



DEBATES INTERNOS

LA PARADOJA DE LA AEROBIOSIS

¿POR QUÉ ES TÓXICO EL OXÍGENO?

María Cascales Angosto



CÁTEDRA
DE EMÉRITOS

de la Comunidad Valenciana



DEBATES INTERNOS

LA PARADOJA DE LA AEROBIOISIS ¿POR QUÉ ES TÓXICO EL OXÍGENO?

Maria Casanovi, Augusto

Edita: ©



DEHARITOS

de la Comunidad Valenciana

Fundación Valenciana de Estudios Avanzados

Autor:

© María Cascales Angosta

Coordinan:

Vicente López Merino

Concha Albalat Criado

Salvador Aldana Fernández

Antonio Alegre Cremades

I.S.B.N.: 84-609-7402-2

D. L.: V-3975-2005

Maquetación e impresión:

Gráficas Antolín Martínez. s.l.

Tel. 96 391 89 84 - www.grafamar.com

LA PARADOJA DE LA AEROBIOSIS ¿POR QUÉ ES TÓXICO EL OXÍGENO?

Introducción

El oxígeno molecular, vital para la existencia de los organismos aerobios, es inherentemente tóxico. Esta paradoja deriva de la misma naturaleza química del oxígeno. Animales, plantas y muchos microorganismos cuentan con el oxígeno para una eficiente producción de equivalentes energéticos en forma de ATP. La atmósfera de nuestro planeta fue anaerobia hasta el advenimiento del oxígeno hace unos 2.500 millones de años, como resultado de la rotura del agua en el proceso fotosintético de unas algas microscópicas cianofíceas. A partir de aquí y con el advenimiento de la fotosíntesis oxidativa, la acumulación progresiva del oxígeno hizo cambiar la atmósfera desde predominantemente reductora (rica en hidrógeno) o neutra (CO_2 y N_2), hasta contener un 21% del aire que respiramos. Esta progresiva elevación del oxígeno atmosférico estuvo acompañada por la formación de la capa de ozono en la estratosfera. Ambos oxígeno y ozono actuaron como filtros protectores de la intensa luz ultravioleta que llegaba a la Tierra procedente del Sol. En el Universo son el hidrógeno y el helio los elementos predominantes, siendo la Tierra un centro de oxidación en un medio reducido. Como el oxígeno es potencialmente tóxico su elevación en la atmósfera hizo que los organismos anaerobios se encontraran sometidos a una presión de selección que presentaba la gran ventaja de mayor energía útil derivada de los alimentos para realizar transformaciones metabólicas, destoxificar numerosos compuestos e incluso para generar luz y calor. Estas ventajas tenían un precio, la necesidad de generar sistemas de defensa frente a la considerable toxicidad de este gas paramagnético. Aquellos organismos que tuvieron éxito en el desarrollo de

las requeridas defensas pudieron sacar provecho de los beneficios y ello dio lugar a la enorme variedad de formas de vida aerobia tan evidentes hoy sobre la Tierra. Sin embargo, aquellos organismos que no pudieron acomodarse a la toxicidad del oxígeno evolucionaron como anaerobios microscópicos restringidos a nichos anaeróbicos.

El lado perjudicial del oxígeno se relaciona directamente con el hecho que cada átomo de oxígeno posee un electrón desapareado en su orbital externo y la molécula de oxígeno posee dos electrones desapareados, de manera que el átomo de oxígeno es un radical libre y la molécula de oxígeno un biradical libre. La reducción tetravalente concertada del oxígeno por la cadena de transporte electrónica mitocondrial para producir agua, se considera un proceso relativamente seguro; sin embargo, el ambiente reducido del medio intracelular proporciona amplias oportunidades para que el oxígeno sufra la reducción univalente que es la causante de la generación de los intermediarios reactivos. El radical superóxido, el peróxido de hidrógeno y el radical hidroxilo son los subproductos de esta reducción univalente, denominados especies reactivas de oxígeno (ROS, Reactive oxygen Species), y responsables de la toxicidad del oxígeno.

Para sobrevivir en este ambiente aerobio poco favorable, los organismos vivos han desarrollado una serie de sistemas enzimáticos y una variedad de compuestos antioxidantes hidro y liposolubles, cuyo papel es secuestrar, interceptar e inactivar las ROS que se sintetizan inevitablemente. La célula posee también la capacidad de sintetizar una serie de sistemas enzimáticos reparadores/eliminadores de la lesión en proteínas, lípidos y DNA. Como la intensidad del estrés oxidativo puede variar de un momento a otro, los organismos pueden adaptarse al estrés fluctuante induciendo en un determinado momento la síntesis de enzimas antioxidantes y reparadores cuya misión es evitar o eliminar la lesión.

Teóricamente los problemas de la aerobiosis terminarían aquí, pero desgraciadamente, la biología no es tan precisa. La realidad es que a pesar que la célula posee valiosos mecanismos antioxidantes y reparadores que representan una defensa eficiente frente a la agresión oxidativa, en determinadas ocasiones estos mecanismos no son suficientes y el daño oxidativo

permanece. El estrés oxidativo se ha visto involucrado en una amplia variedad de procesos degenerativos, enfermedades y síndromes que incluyen los siguientes: mutagenesis, aterosclerosis, infartos y lesiones derivadas de la isquemia/reperfusión, enfermedades crónicas inflamatorias, problemas agudos inflamatorios, estrés fotooxidativo ocular, alteraciones del sistema nervioso central, y una amplia variedad de alteraciones relacionadas con la edad, incluyendo los mismos procesos del envejecimiento.

La naturaleza radical del oxígeno

El metabolismo aerobio confiere gran energía; sin embargo, este beneficio tiene un precio, el potencial daño oxidativo que ocasionan los subproductos de la cadena respiratoria mitocondrial.

La paradoja del oxígeno deriva de su naturaleza de radical que le permite reacciones químicas de oxidación/reducción. El oxígeno molecular, ese elemento imprescindible para la vida aerobia muestra gran avidez por los electrones (e^-). En la reducción univalente el oxígeno sufre cuatro sucesivas reducciones con un electrón, catalizadas por la citocromo oxidasa de la

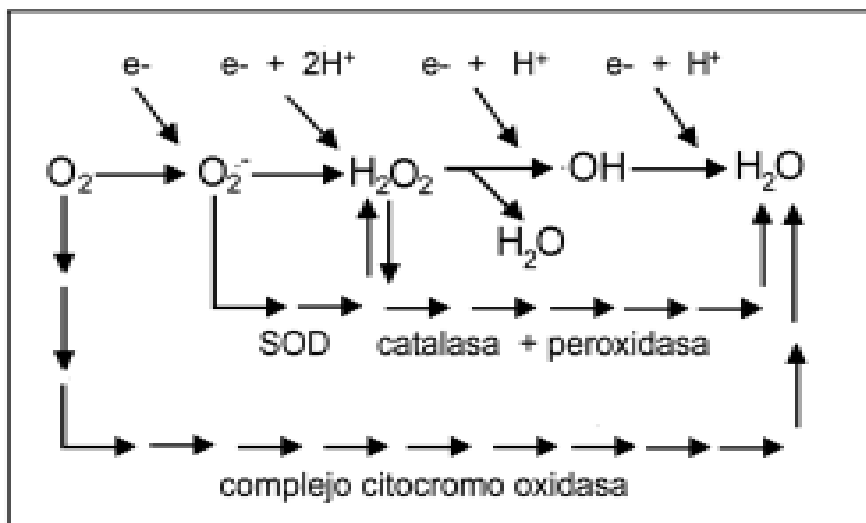


Figura 1.- Formación de especies reactivas de oxígeno por adición de electrones a la molécula de oxígeno

cadena de transporte electrónico mitocondrial. En esta vía se generan los intermediarios reactivos siguientes: el primero es el radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), resultante de la reducción del oxígeno molecular con un electrón; el segundo es la especie activa peróxido de hidrógeno (H_2O_2), resultante de la adición de un segundo electrón y dos protones; el tercero es el radical hidroxilo ($\cdot OH$), que posee una elevada reactividad, resultante de la incorporación de un tercer electrón y un protón. El cuarto electrón y otro protón genera la molécula de agua (Figura 1).

Es interesante destacar que el O_2 y el $O_2^{\cdot-}$ son radicales de oxígeno (O_2 es un biradical y $O_2^{\cdot-}$ es un monoradical), mientras que el H_2O_2 , a pesar de ser una especie reactiva de oxígeno, no es un radical ya que todos los electrones de su orbital externo se encuentran apareados (Figura 2). El radical hidroxilo ($\cdot OH$) es una verdadera especie radical. Las especies de oxígeno actúan como oxidantes biológicos, pero el $O_2^{\cdot-}$ es un reductor suave, aunque la simple adición de un protón lo convierte en un agente oxidante activo ($HO_2\cdot$). Sin embargo, el potencial redox del $\cdot OH$ a unos 1,77 V, marca claramente a este radical como una especie muy oxidante. El oxígeno singlete ($^1O_2$) no se genera por reacciones redox, sino por absorción de energía electromagnética, la cual invierte transitoriamente el giro (spin) de uno de los dos electrones desapareados del oxígeno, de modo que los giros de los dos electrones desapareados muestran una orientación antiparalela. El oxígeno molecular, estado basal o triplete, es incapaz de aceptar dos electrones directamente, reducción bivalente, porque la adición de un par de electrones antiparalelos se encuentra restringida por los giros paralelos del estado basal (Figura 3). El oxígeno singlete, sin embargo, con sus giros electrónicos antiparalelos no tiene tales restricciones en su reactividad y es muy buen oxidante bivalente frente a muchas biomoléculas. La absorción de grandes cantidades de energía electromagnética por el oxígeno molecular para generar oxígeno singlete se encuentra restringida a acontecimientos fotoquímicos. El interés en el oxígeno singlete se centra principalmente en aquellos relacionados con la química ambiental, biología vegetal y reacciones oxidativas en tejidos expuestos al medio ambiente, como la piel y el ojo. El oxígeno singlete es muy inestable y se convierte en oxígeno molecular, basal en estado triplete, con

una vida media de 2 - 7 μ segundos, emitiendo luz en su descomposición.



Figura 2.- Disposición de los electrones en los subproductos de la reducción del oxígeno

La rotación de cargas eléctricas genera campos magnéticos. La mayoría de sustancias no se encuentran influenciadas por campos magnéticos porque los electrones que poseen se encuentran en parejas de giro opuesto. El emparejamiento de electrones con giros opuestos neutraliza este efecto. Tales sustancias son diamagnéticas. Esto no ocurre con el oxígeno, que posee espines electrónicos desapareados que tienen el mismo sentido de rotación. Esta estructura electrónica es paramagnética y constituye una barrera para la inserción de una pareja de electrones (Figura 3)

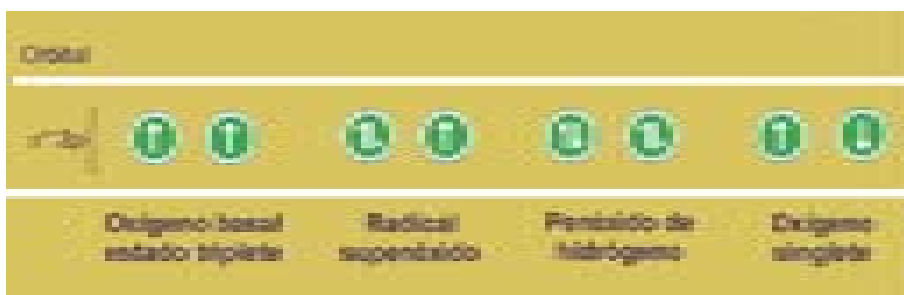


Figura 3.- Rotación de los electrones en el orbital $\pi^* 2p$ en el oxígeno basal estado triplete, radical superóxido, peróxido de hidrógeno y oxígeno singlete

Toxicidad del oxígeno

El elemento oxígeno existe en el aire que respiramos en forma molecular O_2 . Fue descubierto, aislado y caracterizado independientemente por Priestley y Scheele en 1774 y poco tiempo después Lavoisier describió que la inhalación del oxígeno podía presentar efectos tóxicos. Aunque se conoce

desde hace décadas que la terapia del oxígeno puede resultar beneficiosa en muchas situaciones patológicas, los tratamientos prolongados pueden suponer un riesgo de toxicidad. Binger et al (1927) reconocieron que los estudios clásicos de Bert en 1878 fueron el primer documento que demostró que el oxígeno a elevadas concentración era un veneno potente, que conducía a convulsiones y a la muerte de animales de laboratorio. En 1899 Lorrain Smith describió que elevadas tensiones de oxígeno producían congestiones pulmonares severas en ratones, ratas y cobayas. Toda esta información ha sido ignorada a pesar de los numerosos estudios sobre la toxicidad del oxígeno que han circulado entre 1899 y 1945. La aceptación final de la toxicidad del oxígeno no llegó hasta 1967 cuando Nash et al., relacionaron la concentración y duración del oxígeno inhalado con la patología del pulmón. Ya en 1954 Gersman et al habían emitido la hipótesis que el envenenamiento por oxígeno y la irradiación X tenían una base de acción común, que era a través de la formación de radicales libres de oxígeno.

El 95% del oxígeno que ingresa en el organismo sufre la reducción secuencial concertada con cuatro electrones para producir agua, en una reacción catalizada por la citocromo oxidasa (citocromo c:oxígeno oxidore-

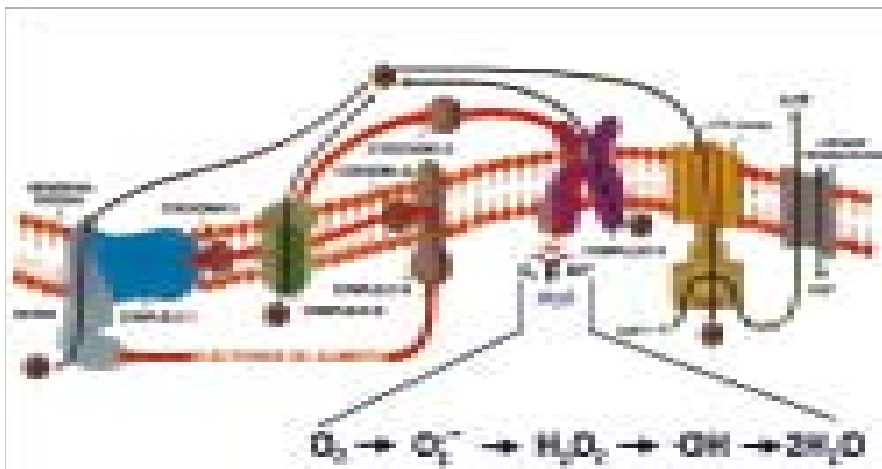


Figura 4.- Radical superóxido, peróxido de hidrógeno y radical hidroxilo: los tres subproductos de la reducción del oxígeno por la citocromo c oxidasa de la cadena respiratoria mitocondrial.

ductasa) del complejo IV de la cadena de transporte electrónico mitocondrial. La citocromo oxidasa es el aceptor de electrones terminal en la cadena y debe ceder sus equivalentes reductores al oxígeno para poder continuar el transporte electrónico (Figura 4). Si se detuviese el flujo de electrones a través de la cadena respiratoria, se dispararía la fuerza motora de protones y la síntesis del ATP no podría continuar. Por tanto, el papel principal del oxígeno en todos los organismos aerobios es actuar simplemente como un vertedero para los electrones. Por cada molécula de oxígeno que se convierte en agua se genera una energía de 105 kcalorías. Por tanto, la vida aerobia utiliza el oxígeno para oxidar sustratos ricos en carbono e hidrógeno (alimentos), con el objeto de obtener energía química (ATP) y calor, esenciales para la vida.

Aunque la cadena de transporte electrónico mitocondrial es un sistema muy eficiente, la naturaleza de la alternancia de las reacciones de oxidación/reducción monovalentes que cataliza (generando una constante y alternativa serie de radicales enjaulados), predispone a cada transportador de electrones a reacciones laterales con el oxígeno molecular.

Las especies reactivas de oxígeno reaccionan con las macromoléculas celulares, bien lesionándolas directamente (DNA) o por reacción en cadena donde el radical se trasfiere de una molécula a otra con lo cual se lesionan las estructuras celulares (lipoperoxidación).

Especies reactivas de oxígeno (ROS)

Radical superóxido

Si un electrón es aceptado por el estado basal del oxígeno molecular, ha de entrar en uno de los orbitales π^* . El producto es el radical superóxido, que posee un electrón desapareado (Figura 2) y se genera en la cadena de transporte electrónico mitocondrial como primer producto de reducción del oxígeno. Los fagocitos también producen radical superóxido como primer producto del estallido respiratorio.

Peróxido de Hidrógeno.

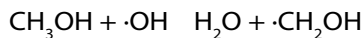
La adición de un segundo electrón origina el ión peróxido, que no es un radical porque no posee electrones desapareados (Figura 2). El ión peróxido

formado a pH fisiológico se protona inmediatamente para dar el peróxido de hidrógeno. El peróxido de hidrógeno se forma también por dismutación del radical superóxido. La velocidad de la dismutación es más rápida a pH ácido.

Radical hidroxilo

La fisión homolítica del enlace O-O del peróxido de hidrógeno produce dos moléculas de radical hidroxilo, $\cdot\text{OH}$. La homolisis puede conseguirse por calor o por radiaciones ionizantes. Una simple mezcla de peróxido de hidrógeno y cualquier sal de hierro bivalente también forma el radical $\cdot\text{OH}$, según la reacción de Fenton. Las sales de cobre monovalente también reaccionan con el peróxido de hidrógeno y generan $\cdot\text{OH}$ a mayor velocidad que las sales de hierro. El radical hidroxilo reacciona a velocidades extremadamente elevadas con cualquier tipo de moléculas en la célula viva, azúcares, aminoácidos, fosfolípidos, bases del DNA, ácidos orgánicos, proteínas, etc. Sus reacciones son de varios tipos:

- (a) sustracción de un átomo de hidrógeno; por ejemplo en el metanol que pasa a radical metílico,



- (b) adición de un átomo de hidrógeno; por ejemplo al anillo aromático de bases del DNA,

- (c) transferencia electrónica, por ejemplo, con el ión Cl^-



La reactividad de $\cdot\text{OH}$ es tan grande que reacciona inmediatamente con cualquier molécula que se encuentre en su vecindad, produciendo radicales secundarios de reactividad variable. En presencia de sales de Cu^+ o Fe^{2+} el peróxido de hidrógeno genera $\cdot\text{OH}$. Por eso el organismo posee sistemas para eliminar el peróxido de hidrógeno, que aunque per se no es muy agresivo si lo es cuando reacciona en determinadas condiciones.

Efectos lesivos de las ROS sobre las células.

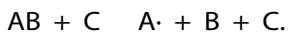
Fue en 1954 cuando Gersman et al., describieron por primera vez, que los efectos tóxicos del oxígeno se debían a la formación de radicales libres de

oxígeno. Posteriormente, la propuesta de McCord y Fridovich en 1969, acerca de que la formación de los radicales de oxígeno era una parte integral del metabolismo normal de la célula, no fue tomada muy en serio. Ya no existe duda de la participación de las especies reactivas del oxígeno en numerosos procesos fisiológicos y patológicos.

Los radicales libres se caracterizan por iniciar reacciones en cadena, reacciones ~~auto~~propagadoras en las cuales un radical reactivo origina un producto que es también un radical y que a su vez reacciona y origina otro radical. Esta fase química se conoce como propagación y una última fase, terminación, es aquella en la que reaccionan dos radicales dando un compuesto no radical. Por tanto, las reacciones originadas por los radicales libres en sus reacciones en cadena, pueden dividirse en:

INICIACIÓN, PROPAGACIÓN y TERMINACIÓN.

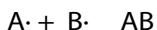
En las reacciones de iniciación, un radical se forma a partir de una especie química estable no radical:



En la propagación, un radical libre reacciona con una molécula estable



En la terminación dos radicales libres comparten sus electrones desapareados y originan un producto estable:



La reactividad química de los radicales libres se determina por la molécula que posee el electrón desapareado, por consiguiente, la reactividad varía enormemente entre los diferentes radicales libres. Una manera de expresar y comparar la reactividad química es evaluando la vida media ($t_{1/2}$) de las especies químicas.

La vida media más corta la poseen los radicales de elevada reactividad, lo que indica que los radicales $\cdot OH$ son los más reactivos. La formación de $\cdot OH$ implica reacción con cualquier molécula orgánica cercana. Otras especies reactivas producidas en condiciones normales no son radicales libres, pero

poseen elevada reactividad, como es el oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$), estado de oxígeno excitado electrónicamente, con una vida media de 5×10^{-6} segundos, y el poderoso oxidante peroxinitrito (ONOO^-) con vida media de 0,05 - 1 segundos (Tabla 1)

A pesar de su naturaleza biradical, la molécula de oxígeno es, desde el punto de vista químico, bastante estable y se ha descrito como radical perezoso con poca capacidad para reaccionar con las moléculas orgánicas. La mayoría de las biomoléculas aisladas, proteínas, azúcares, DNA y algunos lípidos son estables por largos períodos de tiempo en presencia del oxígeno de nuestra atmósfera. Esto se debe a la rotación paralela de sus dos electrones desapareados. La activación del oxígeno basal triplete puede verificarse por dos mecanismos diferentes: absorción de energía suficiente para revertir el giro de uno de los electrones desapareados, con formación de oxígeno singlete, o la reducción monovalente de la cadena de transporte electrónica mitocondrial. El oxígeno singlete es mucho más reactivo hacia las moléculas orgánicas que el oxígeno basal triplete. Sin embargo el oxígeno basal es bastante reactivo para combinarse con los átomos de hierro de la hemoglobina y la citocromo oxidasa (constantes de reacción de segundo orden 10^7 - $10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$), para proporcionar las bases químicas para el transporte y respiración del oxígeno.

Son diversas las fuentes endocelulares de ROS en las células (Figura 5). Así, las mitocondrias, presentes en todas las células aerobias, son la fuente biológica más importante del anión superóxido que se dismuta, por acción de la superóxido dismutasa dependiente de manganeso (Mn-SOD), localizada principalmente en la matriz mitocondrial. La forma semiquinona de dos componentes de la cadena respiratoria mitocondrial, la ubisemiquinona y la flavin semiquinona de la NADH- deshidrogenasa, producen $\text{O}_2^{\cdot -}$ por autooxidación en una reacción vectorial dirigida a la matriz mitocondrial. El radical superóxido no puede atravesar la membrana mitocondrial interna y se encuentra confinado en la matriz donde la Mn-SOD y el $\text{NO}^{\cdot}$ son los agentes que reaccionan con él dando lugar a peróxido de hidrógeno y peroxinitrito como productos finales, respectivamente, en dos reacciones muy rápidas controladas por difusión. La producción mitocondrial de $\text{O}_2^{\cdot -}$ se

cifra en condiciones normales, en un 2% del oxígeno total incorporado por la mitocondria en hígado y corazón perfundidos de rata.

Tabla 1.- Vida media de radicales libres en sistemas biológicos (Boveris, 1998)

Radical libre	$t_{1/2}$ segundos
Radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$)	
Radical alcoxilo ($\text{RO}\cdot$)	
Radical peroxilo ($\text{ROO}\cdot$)	
Óxido nítrico ($\text{NO}\cdot$)	
Ubisemiquinona ($\text{UQH}\cdot$)	→
Melaninas (Complejo)	
Semiquinonas (Complejo)	

El retículo endoplásmico, por autooxidación de la flavoproteína NADPH citocromo P450 reductasa y el citocromo P-450, produce $\text{O}_2^{\cdot-}$ y H_2O_2 . En hepatocitos, por ejemplo, su bien desarrollado retículo endoplásmico a través de sus monooxigenasas de función mixta, proporciona una fuente importante de anión superóxido. Los peroxisomas generan H_2O_2 en el núcleo del peroxisoma por transferencia de dos electrones desde las flavina oxidasas al oxígeno.

La NADPH oxidasa, ubicada en la membrana de las vacuolas fagocíticas, genera cantidades importantes de radical superóxido cuando los fagocitos (neutrófilos y macrófagos) se activan por causas patológicas. Este sistema fagocítico, al ser activado, experimenta el denominado “estallido respiratorio”, en el que se generan grandes cantidades de radical superóxido a partir del oxígeno molecular y electrones derivados de equivalentes reductores en forma de NADPH procedentes de la vía de las pentosas: $2\text{O}_2 + \text{NADPH} \rightarrow 2\text{O}_2^{\cdot-} + \text{NADP}^+ + \text{H}^+$

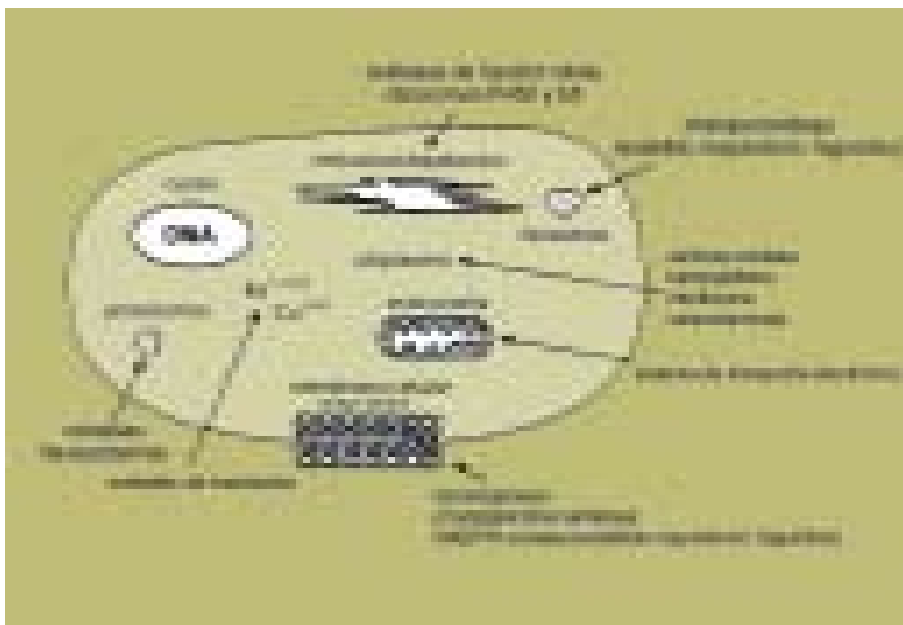


Figura 5. Sistemas celulares que generan especies reactivas de oxígeno

Este sistema cuenta con la participación de un complejo de proteínas, que por estrés oxidativo sufren modificaciones conformacionales, exponiendo distintos sitios de interacción proteica, que le permiten unirse a 2 proteínas integrantes de membrana. De esta manera queda formado un complejo proteico con actividad NADPH-oxidasa. La activación de este complejo está mediada por el sistema Ras. Las proteínas Ras forman parte de una superfamilia de proteínas con afinidad por GTP. Cuando Ras se une a GTP, se activa su GTPasa, se hidroliza un fosfato, y entonces Ras pierde afinidad por el nucleótido resultante GDP, y luego por la proteína activadora de su actividad GTPasa (GAP). La energía liberada durante este ciclo se usa para producir modificaciones conformacionales en distintos sistemas proteicos, que conducen a la activación de complejos enzimáticos. La activación de la NADPH oxidasa arriba mencionada se verifica en condiciones de estrés oxidativo provocado por invasión por patógenos, a través de un mecanismo regulado por Ras. Los radicales de oxígeno producidos por la NADPH oxidasa, contribuyen a la destrucción de agentes infecciosos de modo directo, o se combinan con haluros en presencia de la mieloperoxidasa dando lugar a agentes más reactivos, como el hipoclorito y oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$). Aunque

la producción de radicales libres de oxígeno por los fagocitos es útil para el organismo, en muchos procesos patológicos se produce infiltración secundaria de estas células del sistema inmune en los órganos afectados y son causa de un mayor agravamiento de la lesión. En nuestras investigaciones hemos observado que el bloqueo de la actividad de las células de Kupffer, macrófagos residentes en hígado, previo a la inducción de una lesión hepática por un agente hepatotóxico, disminuye de manera significativa la intensidad de la lesión hepática y la formación de peróxidos.

Otra fuente de ROS está relacionada con la xantina oxidasa (XO), presente en el citosol. La acumulación de hipoxantina y xantina, bajo condiciones anaeróbicas, de isquemia/ reperusión o de bajo contenido energético, puede desembocar en la producción de ROS, según la siguiente reacción:



El radical libre de nitrógeno

La molécula de nitrógeno se encuentra presente en la atmósfera que respiramos en un 79% y está formada por dos átomos de nitrógeno que como átomo libre, posee tres electrones desapareados ($1s^2, 2s^2, 2p_x, 2p_y, 2p_z$), que forman tres enlaces covalentes completos (σ y 2π) en la estable e inerte molécula de N_2 . Cuando un átomo de N con sus tres electrones desapareados, se combina con un átomo de oxígeno con sus dos electrones desapareados, la molécula resultante, NO, posee un número impar de electrones. Se forma un doble enlace completo $\text{N}=\text{O}$ y el electrón desapareado y deslocalizado es el que le da el carácter de radical libre al $\text{NO}\cdot$. El $\text{NO}\cdot$ es un radical libre desde el punto de vista físico por poseer un electrón desapareado, pero su carácter de radical libre químico es restringido porque no se le conoce ninguna reacción de propagación en sistemas condensados. Sin embargo, el $\text{NO}\cdot$ reacciona fácilmente con el $\text{O}_2^{\cdot -}$ para formar peroxinitrito en una reacción clásica de terminación.

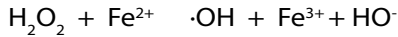
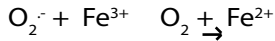
→

Reacción en cadena de las especies reactivas de oxígeno

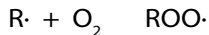
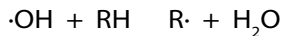
(a) Reacción de Fenton-Haber-Weis

La producción primaria de $\text{O}_2^{\cdot -}$ y H_2O_2 es capaz de iniciar y sostener una

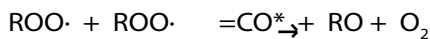
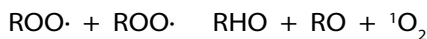
reacción en cadena en condiciones fisiológicas que abarcan las reacciones de lipoperoxidación. Las especies $O_2^{\cdot -}$ y H_2O_2 son los reactivos responsables de los procesos de iniciación de las reacciones siguientes:



En estas reacciones se genera $\cdot OH$ y se denominan de Fenton-Haber Weiss quienes describieron originalmente la descomposición del peróxido de hidrógeno por sales de hierro. Además, la acción protectora de la SOD y la catalasa se comprende que mantenga baja la tasa de generación del $\cdot OH$. El concepto se ha reconocido frecuentemente como el dogma Fridovich del efecto antioxidante de ambos SOD y catalasa. El $\cdot OH$ es capaz de iniciar las reacciones de propagación con ácidos grasos no saturados (RH) para generar hidroperóxidos estables, según las reacciones:



Los radicales peroxilos ($ROO^{\cdot}$) son capaces de sufrir reacciones de terminación con la formación de productos excitados electrónicamente, como el oxígeno singlete ($^1O_2$), aldehídos (ROH) y cetonas (RO) con grupos carbonilo excitados ($=C^*$):



Estas reacciones y la siguiente:

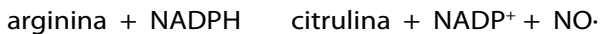


proporcionan, a través de quimioluminiscencia, las bases químicas y moleculares de un ensayo para determinar la tasa de reacción de lipoperoxidación por radicales libres en condiciones fisiológicas.

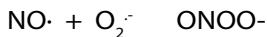
(b) Reacciones del radical libre de nitrógeno

El reconocimiento de la producción de óxido nítrico, por la óxido nítrico

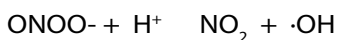
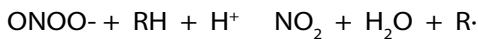
sintasa constitutiva (cNOS), como factor relajante del endotelio (ERF) y de la reacción del anión superóxido con el óxido nítrico, ha abierto un nuevo campo en la bioquímica de los radicales libres. El reciente descubrimiento de la producción de NO· por una NOS mitocondrial (mtNOS) localizada en la membrana interna de la mitocondria ha supuesto una revolución en términos, tanto de la regulación de la incorporación de oxígeno por los tejidos, como de la toxicidad de los radicales libres. El NO· está producido por una serie de NOS, la constitutiva (cNOS), la inducible (iNOS) y la mitocondrial (mtNOS), que comparten la propiedad común de utilizar arginina y NADPH como sustratos, según la reacción:



La reacción entre el anión superóxido y el óxido nítrico se comprende fácilmente si se considera que una colisión entre dos moléculas con electrones desapareados y deslocalizados, que dan lugar a la formación de enlace, tiene que ser mucho más rápida que una colisión molecular.



El ONOO⁻ es además capaz de sustraer átomos de hidrógeno de los ácidos grasos insaturados y de generar ·OH, e iniciar las reacciones de propagación de la peroxidación lipídica:



¿Qué es estrés oxidativo?

Estrés oxidativo es un término general utilizado para describir una sobrecarga oxidativa en la célula debida al exceso de especies reactivas de oxígeno, responsables de causar lesión en las macromoléculas celulares. Es un estado de la célula en la cual se encuentra alterada la homeostasis óxido-reducción intracelular, es decir el equilibrio entre prooxidantes y antioxidantes, que no sólo se produce a causa de una excesiva producción de especies reactivas de oxígeno, sino también por deficiencia en los mecanismos de defensa antioxidantes.

La mayoría de especies reactivas de oxígeno proceden de fuentes endógenas, como subproductos de reacciones metabólicas esenciales (generación de energía por la mitocondria, destoxificación dependiente del citocromo P-450, NADPH oxidasa fagocítica, xantina oxidasa, etc.), pero existen también fuentes exógenas de ROS entre las que cabe destacar, las radiaciones ionizantes, los contaminantes ambientales, infecciones bacterianas o víricas, alcohol, asbestos, etc.

El estado de oxidación de la célula está determinado por el equilibrio entre las parejas de óxido-reducción de los distintos compuestos biológicos presentes en ella, principalmente de aquellos que se encuentran en mayor proporción. El glutathione (GSH, γ -L-glutamyl-L-cysteinyl-glycine), debido su alta concentración intracelular (5-10 mM), se considera un regulador homeostático del estado de óxido-reducción celular. La forma reducida de este metabolito (GSH) predomina ampliamente sobre la oxidada (GSSG). Esto trae como consecuencia que un ligero desplazamiento del equilibrio hacia la forma oxidada afecte en gran manera el estado de óxido-reducción general, debido a su participación en muchos equilibrios de óxido-reducción acoplados. En particular esto es crítico para la regulación de algunos factores de transcripción, cuya actividad depende del estado de óxido-reducción en el que se encuentren. Cuando un grupo -SH crítico sufre una modificación oxidativa la proteína afectada puede perder su funcionalidad.

Sistemas de defensa antioxidante

La vida en presencia del oxígeno molecular exige contar con una batería múltiple de defensa antioxidante para hacer frente a las diversas ROS, bien impidiendo su formación o neutralizándolas una vez formadas. Halliwell define como antioxidante a toda sustancia que hallándose presente a bajas concentraciones con respecto a las de un sustrato oxidable (biomolécula), retrasa o previene la oxidación de dicho sustrato.

El antioxidante al colisionar con el radical libre le cede un electrón oxidándose a su vez y transformándose en un radical débil no tóxico y que en algunos casos, como la vitamina E, puede regenerarse a su forma primitiva por la acción de otros antioxidantes. No todos los antioxidantes actúan de esta

manera, los llamados enzimáticos catalizan o aceleran reacciones químicas que utilizan sustratos que a su vez reaccionan con los radicales libres.

De las numerosas clasificaciones de los antioxidantes, se recomienda adoptar la que los divide en: exógenos y endógenos. Si bien todos los organismos vivos soportan numerosos factores endógenos y exógenos que promueven la situación de estrés oxidativo, al mismo tiempo poseen numerosos sistemas de defensa antioxidantes regulables, enzimáticos y no enzimáticos.

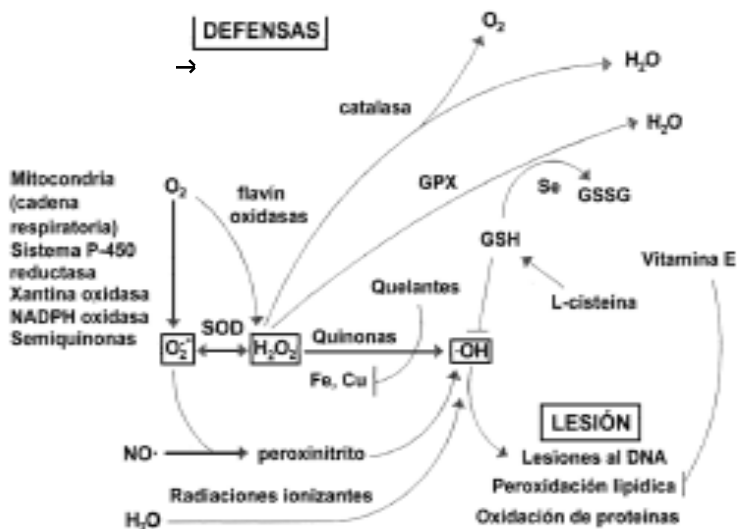
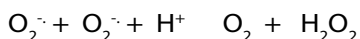
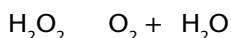


Figura 6.- Eliminación de las especies reactivas de oxígeno por los sistemas de defensa antioxidante. La acción concertada de estos sistemas: SOD, catalasa y glutathion peroxidasa se encuentra complementada por una serie de antioxidantes endógenos (GSH) y exógenos (Vitamina E).

Existen enzimas que actúan específicamente sobre determinadas especies reactivas. Así, la superóxido dismutasa elimina el radical superóxido con formación de peróxido de hidrógeno:



la catalasa transforma al peróxido de hidrógeno en agua:



La glutathion-peroxidasa cataliza la reducción de peróxidos (ROOH, inclusive al H_2O_2) a alcoholes (ROH), aprovechando el potencial reductor del GSH.



Existen otras enzimas, tales como las quinonas reductasas y hemo oxigenasa, que pueden también prevenir la formación de ROS.

La familia de las superóxido dismutasas (SOD) ha ido en aumento y ya se han descubierto al menos tres miembros además de las dos proteínas inicialmente detectadas (la Mn SOD mitocondrial y la Zn/ Cu- SOD citoplasmática, que dan cuenta del 100% de la actividad SOD intracelular). La Cu,Zn SOD citosólica, se inhibe por cianuro, su actividad representa el 90% de la actividad total. La MnSOD, mitocondrial se puede determinar por diferencia entre la actividad SOD total y la actividad SOD en presencia de cianuro.

Algunos metales, tales como el Se y el Zn, por su participación como cofactores de enzimas antioxidantes (GPX y SOD citoplasmática, respectivamente), contribuyen a aumentar las defensas antioxidantes.

La catalasa se encuentra en todos los órganos, pero especialmente en el hígado y en los eritrocitos. Localizada principalmente en peroxisomas, es una hemo proteína que tiene asociada una molécula de NADPH para estabilizar la molécula.

Entre las defensas antioxidantes no enzimáticas, tiene un lugar predominante el glutathion (GSH). Este tripéptido protege a la célula de las diferentes especies oxidantes y se ha comprobado su participación clave en numerosas enfermedades neurodegenerativas. Tanto el GSH como otras moléculas que contienen grupos -SH, tienen alto poder reductor y poseen propiedades antioxidantes, ya que pueden cederle un electrón a las ROS, disminuyendo de esta forma su reactividad. Se dice que este tipo de compuestos de bajo peso molecular actúan como "atrapadores" de radicales libres. Entre ellos podemos citar a la tioredoxina y a la vitamina C o ácido ascórbico (hidrosoluble) y a la vitamina E o alfa tocoferol (liposoluble, unida a membrana), etc..

La glutathion reductasa dependiente de NADPH, contribuye a las defensas antioxidantes, actuando en la regeneración del glutathion a su estado reducido. La tioredoxina reductasa y algunas proteínas, tales como las metalotioneína, ricas en residuos cisteínas, también participan en la restauración de los niveles de GSH reducido

Además de los mecanismos de protección antioxidante, enzimáticos y no enzimáticos, existen otros mecanismos que también contribuyen a paliar el posible daño oxidativo. Así, entre otros se pueden citar los siguientes:

(a) La presencia de los citocromos a-a3 en el complejo IV de la cadena respiratoria proporciona 4 sitios de transferencia de electrones para hacer más efectiva dicha transferencia y prevenir la formación de ROS.

(b) La gran compartimentalización celular, trae como consecuencia que las ROS y sus fuentes no siempre estén cerca de sus blancos de acción.

(c) Varios factores estructurales de los ácidos nucleicos favorecen su protección ante el estrés oxidativo: la cromatina compacta, la presencia de histonas, la formación de complejos.

Radicales de oxígeno como segundos mensajeros

Todas las células aerobias producen constitutivamente radicales de oxígeno y pequeñas cantidades de estos radicales se liberan por varios tipos celulares cuando son estimuladas por el factor de necrosis tumoral (TNF α) la interleuquina 1 (IL-1) y los ésteres del forbol. Todos ellos activan una forma citoplasmática del factor de transcripción NF κ B que resulta al eliminar una subunidad proteica inhibidora I κ B. Esta activación se inhibe por agentes que eliminan radicales de oxígeno y puede recuperarse mediante exposición a un débil estrés oxidativo.

Cada tipo celular genera especies reactivas de oxígeno de forma constitutiva, que en determinados casos pueden producirse en cantidad suficiente como para llegar a ser tóxicas. Algunas células sanguíneas, por ejemplo, son forzadas a sintetizar radicales de oxígeno durante la inflamación aguda crónica. Pacientes que sufren artritis reumatoide producen elevadas cantidades de ROS en sus articulaciones y estos radicales son causa directa de los síntomas de esta enfermedad crónica porque los agentes que inhiben su producción son fármacos antiinflamatorios potentes.

Estudiando los efectos de los radicales de oxígeno en cultivos celulares, se ha observado que una célula puede sufrir la agresión oxidativa débil o citotóxica dependiendo de la dosis de las especies de oxígeno que se gene-

ran. En el caso citotóxico se observa alteración de las proteínas, proteólisis, fragmentación del DNA y lipoperoxidación que conducen a la lisis celular.

Se mencionó anteriormente que las ROS incluyen el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el radical hidroxilo ($\cdot OH$) y el oxígeno singlete ($^1O_2$). Estos diversos tipos de ROS pueden reaccionar entre ellos en presencia de metales, cobre o hierro y también dar lugar a productos reactivos secundarios como peróxidos lipídicos e hipoclorito. A lo largo de la evolución han surgido sistemas enzimáticos ubicuos, especializados en la eliminación de estos intermediarios entre los cuales se incluyen la superóxido dismutasa cuya misión es eliminar el radical superóxido y la catalasa y la glutatión peroxidasa encargadas de eliminar al peróxido de hidrógeno y a los peróxidos en general. Hasta el momento se desconoce la existencia de algún sistema enzimático encargado de eliminar el radical hidroxilo, aunque la eficiente acción concertada de la superóxido dismutasa y catalasa evitan la formación de esta especie tan agresiva (Figura 8).

Las ROS no solo son producidos como agentes citotóxicos por células especializadas en condiciones patológicas, sino también se generan en cada tipo celular como subproductos de las reacciones de transferencia electrónica. La mitocondria es la fuente principal de formación del radical superóxido, radical poco reactivo que se difunde rápidamente por la célula hasta que encuentra una reacción apropiada. Este radical se origina por transferencia de un electrón al oxígeno molecular. Para la eliminación rápida del superóxido la mitocondria contiene su propia superóxido dismutasa, sistema enzimático inducible, dependiente de manganeso.

El H_2O_2 no es un radical de oxígeno, pero puede servir como precursor de ellos. Se produce intracelularmente por los peroxisomas y la mitocondria y puede difundirse en el interior de las células desde el espacio extracelular a partir de células especializadas que lo producen en grandes cantidades durante la inflamación. Las ROS intracelulares proceden, por tanto, de una producción intracelular incrementada, del H_2O_2 extracelular o por inhibición de los enzimas que los eliminan.

Los granulocitos y los macrófagos poseen el sistema enzimático de membrana NADPH oxidasa, anteriormente citado, que produce radical su-

peróxido a partir del NADPH y oxígeno en respuesta a un estímulo apropiado. La inducción de este enzima se controla por la proteína quinasa C (PKC), enzima que se activa por los ésteres del forbol dando lugar a la formación de ROS. Existen pruebas evidentes que demuestran que el éster del forbol PMA (phorbol 12-miristato 13-acetato) estimula la producción de ROS, ya que el efecto del PMA depende del estado prooxidante de las células.

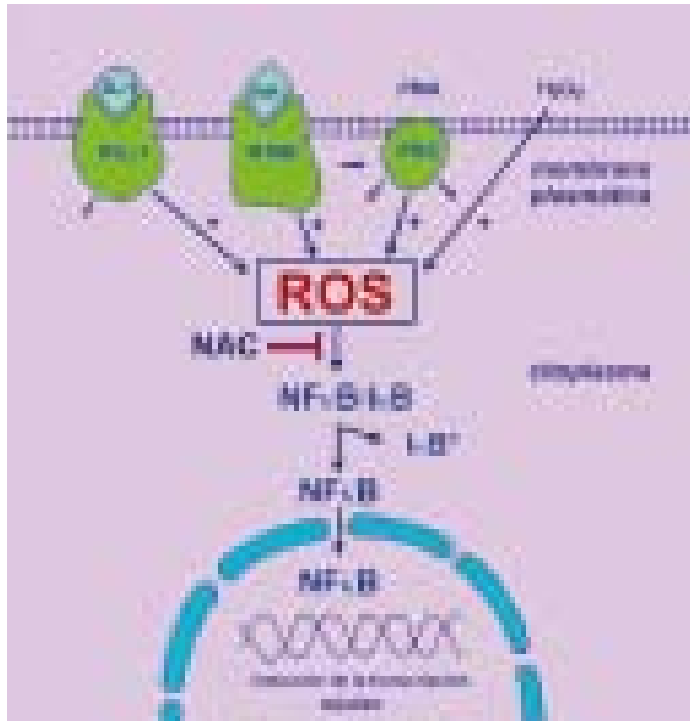


Figura 5.- En respuesta a la estimulación con TNF α , IL1 y PMA las células generan pequeñas cantidades de ROS que activan el factor de transcripción NF κ B liberándolo de una proteína inhibidora I κ B. Esta activación se inhibe en presencia de agentes que eliminan las ROS, NAC (N-acetil cisteína)

La citoquina inmunomoduladora TNF α (Tumor Necrosis Factor alfa) puede inducir la síntesis de otras citoquinas en linfocitos T y en macrófagos activando los respectivos genes. Sin embargo, el TNF α es citotóxico sobre otras líneas celulares no linfoides y en estos casos la citotoxicidad depende, en parte, de las ROS, porque se ha observado que la superexpresión de la SOD y la disminución de la presión parcial de oxígeno protegen a estas células de los efectos citotóxicos del TNF α .

La unión del TNF α a las células, como también el PMA y la IL1 inducen la síntesis de especies reactivas de oxígeno, lo cual demuestra que la concentración intracelular de estas especies se eleva durante la estimulación fisiológica de las células por las citoquinas. Los radicales de oxígeno nos llevan a considerarlos como segundos mensajeros ya que su concentración se eleva por acción de un ligando extracelular. Además existe una reacción intracelular de transducción de señales que es provocada específicamente por los radicales de oxígeno. La forma citoplasmática del factor de transcripción inducible, el NF κ B (factor nuclear κ B) es un objetivo fisiológico importante para los ROS. (Figura 7). Estas ROS son las que promueven la separación del I κ B al activar la proteína quinasa C que fosforila al inhibidor I κ B y promueve la posterior disociación y degradación.

Evaluación experimental de las ROS

Debido a la gran reactividad de las ROS y a su escasa vida media, estas especies no han podido ser detectadas experimentalmente hasta el advenimiento de las técnicas de citometría de flujo y microscopía confocal. Estas técnicas han permitido mediante el uso de un amplio número de moléculas fluorescentes, detectar específicamente las ROS en el momento de su generación en las células vivas. La correcta aplicación de estos marcadores fluorescentes ha permitido observar y evaluar muchas funciones dinámicas celulares con gran precisión. Algunas funciones o estructuras celulares pueden ser estudiadas sin necesidad de incorporar marcadores fluorescentes exógenos, puesto que se pueden relacionar con la presencia de moléculas fluorescentes endógenas o con interacciones físicas específicas entre las células y la luz.

La citometría de flujo utiliza células vivas para el análisis de la actividad oxidativa celular. Este análisis puede ser complicado por la posibilidad de hallar múltiples formas de oxígeno reactivo en la misma célula. Además el óxido nítrico puede producir los mismos cambios en las propiedades ópticas del fluorocromo utilizado, iguales a las producidas por otras moléculas que reaccionan con el oxígeno. El uso de agentes bloqueantes e inhibidores de

enzimas puede ayudar a dilucidar la especie responsable del cambio óptico producido en la sonda.

La dificultad del análisis cuantitativo de las especies reactivas de oxígeno se debe principalmente a tres razones: (a) a la concentración variable de metales que puede catalizar o inhibir reacciones de los radicales libres; (b) a la elevada concentración intracelular de glutatión, el cual puede formar radicales tiol o sulfinilo o atrapar o reducir las ROS y (c) a la presencia de otros agentes colectores de radicales libres, como la espermina.

La rodamina, la fluoresceína y otros fluorocromos pueden ser reducidos químicamente a sus formas no fluorescentes. Estos derivados reducidos se oxidan fácilmente por algunas especies de oxígeno reactivas, a su forma fluorescente. De esta forma pueden utilizarse como pruebas fluorogénicas para detectar la actividad oxidativa en células y tejidos. Los fluorocromos más utilizados en citometría de flujo para la detección del estrés oxidativo son los siguientes: la rodamina 123 (Rh123), la diclorofluoresceína (DCF) y el hidroetidio (HE) entre otros. El diacetato de 2', 7-dihidro dicloro fluoresceína H_2DCF -DA se utiliza para detectar los peróxidos en neutrófilos y macrófagos y para detectar el estrés oxidativo en fenómenos toxicológicos en hepatocitos, así como para caracterizar el estrés oxidativo dependiente de la hipoxia en levaduras y para observar efectos de la isquemia/reperfusión en pulmón y tejido cardíaco. La DCF se excita a 488 nm y emite a 530 nm. El H_2DCF reacciona con el peróxido de hidrógeno intracelular, mediante la acción de peroxidasas, citocromo c o Fe^{2+} . De hecho se utiliza como sustrato fluorescente para detectar y evaluar los peróxidos. El hidroetidio se utiliza específicamente para detectar y evaluar la generación de radical superóxido, se usa habitualmente para analizar el estallido respiratorio de los fagocitos. Se ha observado en células no linfoides que su fluorescencia depende de la cantidad de radical superóxido producido por la NADPH oxidasa ligada a la membrana de la mitocondria. El HE citosólico muestra una fluorescencia azul, pero una vez oxidado a etidio, se intercala en el DNA celular y cambia a fluorescencia roja. El HE y el H_2DCF se utilizan conjuntamente para estudios de estrés oxidativo.

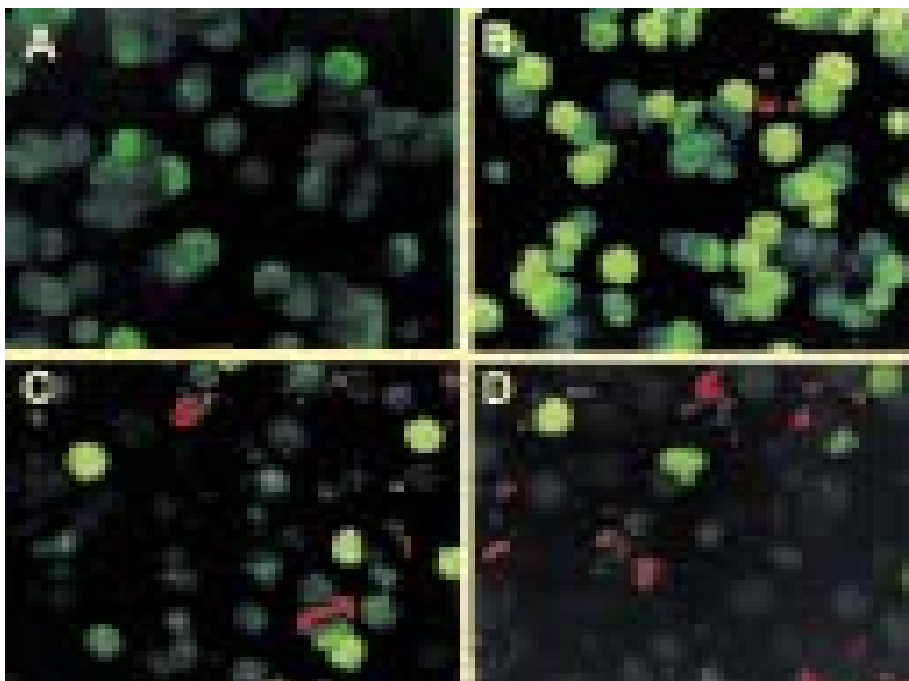


Figura 9.-Análisis por microscopía confocal de la producción de peróxidos. Imágenes obtenidas al incubar hepatocitos de rata con ciclosporina A (0, 5, 25 y 50 μM) durante 24 horas y con hidretoidio (HE) durante 30 minutos. (A) control, (B) ciclosporina A 5 μM , (C) ciclosporina A 25 μM y (D) ciclosporina A 50 μM . El color rojo en el interior de las células se corresponde con la cantidad de radical superóxido.

La microscopía confocal permite la visualización directa de la producción de radicales libres mediante la utilización de los mismos fluorocromos utilizados para la citometría de flujo, que reaccionan con ellos de forma específica dentro de la célula. El diacetato de diclorodihidrofluoresceína, antes mencionado, es el fluorocromo más utilizado para detectar el peróxido de hidrógeno específicamente, ya que no es capaz de reaccionar con el anión superóxido, mientras dihidroetidido es además capaz de reaccionar con el radical superóxido.

El $\text{H}_2\text{DCF-DA}$ es un compuesto apolar que se incorpora a las células donde se convierte en diclorodihidrofluoresceína (H_2DCF) por acción de unas esterasas intracelulares. El H_2DCF no presenta fluorescencia, pero al ser oxidado por el peróxido de hidrógeno (no por el anión superóxido) se convierte en fluoresceína (DCF) altamente fluorescente (verde).

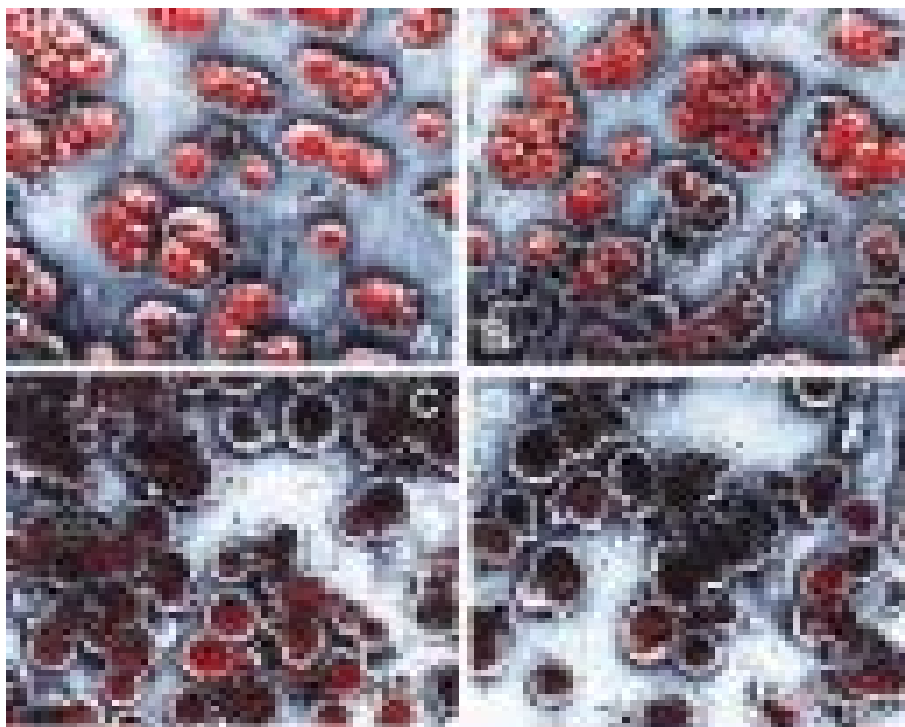


Figura 8.- Análisis por microscopía confocal de la producción de peróxidos. Imágenes obtenidas al incubar hepatocitos de rata con cocaína (0, 50, 500, 1000 μM) durante 24 horas y con yoduro de propidio y diacetato de dihidroclorofluoresceína ($\text{H}_2\text{DCF-DA}$) durante 30 minutos (A) control; (B) cocaína 50 μM ; (C) cocaína 500 μM y (D) cocaína 1000 μM . El mayor contenido en peróxidos se muestra en las células incubadas con cocaína 50 μM . En C y D las manchas en rojo debidas al yoduro de propidio, indican la existencia de células muertas.



Experimentos en nuestro laboratorio sobre mecanismos de hepatotoxicidad producidos por fármacos, han permitido detectar y evaluar los niveles intracelulares de peróxidos utilizando $\text{H}_2\text{DCF-DA}$. La Figura 8 muestra por microscopía confocal, las imágenes de cultivos primarios de hepatocitos de rata incubados en presencia de cantidades crecientes de cocaína (0 - 1000 μM) después de haber sido tratados con $\text{H}_2\text{DCF-DA}$. En la fotografía aparecen en verde brillante sobre fondo negro las células viables que han generado peróxidos al ser incubadas con cocaína, los cuales han reaccionado con el fluorocromo. La fluorescencia roja se debe al yoduro de propidio, que se intercala en las cadenas de DNA y es un índice de células no viables.

Otro ejemplo obtenido en nuestro laboratorio ha sido la evaluación del anión superóxido en cultivos primarios de hepatocitos incubados en presencia de ciclosporina A (CsA). En este caso el fluorocromo elegido fue el hidroetidio, selectivo del anión superóxido. La Figura 9 corresponde a las imágenes de cultivos primarios de hepatocitos, obtenidas por microscopía confocal, a las 24 horas de incubación de con cantidades crecientes de CsA (0 - 50 μ M) después de haber sido tratados con el fluorocromo hidroetidio (HE). Estos resultados indican que la célula en condiciones normales genera anión superóxido, que la concentración de este ión se eleva frente a concentraciones bajas de CsA, y que disminuye en las condiciones de mayor toxicidad por la pérdida de la viabilidad de las células en el cultivo:

Hidroetidio (HE) citosólico azul

HE (azul) + radical superóxido ETIDIO (rojo) que se intercala en las moléculas de DNA

Respuesta adaptativa al estrés oxidativo

La integridad y la existencia de un organismo vivo dependen de la regulación de su propia homeostasis, por tanto la supervivencia de una célula requiere el mantenimiento continuado de la homeostasis celular. En condiciones fisiológicas normales dicha homeostasis se encuentra continuamente agredida por agentes exógenos y endógenos. Para hacer frente a estos agresores, la célula ha desarrollado su propia protección o mecanismos de defensa, que implican la movilización de constituyentes celulares y la integración funcional de componentes específicos de defensa, entre los que se incluyen enzimas, tanto los asociados a membrana como los solubles citosólicos, que neutralizan los radicales libres. Estos sistemas enzimáticos regulan los efectos perjudiciales de los agentes estresantes externos, aminoran las alteraciones del medio celular interno y preservan la actividad celular.

El funcionamiento de estos antioxidantes es más eficiente cuando las actividades de sus componentes individuales actúan coordinadamente. Para conseguir el mayor grado de efectividad las defensas antioxidantes coordinadas pueden, a su vez, actuar de manera concertada con los sistemas celulares de reparación dedicados a restaurar las moléculas alteradas por oxidación.

La respuesta adaptativa se refiere a la capacidad de un organismo o una célula de resistir a los efectos perniciosos de un agente agresivo, cuando éste se ha administrado previamente a pequeñas dosis. Es este un fenómeno ampliamente distribuido entre todos los seres vivos y entre los agentes agresivos que inducen la respuesta adaptativa, cabe destacar: el estrés oxidativo, el choque térmico, la radiación, agentes alquilantes, metales pesados, etc. La adaptación implica la modulación de la expresión de una serie de genes.

A nivel fisiológico, el beneficio principal de la respuesta celular adaptativa es proteger a la célula y al organismo de la agresión infligida por agentes extraños. Tal respuesta protectora indica que la célula, una vez expuesta al agente agresor, está preparada para hacer frente a una dosis subletal de dicho agresor. Aunque los primeros estudios sobre la respuesta adaptativa, implicaron a los mecanismos de resistencia adquirida, la relevancia fisiológica de las respuestas adaptativas son de naturaleza más sutil. Por ejemplo, se ha demostrado que el ejercicio físico, que implica una elevación en la situación de estrés oxidativo, conlleva una reducción en la tasa de peroxidación lipídica producida durante el ejercicio. Los linfocitos de las personas expuestas por su trabajo a dosis bajas de radiaciones ionizantes muestran una capacidad más elevada de reparación.

Las células pueden sufrir una respuesta adaptativa frente a concentraciones subletales de oxidantes. En situaciones de estrés oxidativo, es importante constatar, que las células presentan dos líneas defensivas. La primera implica sistemas enzimáticos antioxidantes involucrados directamente en la prevención de la lesión oxidativa, como la superóxido dismutasa, la catalasa y la glutathion peroxidasa, y moléculas antioxidantes de bajo peso molecular, como el glutathion y el ascorbato. La segunda línea defensiva consiste en las enzimas reparadoras que eliminan o reparan las moléculas lesionadas por oxidación.

Es importante estudiar la caracterización de la respuesta celular al estrés oxidativo, cómo se regulan estos procesos y su particular comportamiento en un tipo de células o tejido. Muchos genes se inducen en respuesta a las distintas intensidades de estrés oxidativo y entre estos se incluyen factores de transcripción, proteínas implicadas en la replicación, proteasas, inhibidores

de las proteasas, proteínas que afectan la proliferación celular y diversos antioxidantes (por ejemplo, la hemooxigenasa, la metalotioneína y la MnSOD). La MnSOD se induce como consecuencia del estrés oxidativo y por acción de un número de citoquinas que causan inflamación. El incremento del flujo electrónico dentro de la mitocondria conduce a la generación de cantidades más elevadas de ROS que necesitarán niveles más elevados de MnSOD para mantener en funcionamiento normal de la mitocondria después de una agresión oxidativa.

Las alteraciones en la proliferación celular están relacionadas intrínsecamente con la patogénesis de muchas enfermedades. Algunas de las respuestas celulares al estrés oxidativo reflejan citotoxicidad y citostasis, mientras que otras ocasionan incrementos en la proliferación celular. Algunos genes que se inducen por estrés oxidativo se relacionan con la parada del crecimiento celular, respuesta que puede permitir a la célula reparar el daño antes de replicarse. Este fenómeno previene la fijación de mutaciones asociadas con el daño oxidativo al DNA. Sin embargo, la exposición a oxidantes puede activar la expresión de proto-oncogenes celulares, lo que conlleva a un incremento en la síntesis del DNA y en la proliferación celular.

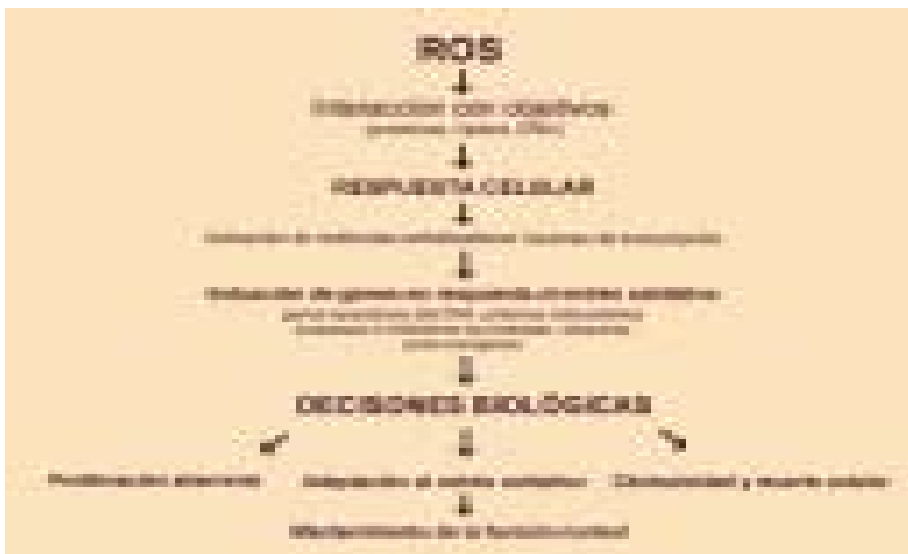


Figura 10.- Respuestas celulares a la lesión oxidativa en relación a la homeostasis y al desarrollo de enfermedad

La Figura 10 proporciona un esquema general de las respuestas celulares al estrés oxidativo: las ROS pueden reaccionar con un número de macromoléculas celulares, entre las que se incluyen las proteínas, lípidos y DNA. Estas interacciones promueven un número de señales tales como la activación de factores reguladores de genes (factores de transcripción), los cuales a su vez activan a los genes de respuesta al estrés oxidativo. En consecuencia se sintetiza un número de proteínas con diversas funciones: enzimas reparadores del DNA, enzimas antioxidantes, proteasas, inhibidores de las proteasas, citoquinas y proteínas que afectan la proliferación celular. Esta respuesta celular a las ROS pueden conducir a la restauración de la función celular normal y adaptación al estrés oxidativo, la muerte celular o a la proliferación aberrante. Las dos últimas respuestas son las que conllevan a una variedad de enfermedades entre las que se incluye el cáncer. Los mecanismos implicados en la superación de la agresión oxidativa son complejos y dependen de una serie de factores tales como el estado de la diferenciación celular, la fase del ciclo celular, el contenido de antioxidantes, etc.

La expresión de genes y la síntesis de nuevas proteínas en respuesta al estrés parece ser específica de células y tejidos. Estudios de hibridación han mostrado muchos clones cDNA que codifican transcritos mRNA que se inducen después de una situación de estrés oxidativo. La identificación de esos clones ha de mejorar nuestro conocimiento de los mecanismos de respuesta celular a situaciones estresantes y sus repercusiones en la reparación de la lesión oxidativa y la adaptación a la lesión.

Bibliografía

Alvarez Barrientos A, Callaghan R y O'Connor Blasco JE (1997) Análisis del estrés oxidativo por citometría de flujo. En: Bioquímica y fisiopatología del estrés oxidativo. (Ed M Cascales) Real Academia Nacional de Farmacia. Madrid. pp 365-380 pp 337-363

Andrés D, Sanz N, Zaragoza A, Alvarez A y Cascales M (2000) Developmental changes in antioxidant defence systems induced by cyclosporine in rat hepatocyte cultures. *Biochem Pharmacol* 59, 1091-1100.

Andrés D, Sanz N, Alvarez AM, Díez-Fernández C, Zaragoza A y Cascales M (2000) HSP-70 induction by CsA in cultured hepatocytes. Effect of vitamin E succinate. *J Hepatol* 33, 570-579.

Andrés D, Sanchez Reus MI, Bautista M y Cascales M (2003) Depletion of Kupffer cells by gadolinium chloride attenuates thioacetamide-induced hepatotoxicity. Expression of metallothionein and HSP70. *Biochem Pharmacol* 66, 917-926.

Andrés D, Díez-Fernández C, Castrillo A y Cascales M (2002) Activation of heat shock factor is accompanied by the suppression of nuclear factor kB activity in rat hepatocyte cultures treated with cyclosporine A *Biochem Pharmacol* 64, 247-256.

Andrés D, Díez-Fernández C y Cascales M (2002) Novel mechanism of vitamin E protection against cyclosporine A cytotoxicity in cultured rat hepatocytes. *Biochem Pharmacol* 64, 267-276.

Ames, N.B., Shigenaga, M.K. y Hagen, T.M. (1993) Oxidants, antioxidants and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci USA* 90, 7915-7922

Boveris A (1998) Biochemistry of free radicals: from electrons to tissues *Medicina (Buenos Aires)* 58, 350-356

Barja G (1997) Radicales libres y antioxidantes. En *Bioquímica y Fisiopatología del Estrés Oxidativo* (M. Cascales, ed) Real Academia Nacional de Farmacia & Fundación J Casares Gil. Madrid. pp 231-44.

Binger CAL, Faulkner JM y Moore RN (1927) Oxygen poisoning in mammals. *J Exp Med* 45, 849-864.

Callaghan RC, O'Connor JE y Alvarez-Barrientos A (1997) Microscopía confocal y Estrés Oxidativo. En: *Bioquímica y fisiopatología del estrés oxidativo*. (Ed M Cascales) Real Academia Nacional de Farmacia. Madrid. pp 365-380

Carrizo PH, Dubin M y Stoppani AOM (1998) Efectos fisiopatológicos del

óxido nítrico y su relación con el estrés oxidativo. Medicina (Buenos Aires) 58, 367-373

Cascales M. (1999) Estrés Oxidativo, Envejecimiento y Enfermedad. Instituto de España. Madrid. ISBN 84-85559-54-1.

Cascales M (2005) Estallido Respiratorio de los fagocitos. Anales Real Acad Nnal Farmacia (en prensa)

Cerutti, P.A. (1994) Oxy-radicals and cáncer. Lancet 344, 862-863

Crawford DR y Davies KJA (1994) Adaptative response and oxidative stress. Environ Health Perspect 102 (suppl 10) 25-28

Davies KJA (1995) Oxidative stress: the paradox of aerobic life. En Free Radicals and Oxidative Stress: Environmental, Drugs and Food aditives (ed Rice-Evans C, Halliwell B y Lunt GG). Biochem Soc Symp 61, 1-31. Gran Bretaña

Demple B y Harrison L (1994) Repair to oxidative damage to DNA: enzymology and biology. Annu Rev Biochem 63, 915-948.

Díez-Fernández C., Zaragoza A, Alvarez A., & Cascales M (1999) Cocaine cytotoxicity in hepatocyte cultures from phenobarbital-induced rats: involvement of reactive oxygen species in the expression of antioxidant defence systems. Biochem Pharmacol 58, 797-805.

Farber JL, Kyle M y Coleman JB (1990) Biology of disease. Mechanism of cell injury by activated oxygen species. Lab Invest 62, 650-651.

Fenton HJH (1984) Oxidation of tartaric acid in presence of iron. J Chem Soc 65, 899-910.

Fridovich I (1974) Superoxide anion and evolution. Horizons Biochem Biophys 1, 1-37

Fridovich I (1998) Oxygen toxicity: A radical explanation. J Exp Biol 201, 1203-1209

Graf E, Mahoney JR, Bryant RG y Eaton JW (1984) Iron-catalyzed hydroxyl

radical formation. J Biol Chem 259, 3620-3624.

Gerschman R, Gilbert DL, Nye SW, Dwyer P, Fenn WO.

(1954) Oxygen poisoning and X-irradiation: A mechanism in common. Science 119, 623-629

Gille G y Sigler K (1995) Oxidative stress and living cells. Folia Microbiol 40, 131-152.

Halliwell B y Gutteridge JMC (1984) Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. Biochem J 219, 1-14

Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. y Cross, C.E. (1992) Free radicals, antioxidants and human disease: Where are we now?.

J Lab Clin Med 119, 7915-7922.

Jansen YMW, Van Houten B, Borm PJA y Mossman BT (1993) Biology of disease. Cell and tissue responses to oxidative damage.

Lab Invest 69, 261-274

McCord JM y Fridovich I (1969) Superoxide dismutase: An enzymatic function for erythrocuprein (hemocuprein). J Biol Chem 244, 6049-6050.

McCord JM (1995) Superoxide radical: Controversies, contradictions and paradoxes. Proc Soc Exp Biol Med 209, 112-117.

Pauling L (1948) The nature of chemical bond. New York: Cornell University Press

Priestley J (1975) Experiments and observations on different kinds of air. Vol II. Sections III-V. En Priestley J "The discovery of oxygen A" Part I. Edimbourg: The Alembic Club, 1923, pp 29-103

Sanz N, Díez-Fernández C, Alvarez A y Cascales M (1997). Age-dependent modifications in rat hepatocyte antioxidant defense systems. J. Hepatol. 27; 525-534.

Scheele CW (1777) Chemische Abhandlung von der Luft und dem

Feuer. Upsala And Liepzig. Section 2. En Scheele CW, "The collected papers of Carl Wilhelm Scheele" Bell & Sons, London 1931 y Kraus Reprint Co., New York 1971, pp 85-178.

Schrech R y Bauerle PA (1991) A role for oxygen radicals as seconds messengers. Trends in Cell Biol 1, 39-42

Smith JL (1899) Pathological effects due to increase of oxygen tension in air breathed. J Physiol 24, 19-35.

Sun, Y. (1990). Free radicals, antioxidant enzymes and carcinogenesis. Free Rad Biol Med 8, 583-599

Wiseman H y Halliwell B (1996) Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. Biochem J 313, 17-29

Yu, B.P. (1994) Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. Biol Rev 74, 139-162.

Zaragoza A, Díez-Fernández C, Alvarez AM, Andrés D y Cascales M (2000) Effect of N-acetylcysteine and deferoxamine on endogenous antioxidant defence systems gene expression in a rat hepatocyte model of cocaine cytotoxicity. Biochim Biophys Acta 14624, 1-13.