a la unión disulfuro (-S-S-) entre dos residuos de cisteína del sitio activo. Los dos grupos -SH formados interactúan entonces con el GSSG reduciéndolo a dos moléculas de GSH.

Glutación S-transferasa (GST)

Hasta el momento se han encontrado las isoformas GST citosólicas y GST microsomales. Las GST citosólicas están divididas en cuatro familias principales: α , μ , π y θ , y en cuatro familias minoritarias: ζ , σ , κ y ω . Las GST citosólicas están constituidas por dos subunidades proteínicas idénticas, mientras que las GST microsomales son trímeros (Sharma, Yang, Sharma, Awasthi y Awasthi, 2004)

Su función primaria es catalizar la conjugación de GSH con una gran cantidad de compuestos orgánicos (RX). La reacción general de esta enzima es:



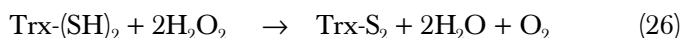
Se ha demostrado que las GST pueden reducir hidroperóxidos de lípidos por medio de una actividad de glutación peroxidasa independiente de selenio y que estas enzimas también pueden detoxificar al 4-hidroxinonal un producto de la peroxidación de lípidos.

Tiorredoxina (Trx)

Es un polipéptido con un peso molecular de 12 kDa, especialmente distribuido en el retículo endoplásmico (Nakamura, 2005). Esta proteína contiene dos grupos tiol adyacentes en su forma reducida (SH) que se pueden oxidar a su forma disulfuro (S_2 o S-S):



De acuerdo con la reacción anterior, la Trx puede suplir los electrones en diversas reacciones de óxido-reducción, de la misma manera puede reaccionar directamente con el peróxido de hidrógeno. Por estas razones se considera que la Trx es una proteína antioxidante.



Tiorredoxina reductasa (TrxR)

Es una selenoproteína que contiene en su penúltimo carbono un residuo de selenocisteína, necesario para su actividad catalítica. Existen dos isoformas: la TrxR1 citosólica y la TrxR2 mitocondrial, razón por la cual se ubica principalmente en el citosol y la mitocondria (Nordberg y Arner, 2001). Las dos isoformas son homodiméricas con un FAD por subunidad, el cual reduce el grupo disulfuro del sitio activo. Su función

es catalizar la reducción del polipéptido tiorredoxina (Trx):



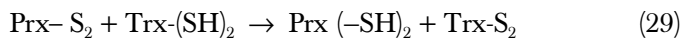
Peroxirredoxinas (Prxs)

Este grupo de enzimas se caracteriza por poseer residuos de cisteína en su centro catalítico, lo cual las identifica como enzimas antioxidantes específicas para el grupo tiol. Los grupos cisteínas son oxidados a ácido sulfénico en forma reversible por los sustratos de estas enzimas (peróxidos). Están subdivididas en tres subclases: Prx 2-cisteína típica (Prx I-IV), Prx 2-cisteína atípica (Prx V) y Prx 1-cisteína (Prx VI). Su localización varía en función de la subclase. Suelen encontrarse en el citoplasma, peroxisoma y mitocondria (Prx I y V), núcleo y citoplasma (Prx II), citoplasma y lisosomas (Prx IV), mitocondria (Prx III), citoplasma (Prx VI) (Im-menschuh y Baumgart-Vogt, 2004).

Están envueltas en la degradación enzimática de peróxido de hidrógeno, hidroperóxidos y peroxinitrito, por lo tanto, las Prxs asumen un papel importante contra el estrés oxidativo.

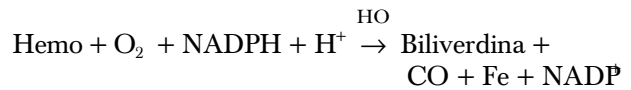


La tiorredoxina puede regenerar la forma reducida de las Prx



Hemo oxigenasa (HO)

Esta enzima está presente en dos isoformas: una constitutiva (HO-2) y una inducible (HO-1). Se localiza en el retículo endoplásmico. La HO cataliza el paso limitante de la degradación del grupo hemo proveniente de las hemoproteínas, produciendo biliverdina, monóxido de carbono y hierro. La biliverdina es reducida a bilirrubina por la biliverdina reductasa (BR) (Barrera y cols., 2003).



La expresión de HO-1 aumenta en respuesta a muchos agentes que inducen estrés oxidativo como lo es el mismo grupo hemo. La actividad antioxidante de la HO-1 se puede explicar, al menos en parte, por el hecho de que esta enzima degrada a un prooxidante (grupo hemo) y genera un compuesto con actividad antioxidante (biliverdina) el cual es transformado a otro antioxidante (bilirrubina).

Agentes antioxidantes de bajo peso molecular

En la tabla 6 se muestran algunas de las principales características de antioxidantes de bajo peso molecular. Es importante señalar que tanto la vitamina C como la vitamina E son obtenidos de la dieta. De la misma manera, se conocen otros antioxidantes que son obtenidos también de algunos alimentos, principalmente frutas y verduras, y que contribuyen a prevenir el estrés oxidativo, por ejemplo compuestos caroteneoides como el licopeno, la luteína y el β-caroteno y compuestos fenólicos como los flavonoles, flavonas, flavononas, antocianidinas, y fenilpropanoides

Determinación de ERO: radical superóxido y peróxido de hidrógeno (Tarpey, Wink y Grisham, 2004)

A lo largo de esta revisión ha quedado de manifiesto la importancia de los RL y ERO. Es importante destacar que no todas las ERO aumentan necesariamente en un proceso oxidativo o en un estado patológico. Por lo tanto es importante precisar cuál o cuáles son las ERO que están involucradas

Tabla 6. Características generales de algunos compuestos de bajo peso molecular que integran al sistema antioxidante (Halliwell y Gutteridge, 1999).

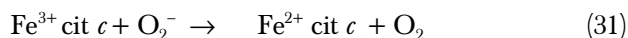
Compuestos hidrosolubles	Compuestos liposolubles
<i>Vitamina C.</i> También se conoce con el nombre de ácido ascórbico. Se localiza en el citosol y en los fluidos extracelulares. Tiene la capacidad de aceptar electrones y reaccionar directamente con el anión superóxido y el radical hidroxilo.	<i>Vitamina E:</i> La isoforma más abundante es el α-tocoferol. Es el antioxidante más distribuido en los seres vivos. Se encuentra en las membranas biológicas y tiene la capacidad de interrumpir la lipoperoxidación en la fase de propagación.
<i>Glutación.</i> El glutatión reducido protege los grupos sulfhidrilo de las proteínas de la acción antioxidante de los RL y tiene la capacidad de reaccionar con el peróxido de hidrógeno, el anión superóxido y el radical hidroxilo.	<i>Vitamina A:</i> Se encuentra en las membrana se impide la lipoperoxidación al reaccionar principalmente con el ¹ O ₂ y el OH.
<i>Ácido úrico.</i> Es producto final del metabolismo de las purinas en los primates y funciona como un buen atrapador de RL. Cuando el ácido úrico reacciona con ERO (RO ₂ [·] , OH [·] , O ₃ [·] , NO ₂ [·] y ¹ O ₂) se generan alantoína, ácidos cianúrico y parabénico y otros productos. Además, algunos informes sugieren que el ácido úrico forma complejos con los metales de transición cuando interacciona con el ascorbato.	<i>Bilirrubina.</i> Es el producto de degradación del grupo hemo en mamíferos; su precursor es la biliverdina. Es un poderoso atrapador de radicales peroxilo y de ¹ O ₂ . La bilirrubina unida a la albúmina protege a esta última molécula contra el daño por RL.

das en algún proceso oxidativo o enfermedad. Dicha información es importante para conocer más a fondo el mecanismo del daño y puede ser muy importante para tratar de establecer una terapia con un antioxidante que neutralice dicha ERO con el propósito de detener el daño oxidativo. Esto es importante en el contexto de que no se conoce aún un antioxidante “universal” que prevenga todo tipo de daño oxidativo. Algunos de estos métodos descritos a continuación para identificar a alguna ERO, también pueden ser usados para estudiar y caracterizar el potencial antioxidante de alguna sustancia o extracto. Por lo anterior es importante contar con métodos que nos permitan identificar y cuantificar dichas especies.

Detección del superóxido

Reducción del citocromo *c*

Este método se basa en la reducción de ferricitocromo *c* (Fe^{3+} cit *c*) a ferrocitocromo *c* (Fe^{2+} cit *c*) razón por la cual ha sido utilizado para medir el tiempo de formación del superóxido por numerosas enzimas, células y tejido vascular. La reacción es:



La reducción del citocromo se cuantifica espectrofotométricamente a 550 nm, utilizando un coeficiente de extinción molar para el ferricitocromo *c* de $0.89 \times 10^4 \text{ M}^{-1}/\text{cm}^{-1}$.

Inhibición de aconitasa

Las alteraciones en la actividad de la aconitasa han sido utilizadas como un indicador sensible de los cambios en la actividad del superóxido *in vivo* e *in vitro*. La aconitasa cataliza la interconversión de citrato a isocitrato y está presente tanto en el citosol como en la mitocondria. El superóxido, inactiva a la aconitasa debido a la oxidación seguida por la pérdida reversible de hierro (el cual es el cofactor de la enzima); por lo tanto, con la formación de superóxido, una fracción de la aconitasa en algún momento es inactiva, pero capaz de reactivarse, así la relación de aconitasa inactiva/aconitasa activa es un indicador de la producción de superóxido.

Oxidación de hidroetidina

La hidroetidina (HE) es un compuesto permeable a las células que puede transferir dos electrones al superóxido provocando la oxidación de la hidroetidina. La reacción es relativamente específica para superóxido, con una mínima oxidación del compuesto inducida por la presencia de peróxido de hidrógeno o ácido hipocloroso. La oxidación intracelular de HE a etidio por el superóxido puede analizarse por citometría de flujo en suspensiones celulares y por microfluorimetría *in vivo* en cortes de tejidos y sangre.

Reacciones de quimioluminiscencia

Los métodos de quimioluminiscencia para la detección de superóxido han sido frecuentemente empleados porque son potencialmente accesibles a los sitios intracelulares donde es generado este radical, por lo cual son altamente específicos. El compuesto quimioluminiscente utilizado más ampliamente es la lucigenina, aunque ya se han desarrollado otros compuestos como la coelenterazina y el 2-metil-6-[4-metoxifenil]-3,7-dihidroimidazo[1,2- α]pirazin-3-ona (MCLA) que se utilizan para medir la formación de superóxido en neutrófilos, macrófagos, cultivos celulares y tejido vascular

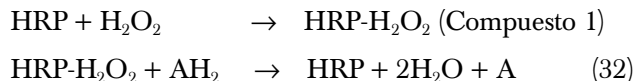
Resonancia del espín electrónico y atrapamiento del espín

La espectroscopía por resonancia de electrón-espín (RES) también conocida como Resonancia paramagnética electrónica (RPE), es un método analítico que permite la detección directa de los radicales libres. Cabe mencionar de manera general, que esta técnica se basa en las propiedades magnéticas de los electrones no apareados y su ambiente molecular. Los electrones desapareados pueden existir en dos orientaciones en paralelo o antiparalelo con respecto al campo magnético aplicado; por ello es posible observar diferencias de energías en los estados correspondientes a la región de microondas del espectro electromagnético; así se pueden diferenciar especies tal como el NO^\cdot , superóxido y radical hidroxilo en sistemas biológicos en bajas concentraciones.

Detección de peróxido de hidrógeno

Ensayos ligados a peroxidasa de raíz fuerte (HRP)

Estos ensayos dependen de la oxidación de un compuesto donador de átomos de hidrógeno. Así, bajo la presencia de peróxido de hidrógeno, los donadores de átomos de hidrógeno son oxidados por la HRP:



La cantidad de peróxido de hidrógeno presente se mide por la disminución de la fluorescencia de un compuesto fluorescente como la escopoletina, o bien observando el aumento de la fluorescencia de un donador de átomos de hidrógeno, previamente no fluorescente, como la diacetildiclorofluoresceína, p-hidroxifenilacetato, ácido homovainílico y el rojo de fenol.

Fluorescencia de la diclorofluoresceína

La oxidación de la 2-7-diclorofluoresceína (DCFH) al compuesto fluorescente 2-7-diclorofluoresceína oxidada (DCF) por la presencia de peróxido de hidrógeno, permite utilizar esta reacción como indicador específico de la formación de

esta especie reactiva. Este método se utiliza ampliamente en la detección de peróxido de hidrógeno en neutrófilos. La fluorescencia producida por la DCF se mide a 498 nm de excitación y 522 nm de emisión.

Inhibición de la catalasa por el aminotriazol

El aminotriazol es un inhibidor irreversible de la catalasa, que reacciona con el complejo intermediario H_2O_2 -catalasa, por ello inhibe a la catalasa sólo en presencia de peróxido de hidrógeno; de ahí que esta reacción pueda utilizarse como indicador de la presencia de H_2O_2 .

Conclusiones

Las ERO son producidas continuamente en nuestro organismo como parte del metabolismo celular. Nuestras células están equipadas con sistemas antioxidantes de defensa que le permiten mantener en bajas concentraciones dichas especies y así evitar el daño oxidativo sobre las macromoléculas biológicas. La excesiva producción de ERO por los fagocitos juega un papel fisiológico muy importante en la protección del organismo contra muchas infecciones. Así, las ERO constituyen verdaderas armas químicas para la destrucción de los agentes infecciosos. Sin embargo, cuando se pierde el equilibrio oxidante-antioxidante y se genera estrés oxidativo se dañan macromoléculas esenciales para llevar a cabo las funciones normales de una célula lo cual se puede traducir en diversos procesos patológicos.

Algunos ejemplos de patologías asociadas al estrés oxidativo que aquejan al ser humano y que actualmente se han vuelto tan comunes son: artritis reumatoide, aterosclerosis, diabetes, cáncer, hipertensión, enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer y Parkinson, degeneración de la retina, etcétera. Dado que es muy difícil de evitar el estrés oxidativo con la vida actual que llevamos donde en las grandes ciudades predominan factores que agravan o incluso inducen el estrés oxidativo (por ejemplo, contaminantes del aire y radiaciones) es necesario seguir estudiando la actividad de muchas sustancias que ya se conocen por tener propiedades antioxidantes e incluso fomentar su consumo (por ejemplo aquellas que se encuentran en frutas, verduras y algunas plantas) ya que en muchos casos una dieta pobre en antioxidantes contribuye al daño oxidativo. ■

Agradecimientos

Este trabajo fue posible gracias a los donativos del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt, 40009-M) y de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA, PAPIIT IN227103) de la UNAM.

Referencias

- Barrera, D. Maldonado, P.D. Medina-Campos, O.N. Hernandez-Pando, R. Ibarra-Rubio, M.E. Pedraza-Chaverri, J., HO-1 induction attenuates renal damage and oxidative stress induced by $K_2Cr_2O_7$, *Free Radic. Biol. Med.*, **34**, (11), 1390-1398, 2003.
- Chirino, Y.I. Hernandez-Pando, R. Pedraza-Chaverri J., Peroxynitrite decomposition catalyst ameliorates renal damage and protein nitration in cisplatin-induced nephrotoxicity in rats, *BMC Pharmacol.*, **4**, (1), 20, 2004.
- Eberhardt, M. K., *Reactive oxygen metabolites. Chemistry and medical consequences*, CRC Press, Florida, USA, 2001.
- Halliwell, B., Gutteridge, M., *Free Radicals in Biology and Medicine*, Oxford University Press, Nueva York, USA, 3rd Ed., 1999.
- Hansberg, W., Biología de las especies de oxígeno reactivas, *Mensaje Bioquímico*, **26**, 19-54, 2002.
- Immenschuh, S. Baumgart-Vogt, E., Peroxiredoxins, oxidative stress, and cell proliferation, *Antiox. Redox Signal.*, **7**, (5-6), 768-777, 2005.
- Nakamura, H., Thioredoxin and its related molecules: update 2005, *Antiox. Redox Signal.*, **7**, (5-6), 823-825, 2005.
- Nordberg, J. Arner, ES., Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system, *Free Radic. Biol. Med.*, **31**, (11), 1287-1312, 2001.
- Sharma, R. Yang, Y. Sharma, A., Awasthi, S. Awasthi, YC., Antioxidant role of glutathione S-transferases: protection against oxidant toxicity and regulation of stress-mediated apoptosis, *Antiox. Redox Signal.*, **6**, (2), 289-291, 2004.
- Tarpey, M. Wink, D. Grisham, M. Methods for detection of reactive metabolites of oxygen and nitrogen: in vitro and in vivo considerations, *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, **286**, (3), R431-R440, 2004.

Bibliografía recomendada

- Hansberg, W., La biología del dioxígeno en singulete, *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, **2**, (2), 47-55, 1999.