

## Oxidantes y radicales libres en biomedicina

J. A. Casado, J. Merino, J. Cid, M.L. Subirá, A. Sánchez-Ibarrola

*Servicio de Inmunología. Clínica Universitaria. Facultad de Medicina. Universidad de Navarra.*

**RESUMEN.** Las reacciones donde intervienen oxidantes y radicales han jugado un papel esencial en el origen de las formas de vida aerobias y son una parte integral de la homeostasis celular. Sin embargo y debido a los efectos tóxicos colaterales de esta presión oxidativa, de forma muy temprana en la evolución se desarrollaron los enzimas y factores antioxidantes que son capaces de controlar la presencia y efectos de estos productos. Oxidantes y antioxidantes tienen una clara función en el organismo y un desequilibrio en este delicado balance resulta en muchas alteraciones bioquímicas y celulares que pueden crear condiciones patológicas. Así mismo es creciente el papel que se le da a los radicales libres del oxígeno como factor de envejecimiento biológico (1).

Es difícil encontrar actualmente algún campo de la biomedicina donde no pueda encontrarse trabajos relacionados con oxidantes y radicales libres. En los organismos vivos los principales oxidantes y radicales libres son los derivados del oxígeno, que genéricamente denominaremos intermediarios reactivos del oxígeno (IRO). Si bien tenemos una idea acerca de estos compuestos, sus amplias repercusiones y recientes implicaciones en distintas patologías, así como la progresiva complejidad de sus interacciones y efectos celulares justifican, a nuestro juicio, una revisión que intente dar una visión de conjunto sobre estos inevitables, útiles y peligrosos reactivos. OXI

**SUMMARY.** The reactions which involve oxidants and free radicals species have played an essential role at the beginning of the aerobic life, and they are an intrinsic part in the regulation of the cellular processes. However, as a result of the derived toxic effects of these oxidative processes, antioxidants molecules appeared in the very early stages of the evolution and they are able to control the production of these reactivities and their dangerous effects. Oxidants and antioxidants have a clear function in the cellular physiology. When this delicate balance change many biochemical and cellular reactions are altered, and

that may cause different pathologic diseases. In addition, free radicals of oxygen are thought to play a growing role in the biological process of ageing (1).

It is not unusual to find papers about these reactivities in every topic of the biomedicine. The main oxidants and free radicals in the organisms are oxygen-related agents, which are globally called reactivities oxygen intermediates (ROI). These unavoidable, useful and dangerous biological oxidants are well characterized, although the recent implications they received in some pathologies deserve, in our opinion, a general review.

(Rev Med Univ Navarra 1996; 40: 31-40).

### Palabras clave

Oxígeno, oxidantes, antioxidantes, radicales libres, NADPH-oxidase.

### Key words

Oxigene, oxidants, antioxidants, free radicals, NADPH-oxidase.

### Bioquímica de la generación de IRO

#### Concepto y tipos

Los IRO están constituidos por moléculas reactivas derivadas del oxígeno con carácter principalmente oxidante, algunas de las cuales son de tipo radical. La mayoría de las moléculas biológicas no tienen naturaleza radical, presentando en cada orbital electrones apareados. Un radical libre puede ser definido por tanto como una especie química (átomo o molécula) que contiene uno o más electrones desapareados (simbolizado por un  $\cdot$ ). Este hecho hace que estos radicales sean altamente reactivos y capaces de interaccionar entre sí y con un gran número de moléculas biológicas. Estos radicales actúan tanto como un reductor o, más frecuentemente, como un radical oxidante (ganando electrones y provocando la oxidación de otro compuesto).

Una característica fundamental de las reacciones de los radicales libres es que actúan como reacciones en cadena, donde la reacción de un radical genera otro de forma consecutiva. Entre los IRO que encontramos principalmente en los sistemas biológicos está:  $\cdot\text{O}_2^-$  (radical anión superóxido),  $\text{H}_2\text{O}_2$  (peróxido de hidrógeno),  $\cdot\text{OH}$  (radical hidroxilo),  $\text{OH}^-$  (anión hidroxilo),  $\text{ClO}^-$  (hipoclorito). Distintos autores también han considerado la importancia de otros productos intermedios originados en la formación de estos compuestos como el cloro libre y el oxígeno simple, aunque su importancia y papel biológico no ha podido ser aclarado. Estos reactivos pueden generarse por distintas vías.

### 1.-Generación en procesos metabólicos esenciales

La vida de los organismos se desarrolla en un ambiente rico en oxígeno, y a partir de esta molécula las células aerobias han desarrollado una variedad de reacciones esenciales que generan como subproductos compuestos reactivos oxigenados. El foco principal de este tipo de reacciones es el obtenido en la cadena transportadora de electrones en la mitocondria, que de forma minoritaria pero continua en relación a la reducción total del oxígeno a  $\text{H}_2\text{O}$ , produce una reducción parcial del oxígeno, que causa la formación de algunos de los IRO (2). En casos anormales como hipoxia y posterior reoxigenación estos IRO de origen mitocondrial pueden verse aumentados peligrosamente (3). En distintas reacciones celulares de gran importancia también se generan determinados IRO como en el caso del sistema hipoxantina/xantina-oxidasa (2), fundamental para la degradación de las purinas en el producto de excreción ácido úrico. También hay reacciones importantes de hidroxilación y oxigenación realizadas por oxigenasas de función mixta que dan lugar a estos reactivos (4).

Las reacciones espontáneas de distintos azúcares (incluida la glucosa) con proteínas dan lugar a glicosilación de éstas y generación de radicales del oxígeno (5). Se ha sugerido en este estudio que una exposición prolongada de los tejidos corporales a altas concentraciones de glucosa puede resultar en un "stress oxidativo" continuado en los pacientes diabéticos, lo que contribuiría a los efectos de la hiperglucemia. También hay que considerar la presencia en los organismos de moléculas con grupos tioles ( $-\text{SH}$ ) en las proteínas y péptidos que contienen cisteína. Estos grupos pueden oxidarse directamente por la presencia de oxígeno, (reacciones favorecidas por la presencia de pH

alcalino e iones metálicos de transición), generando tanto radicales contenidos en el grupo sulfuro como  $\cdot\text{O}_2^-$  y  $\text{OH}^-$  (6).

### 2.-Generación por exposición a agentes químicos y físicos

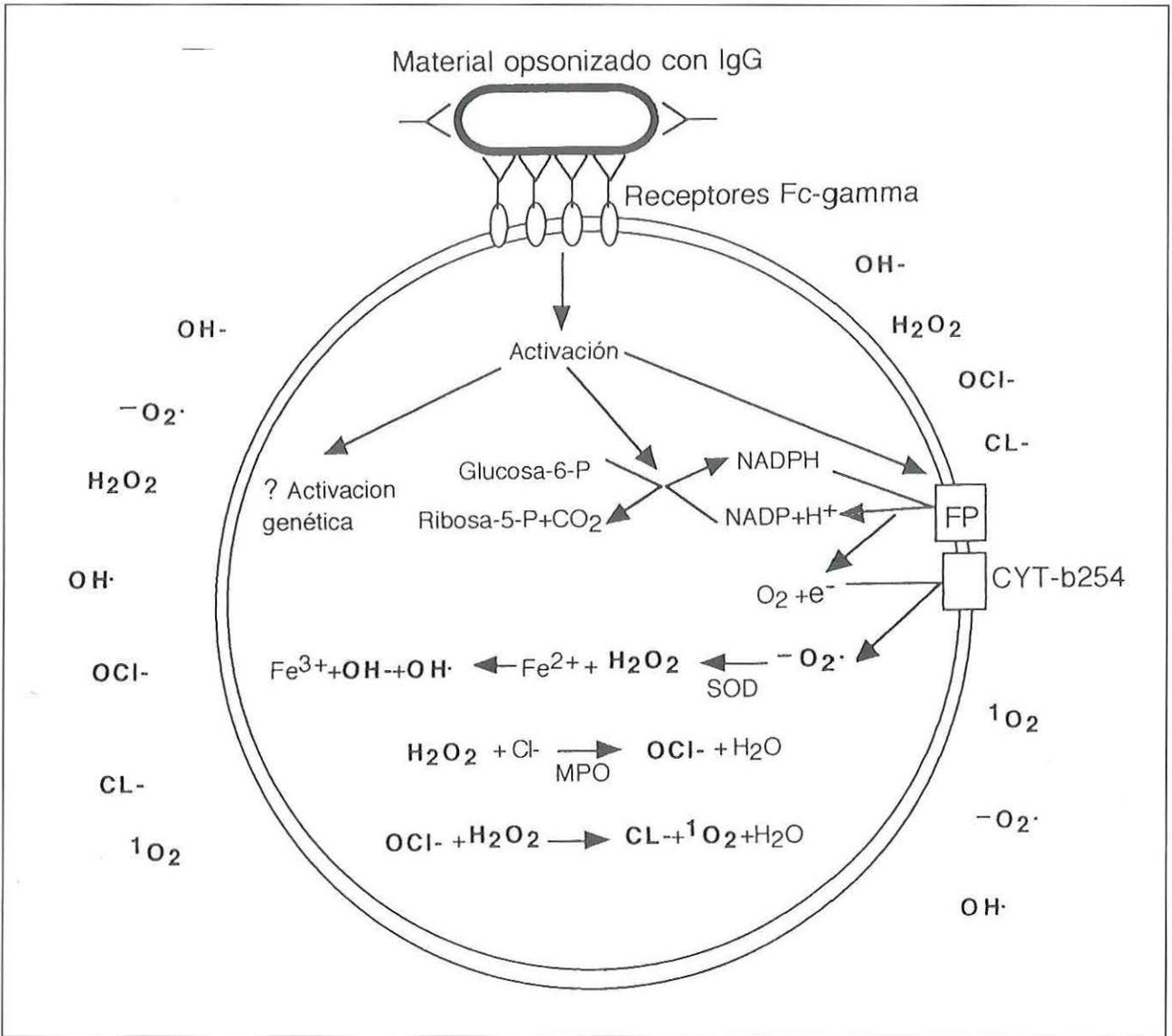
Distintos agentes físicos y químicos a los que continuamente se encuentra expuestos los seres humanos son reconocidos focos generadores de radicales y productos oxidantes. Las radiaciones de alta energía (radiación gamma fundamentalmente) que inciden sobre los organismos son absorbidas por el principal componente de las células, el agua. Esto causa la rotura del enlace covalente entre oxígeno y el hidrógeno originando los radicales  $\cdot\text{H}$  y  $\cdot\text{OH}$ , este último como veremos más adelante es considerado como el radical de mayor reactividad en los sistemas biológicos. Algunos autores consideran a este reactivo como el principal agente causante del daño en el DNA celular tras exposición a radiación (7).

Algunos agentes químicos exógenos que pueden penetrar en el organismo contienen oxidantes y/o radicales libres, o bien son causa directa de su generación. Entre ellos cabe destacar por su incidencia social el humo del tabaco (8,24), productos derivados de la alimentación (9), cristales de sílice (10) además de sustancias como el herbicida paraquat (11), asbestos (8), y fármacos como la bleomicina (12) y dextrorubicina (13).

### 3.-Generación por células de carácter inflamatorio (Sistema NADPH-oxidasa)

Desde el punto de vista biológico, el foco más interesante de IRO corresponde al obtenido mediante la activación de un sistema de transporte electrónico especializado llamado NADPH-oxidasa que está capacitado para producir grandes cantidades de  $\cdot\text{O}_2^-$  como primer reactivo, y mediante reacciones colaterales el resto de los IRO (Figura 1). Este sistema es característico de las células fagocíticas con una clara implicación en las reacciones inflamatorias (neutrófilos, monocitos, macrófagos y eosinófilos) aunque pueden presentarse en otras células como fibroblastos y células mesangiales (14). El principal papel de este sistema en las células fagocíticas es ser un mecanismo antimicrobiano, cuya importancia queda reflejada en las severas infecciones bacterianas y micóticas que sufren los pacientes con enfermedad granulomatosa crónica (defecto en el sistema NADPH-oxidasa). Algunos autores también han implicado estos IRO en los procesos de citotoxici-

Fig. 1



Esquema de los elementos implicados en la activación del sistema NADPH-oxidasa en un fagocito a partir de material opsonizado con IgG, reacciones colaterales en la producción de los intermediarios reactivos del oxígeno y difusión al medio extracelular: SD: Superóxido dismutasa, MPO: Mieloperoxidasa, FP: Flavoproteína, CYT-b254: Citocromo b 245. Se incluye el ciclo de las pentosas fosfato como fuente de NADPH para el proceso.

dad celular contra células tumorales por parte de monocitos y macrófagos (15). La formación de IRO en los fagocitos requiere de la colaboración de una serie de efectos metabólicos como son el incremento del consumo de oxígeno y consumo de la glucosa por la vía

de las pentosas fosfato para obtener el NADPH necesario para el proceso. Estos procesos celulares en su conjunto se ha denominado "explosión oxidativa".

A partir del primer producto formado -O<sub>2</sub>· se obtiene el resto de los IRO (Figura 1). Por acción de la en-

zima SOD sobre el anión superóxido se obtiene el oxidante  $H_2O_2$ . De gran importancia es la reacción de  $H_2O_2$  y  $-O_2$  con mediación de iones metálicos como el hierro o cobre (reacción de Haber-Weiss) o bien el  $H_2O_2$  con hierro directamente (reacción de Fenton), dando lugar estas reacciones al altamente tóxico  $\cdot OH$ . Por otra parte la presencia de mieloperoxidasa en los fagocitos da lugar a partir de  $H_2O_2$  y  $Cl^-$  al producto  $OCl^-$ , también altamente reactivo. Otros subproductos como cloro libre y oxígeno simple formados en reacciones intermedias tienen una acción fisiológica aún poco conocida. De gran importancia es la formación de productos potencialmente tóxicos para las células a partir de la reacción de algunos oxidantes (principalmente  $OCl^-$ ) con amonio, péptidos o aminoácidos libres para formar distintos tipos de cloraminas (16).

Existen distintas sustancias activadoras artificiales (PMA, ionóforos) y fisiológicas (material opsonizado con IgG o complemento, inmunocomplejos, péptidos quimiotácticos, citoquinas) capaces de activar directa o indirectamente este sistema oxidativo de los fagocitos. Así mismo, distintos receptores sobre estas células han sido implicados en la generación de IRO. Nuestro grupo ha analizado en detalle la activación de este sistema oxidativo mediante los receptores para la fracción Fc de la IgG (Fc-gamma-R) en monocitos humanos (17). En estas células hemos podido observar cómo una potente generación de IRO mediante estos receptores puede requerir la coactivación de distintos tipos de receptores (18). Este hecho puede ser de importancia en el control de la generación de estos reactivos, de tal forma que sólo en las inmediaciones de las dianas adecuadas (bacterias y patógenos opsonizados, células transformadas o deterioradas) se formen grandes cantidades de IRO sin afectar a los tejidos sanos circundantes.

### **Acción de los IRO en los sistemas biológicos**

#### **Papel fisiológico**

Los IRO son una importante herramienta defensiva antimicrobiana y antitumoral del sistema inmunológico, que constituye el denominado mecanismo oxígeno dependiente. Otros efectos beneficiosos de determinados IRO los podemos encontrar en la participación de los peróxidos en el ciclo de reacción monooxigenasa y peroxidasa del citocromo P450 (19) (ciclo fundamental para la oxidación y eliminación de compuestos endógenos y tóxicos exógenos). También ha podido

comprobarse que estos reactivos pueden actuar como mensajeros e inductores genéticos (ej.  $NF_kB$ ), o provocar el desencadenamiento de la síntesis de ciertas citoquinas (20,21). La propia reactividad del  $-O_2$  hace que sea capaz de interactuar con otra sorprendente molécula reguladora inorgánica, conocida como factor de regulación derivado del endotelio, y posteriormente identificado como óxido nítrico ( $NO$ ), también con una clara naturaleza de radical. El  $-O_2$  formado directamente por el propio endotelio de los vasos sanguíneos o generados por la presencia de células inflamatorias adheridas a éste puede neutralizar el  $NO$ , y de esta manera, controlar el tono de contracción de la musculatura lisa de los vasos (22).

Los IRO oxidan los grupos metionina alterando la función de algunas proteínas y péptidos donde este aminoácido juega un papel crítico, como en la trombomodulina endotelial (23), lo que puede representar un papel en la regulación del proceso de coagulación. Otra proteína inactivada por la oxidación en metionina es la alfa-1-antitripsina (24). Inversamente también se han descrito procesos de activación por oxidación de ciertas enzimas como colagenasas (25), así como gelatinasas y ciertas metaloproteínas. Todos estos procesos tienen un profundo efecto sobre la degradación de la matriz celular, y en su conjunto parece contribuir a la regulación de la extensión del proceso inflamatorio. Sin embargo, en caso de un proceso descontrolado, se puede amplificar peligrosamente el proceso inflamatorio (26).

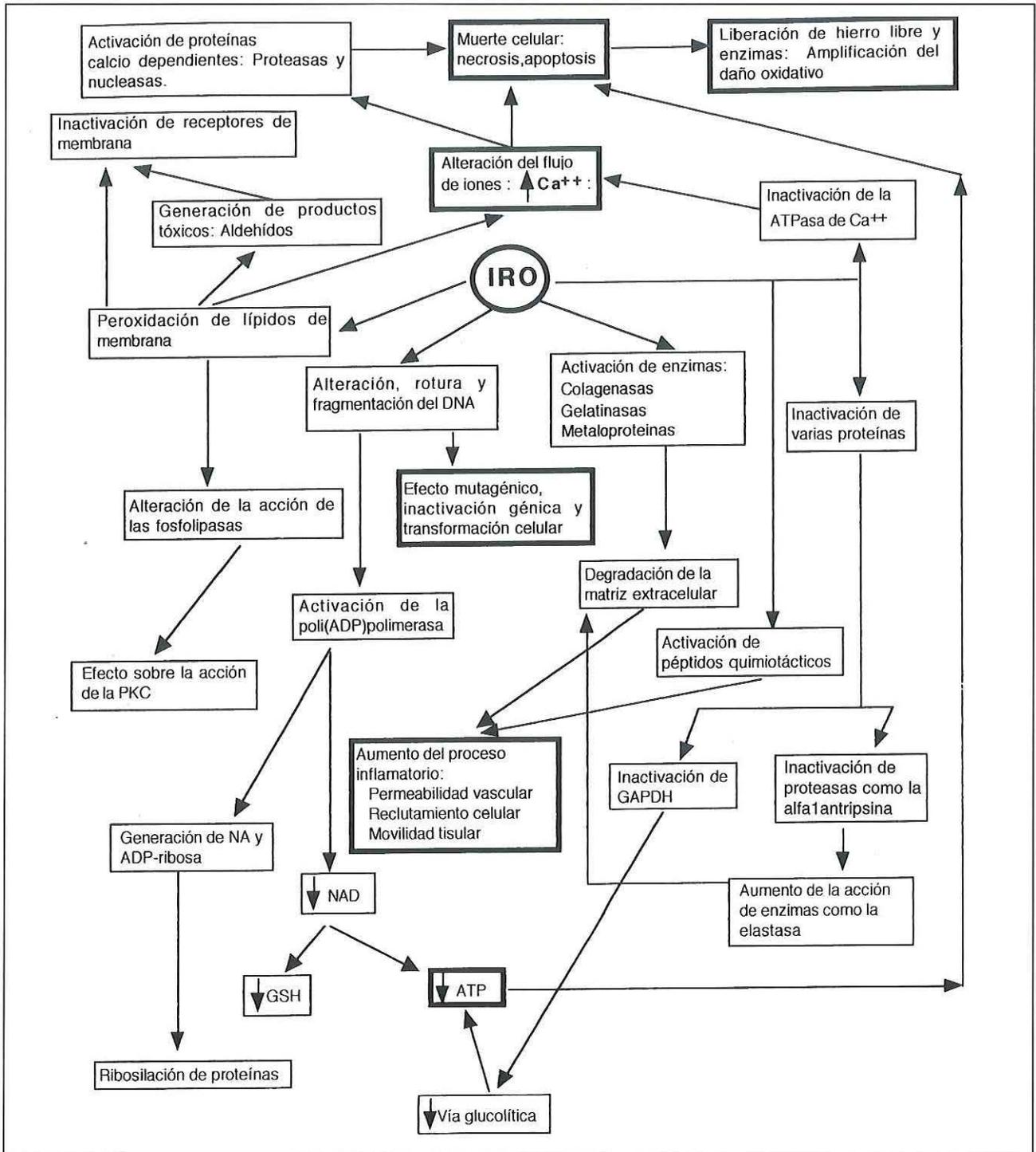
La apoptosis es un proceso de muerte celular programada involucrada en importantes procesos fisiológicos (selección tímica, citotoxicidad celular, muerte por activación, etc). Se ha postulado que el balance oxidante-antioxidante puede determinar este proceso de apoptosis (27).

#### **Papel patogénico**

Al margen del papel positivo de los IRO, ha sido patente el efecto de estos compuesto en el daño tisular y su relación con la enfermedad. Los mecanismos bioquímicos por los que los IRO causan daño celular son aún poco conocidos, pero se presentan de forma compleja y afectan a un gran número de funciones y moléculas. Estos reactivos pueden alterar directa o indirectamente varios mecanismos celulares y fisiológicos (Figura 2) entre los que cabe destacar los siguientes.

**Peroxidación de lípidos:** Este proceso constituye el daño celular mejor caracterizado causado por el radi-

Fig. 2



Esquema de la acción, interacción y efectos principales de los intermediarios reactivos del oxígeno (IRO) sobre distintos componentes celulares y fisiológicos. Se resaltan, en cuadros sombreados, aquellos procesos finales que pueden constatarse derivados de la acción de estos reactivos. PKC: proteína quinasa C, GAPDH: gliceraldeído fosfato deshidrogenasa, GSH: glutatión, NA: ácido nicotínico, ND: nicotina-mida-adenina-dinucleótido.

Table I

Agentes y sistemas antioxidantes		
1 Agentes		
Antioxidantes intracelulares	Antioxidantes extracelulares	Antioxidantes artificiales
Cu-Zn SOD/Catalasa Ciclo del glutatión Ferritina hemosiderina	Acido ascórbico (Vit. C) Tocoferol (Vit. E) Acido retinoico Eritrocitos Transferrina Ceruloplasmina Bilirrubina Acido úrico Albúmina Ubiquinol	Deferroxamina Allopurinol N-acetil-cisteina Dimetilurea Dimetilsulfóxido Deoxycoformicina Manitol aminoesteroides: U74006F Análogos de vitaminas E y C Simuladores de la SOD: Cu(II) <sub>2</sub> (3,5-DIPS) <sub>4</sub>
2 Sistemas		
Sistemas de reparación del DNA Degradación de proteínas dañadas Metabolismo de lípidos hidroperoxidados Mucosa epitelial		

Tabla donde se enumeran los principales agentes antioxidantes naturales conocidos y su principal ámbito de actuación y los sistemas capaces de paliar o atenuar algunos efectos de los IRO. Se presenta también algunos antioxidantes utilizados normalmente en estudios realizados "in vitro" y experimentados en modelos animales

cal ·OH, que da lugar a una reacción en cadena de radicales libres sobre los lípidos de membrana. Este proceso ocurre cuando el ·OH es generado en la proximidad de las membranas y ataca a los ácidos grasos poliinsaturados de los fosfolípidos, como el ácido araquidónico. La reacción extrae el átomo de hidrógeno del carbono del doble enlace, y a la vez que se destruye el ·OH se genera un carbono de tipo radical en el seno de la membrana. Este hecho tiene varias consecuencias como el entrecruzamiento de ácidos grasos y reacción de lípidos con proteínas de membrana modificando su función. Pero sobre todo se produce una reacción en cadena de tipo "radical carbono- peroxil radical- lípido hidroperoxidado- radical carbono". Esto hace que un ·OH puede convertir cientos de ácidos grasos de membrana en lípidos hidroperoxidados. La acumulación de estos lípidos puede alterar la función normal de la membrana. Por otra parte, estos lípidos hidroperoxidados pueden degradarse anormalmente dando lugar a un grupo de productos altamente citotóxicos entre los que se encuentra los aldehídos

(28). En su conjunto todos estos procesos llegan a inactivar receptores y proteínas de membrana (29).

**Daño oxidante al DNA celular:** En distintos tipos celulares se ha podido constatar la presencia de daños en el DNA tras exposición a oxidantes en cuestión de segundos (30). Principalmente el ·OH y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (7,31,32) están implicados en este mecanismo. Estos productos originan roturas simples en las cadenas del DNA, además de crear hidroxilación en las bases nitrogenadas tanto directamente como por mediación de las reacciones de hidroperoxidación lipídica (33). Estos hechos generan mutaciones genéticas y posibilitan la transformación maligna celular.

**Pérdida energética celular:** Un efecto conocido de la acción de los IRO en las células es la acentuada pérdida de los niveles de ATP, tanto por la vía glicolítica como por la fosforilación oxidativa mitocondrial (34). La rotura del DNA durante el ataque oxidativo desencadena la activación de la poli(ADP)polimerasa que

consume su substrato NAD. Esto provoca la falta de este cofactor para la GAPDH (35). Adicionalmente la reactividad de los IRO con los grupos SH de las cisteínas 149 y 153 de esta enzima crea un puente disulfuro que inactiva este enzima clave de la vía energética de la glucólisis.

**Aumento del proceso inflamatorio:** La inflamación tiene un claro carácter defensivo en el organismo, y como vimos los IRO favorecen su desarrollo, sin embargo en condiciones descontroladas puede crear un efecto nocivo. Altos niveles de estos reactivos junto con enzimas hidrolíticas, citoquinas y lípidos bioactivos generados por los fagocitos en los lugares de inflamación, donde se produce un reclutamiento masivo de estas células activadas, puede ser causa de un importante daño tisular.

### Defensas antioxidantes

La inevitable generación de los IRO y su consiguiente potencial deletéreo, ha hecho que los organismos vivos desarrollen un conjunto variado de mecanismos para neutralizar o limitar su acción, o bien para reparar sus efectos (Tabla 1). Cuando se produce un exceso de IRO y/o se presenta un déficit de defensas antioxidantes, estamos ante la posibilidad de que se cree un daño celular no asumible por el organismo y por tanto se desarrolla un proceso de enfermedad.

En el interior de la célula hay que destacar el tandem enzimático SOD/Catalasa. La SOD tanto citoplasmática como mitocondrial catalizan eficientemente la conversión de  $O_2$  a  $H_2O_2$  y la catalasa actúa sobre este último formando agua y oxígeno. Es interesante notar cómo no se han descrito en seres humanos hasta la fecha ninguna deficiencia congénita completa en la SOD, indicando quizás que las mutaciones en sus genes son letales (4). Otro sistema enzimático antioxidante lo forma la glutatión peroxidasa (única enzima que utiliza como cofactor el selenio) que elimina  $H_2O_2$  al oxidar el glutatión reducido (2GSH) a glutatión oxidado (GSSG). La importancia de este sistema queda patente en la enfermedad producida por una dieta deficiente en selenio (enfermedad de Keshan) (36).

Es muy importante evitar la formación del altamente reactivo  $\cdot OH$  originado principalmente por la presencia de iones de transición libres como el hierro y cobre (reacción de Fenton y Haber-Weiss). En el interior de la célula este hecho se controla en condiciones normales mediante la asimilación del hierro libre en proteínas de unión como la ferritina y hemoderina.

Estas proteínas pueden liberar el hierro para crear  $\cdot OH$  en determinadas circunstancias como en condiciones de  $pH < 6$  (fagolisosoma o condiciones de acidosis como hipoxia). En el ambiente extracelular también se evita la presencia de estos iones en forma libre mediante las proteínas transferrina (37) y ceruloplasmina (38), que en condiciones normales sólo están al 30% de saturación haciendo que las concentraciones de hierro libre sean prácticamente nulas. La albúmina como la ceruloplasmina también une iones cobre, y el  $\cdot OH$  formado en su proximidad es anulado al reaccionar inmediatamente con la proteína, evitando su toxicidad sobre las células. Debido a la alta concentración de albúmina en el plasma esta interacción parece tener pocas consecuencias. Otras sustancias plasmáticas también pueden actuar de agentes antioxidantes como el ácido úrico o bilirrubina.

Especial atención debe ponerse sobre determinadas sustancias naturales cuya principal misión descrita parece ser la de servir como antioxidantes, como son la vitamina E y C. La vitamina E y en concreto el alfa-tocoferol debido a su carácter hidrófobo neutraliza la reacción en cadena de la peroxidación lipídica en las membranas celulares (39). Esto se produce por reacción de la vitamina E con los radicales peroxil de los lípidos originados por los IRO. Este proceso elimina este radical y forma un lípido hidroperoxidado no reactivo, pero crea un radical de vitamina E. Este último es estable y mucho menos reactivo que el radical peroxil, por lo que en presencia de esta vitamina se atenúa la reacción en cadena de peroxidación lipídica en las membranas (40). El contenido de alfa-tocoferol en lipoproteínas de baja densidad ayuda a aumentar la resistencia a peroxidación lipídica, evitando el desarrollo de arterioesclerosis originado por la presencia del LDL oxidado (41). La importancia de esta vitamina puede ser ilustrada por los efectos neurológicos graves que presenta los pacientes con defectos congénitos en la absorción intestinal de grasas, y por consiguientes con bajos niveles de vitamina E (42).

La vitamina C tiene conocidas propiedades antioxidantes. Puede cooperar con la vitamina E al reconvertir el radical de tocoferol (obteniendo por contrapartida un radical de vitamina C) para que esta vuelva a ejercer su efecto antioxidante (43). Vitamina C y alfa-tocoferol conjuntamente minimizan las consecuencias de la peroxidación lipídica, tanto en lipoproteínas como en membranas celulares. Estas propiedades pueden explicar por qué bajos niveles de estas dos vitaminas correlacionan con un incremento en la

incidencia de infarto de miocardio y algunas formas de cáncer (41).

### Enfermedades e IRO7

Puede encontrarse una larga lista de enfermedades donde la formación de IRO está implicada (44). Sin embargo es necesario en la actualidad clarificar en que patologías esta formación es un hecho fundamental en la patogénesis de la enfermedad, o sólo es un proceso secundario a la degeneración y destrucción tisular ocurrida por otras causas (aunque en estos casos la presencia de IRO puede contribuir a amplificar el daño orgánico). En determinadas patologías como son: artritis reumatoide (45), asma (46), algunas formas del síndrome del distress respiratorio del adulto (47) y arterioesclerosis (48), existen datos que sugieren que los IRO tienen un papel significativo, contribuyendo al origen y deterioro del proceso patológico. Por otra parte, muchos trabajos han mostrado que tras procesos de isquemia/hipoxia y posterior reperfusión/reoxigenación se generan importantes cantidades de IRO (3,49). Este hecho es de gran importancia para comprender el daño sufrido en el miocardio después de un infarto, o en los órganos que esperan para ser trasplantados. Entre las razones para esta formación de IRO esta la baja presión de oxígeno durante la isquemia/hipoxia que hace que en la mitocondria se produzca un aumento significativo en la oxidación incompleta del oxígeno

Gran interés tiene el efecto de los IRO sobre el DNA como se describió anteriormente. Este hecho puede provocar mutaciones en el DNA, que cuando afecta a determinados oncogenes origina transformación maligna. In vitro se ha observado que los oxidantes originados de distintos focos (entre los que se encuentran neutrófilos estimulados con PMA) pueden originar mutaciones similares a los observados en cáncer de colon, páncreas y pulmón (50). Estos hechos apoyan la observación de la mayor incidencia de ciertos tipos de cáncer asociados a inflamaciones crónicas, donde una continua generación de IRO puede estar teniendo lugar (51). Recientemente se ha observado que altas concentraciones de hierro en sangre se asocian al desarrollo de distintos cánceres (52). Puede pensarse que una anormal presencia de hierro libre provocaría la generación de un exceso de  $\cdot\text{OH}$ , que los mecanismos antioxidantes serían incapaces de neutralizar, atacando al DNA y transformando las células. Estos hechos están relacionados con la patología que sufren los pacientes con desordenes de sobre

carga de hierro (hemocromatosis), como son daño hepático, diabetes, inflamación articular y hepatoma entre otros (53). Esto hace pensar que sea necesario considerar el control y abuso del empleo de medicamentos que aportan o incrementa el hierro libre en el organismo.

### Implicaciones terapéuticas

Por lo comentado anteriormente, parece sugestivo pensar en el beneficio que puede obtenerse si se controla la formación y/o la acción de los IRO en determinadas patologías mediante distintos fármacos. Distintas sustancias que han mostrado ser protectores del daño oxidativo en condiciones de "in vitro", como quelantes del hierro (deferroxamina) así como otros antioxidantes normalmente utilizados como metiltiourea, dimetilsulfóxido, N-acetilcisteína, podían ser útiles "in vivo". En este sentido un nuevo grupo interesantes de antioxidantes están siendo investigados. Entre ellos se encuentran inhibidores de lipooxigenasas (54), análogos de la vitamina E y C (39,55). Sustancias que mimetizan la acción de la SOD han mostrado que en modelos murinos aparentemente eliminan el proceso de artritis (56). De especial interés son una serie de nuevos compuestos que actúan como potentes inhibidores de la peroxidación lipídica dependiente de hierro, entre los que destaca el U74006F. Este compuesto es llamado irónicamente "lazaroid" por ser útil en disminuir los efectos de los daños por reperfusión en cerebros de gatos y paliar la degeneración post-traumática de la medula espinal (57), así como minimizar los efectos neurológicos en ratones tras graves heridas y lesiones en la cabeza (58).

Sin embargo importantes cuestiones quedan pendientes en la farmacología antioxidante. Habría que delimitar perfectamente aquellas enfermedades donde los IRO son determinantes de la patología o serios agravantes, y donde sólo constituyen un epifenómeno secundario. Como antioxidantes y antirradicales, deberían elegirse sustancias que neutralizen IRO teniendo en cuenta que la forma prooxidante que puede formarse de estos fármacos, no sean más reactivos que los propios IRO (de forma similar a la vitamina E). También podría optarse por compuestos que localmente (sitios de inflamación) eviten la formación de IRO en las células que lo infiltran, o bien reparen los efectos de éstos. Hay que considerar finalmente, que una excesiva limitación terapéutica en la generación de los IRO, por su carácter antimicrobiano, podría predisponer a infecciones.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Nohl H. Involvement of free radicals in ageing: a consequence or cause of senescence. *Br Med Bull* 49:65367,1993.
2. Fridovich I. Superoxide radical: an endogenous toxicant. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 23:239-57,1983
3. Russell WS, Jackson RM. MnSOD protein content changes in hypoxic/hypoperfused lung tissue. *Am J Respir Cell Mol Biol* 9:610-6,1993
4. Halliwell B. Reactive oxygens species in living systems: source, biochemistry and role in human disease. *Am J Med* 91:14-22,1991
5. Wolff SP, Dean TR. Glucose autooxidation and protein modification. The potential role of "autooxidative glycosilation" in diabetes. *Biochem J* 245:243-50,1987
6. Albro PW, Corbett JT, Schroeder JL. Generation of hydrogen peroxide by incidental metal ion-acatalyzed autooxidation of glutathione. *J Inorg Biochem* 27:191-203,1986
7. Frenkel K, Chrzan K, Troll W, Teebor GW, Steinberg JJ. Radiation-like modification of bases in DNA exposed to tumor promoter activated polymorphonuclear leukocytes. *Cancer Res* 46:5533-40,1986
8. Jackson j, Schraufstatter IU, Hyslop PA et al. Role of oxidant in DNA damage: Hydroxy radical mediates the synergistic DNA damaging effects of asbestos and cigarrerte smoke. *J Clin Invest* 80:1090-5,1987
9. Banning DP, O'Farrel F, Gooderham NJ. Activation of the food derived carcinogen 2-amino-3,8-dimethylimidazo-(4,5-f)-quinoxaline by rat pleural cavity inflammatory cells. *Carcinogenesis* 14:2457,1993
10. Daniel LN, Mao Y, Saffioti U. Oxidative DNA damage by cristalline silica. *Free Radic Biol Med* 14:463,1993
11. Sandy MS, Moldeus P, Ross D, Smith MT. Role of redox cycling and lipid peroxidation in biperidyl herbicide cytotoxicity. *Biochem Pharmacol* 35:309,1986
12. Giloni L, Takeshita M, Johnson F, Ideu C, Grollman AP. Bleomycin induced strand scission of DNA. *J Biol Chem* 256:8608,1981
13. Julicher RHM, Stemenberg L, Haenen GRMM, Bast A, Noordhoeck J. The effect of chronic Adriamycin treatment on heart, kidney and liver tissue of male and female rat. *Arch Toxicol* 61:275-81,1988
14. Meier B, Cross AR, Hancock JT, Kaup FJ, Jonas TG. Identification of a superoxide generating NADPH oxidase system in human fibroblasts. *Biochem J* 275:241-245,1991
15. Chong YC, Heppner GH, Paul LA, Fulton AM. Macrophage mediated induction of DNA strand breaks in target tumour cells. *Cancer Res* 49:6652-6657,1989
16. Grisham MB, Jefferson MM, Melton DF, Thomas EL. Chlorination of endogenous amines by aisolated neutrophils. *J Biol Chem* 259:10404,1984
17. Casado JA, Merino J, Cid J, Subira ML, Sanchez-Ibarrola A. Simultaneous evaluation of phagocytosis and Fc-gamma-R mediated oxidative burst in human monocytes by a simple flow cytometry method. *J Immunol Method* 159:173-176,1993
18. Casado JA, Merino J, Cid J, Subira ML, Sanchez-Ibarrola A. The type of interaction with FcR in human monocytes determines the efficiency in the generation of oxidative burst. *Immunology* 83:148-154, 1994.
19. Bast A. Is the formation of reactive oxygen by cytochrome P-450 perilous and predictable? *Trends Pharmacol Sci* 7:266-70,1986
20. Schreck R, Rieber P, Baeuerle PA. Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-Kappa B transcription factor and HIV-1. *Embo J* 10:2247-2258,1991
21. Satriano JA, Shuldiner M, Hora K, Xing Y, Shan Z, Schlondorff D. Oxygen radicals as second messengers for expression of the monocyte chemoattractant protein JE/MCP-1 and the monocyte colony-stimulating factor, CSF-1, in response to tumor necrosis factor-alfa and immunoglobulin G. *J Clin Invest* 92:1564-1571,1993
22. Gryglewski RJ, Palmer RMJ, Moncada S. Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium derived vascular relaxing factor. *Nature (Lond)* 320:454-6,1986
23. Glaser CB, Moser J, Clarke JH, Blasko E, McLean K, Kuhn I et al. Oxidation of a specific methionine in thrombomodulin by activated neutrophil products blocks cofactor activity. A potential rapid mechanism for modulation of coagulation. *J Clin Invest* 90:2505-2573,1992
24. Hubbard RC, Ogushi F, Fells GA, Cantin AM, Courtney M, Crystal RG. Oxidants spontaneously release by alveolar macrophages of cigarette smokers can inactivate the active site of alfa-1-antitripsine, rendering it ineffective as an inhibitor of neutrophil elastase. *J Clin Invest* 80:1289-1295,1987
25. Weiss SJ. Tissue destruction by neutrophils. *N Engl J Med* 32:365,1989
26. Davies JAK, Goldberg AC. Oxygen radicals stimulate intracellular proteolysis and lipid peroxidation by independent mechanisms. *J Biol Chem* 262:8220,1987
27. Buttke TM, Sandstrom PA. Oxidative stress as a mediator of apoptosis. *Immunology Today* 15: 7-10,1994.
28. Esterbauer H, Zollner H, Schaur RJ. Hydroxyalkenals: cytotoxic products of lipid peroxidation. *ISI Atlas Sci Biochem* 1:35-5,1988

29. Dean RT, Thomas SM, Garner A. Free radical mediated fragmentation of monoamine oxidase in the mitochondrial membrane. Role of lipid radicals. *Biochem J* 240:489-94,1986
30. Schraufstatter IU, Hinshaw DB, Hyslop PA, Spragg RG, Cochrane CG. Oxidant injury of cells: DNA strand-breaks activate polyadenosine diphosphate-ribose polymerase and lead to depletion of nicotinamide adenine dinucleotide. *J Clin Invest* 77:1312,1986
31. Auroma OI, Halliwell B, Dizdargolu M. Iron ion-dependent modification of bases in DNA by the superoxide radical generating system hypoxanthine/xanthine oxidase. *J Biol Chem* 264:13024-8,1989
32. De Mello Filho AC, Menegini R. Protection of mammalian cells by o-phenanthroline from letal and DNA damaging effects produced by active oxygen species. *Biochem biophys Acta* 847:82-9,1985
33. Ochi T, Cerutti PA. Clastogenic action of hydroperoxy-5,8,11,13-icosatetraenoic acids on the mouse embryo fibroblasts C3H/10T1/2. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:990-4,1987
34. Hyslop PA, Hinshaw DB, Halsey WA et al. Mechanisms of oxidant mediated cell injury: The glucolytic and mitochondrial pathways of ADP phosphorylation are major intracellular targets inactivated by hydrogen peroxide. *J Biol Chem* 263:1665,1988
35. Schraufstatter IU, Hinshaw DB, Hyslop PA, Spragg RG, Cochrane CG. Hydrogen peroxide induced injury of cells and its prevention by inhibitors of poly (ADP-ribose) polymerase. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:4908,1986
36. Levander OA. A global view of human selenium nutrition. *Ann Rev Nutr* 7:227-50,1987.
37. Maloni W, Iosi F, Santini MT, Testa U. Medadione induced oxidative stress leads to a rapid down modulation of transferrin receptor recycling. *J Cell Sci* 106:309,1993
38. Krsek Staples JA, Webster RO. Ceruloplasmin inhibits carbonyl formation in endogenous cell proteins. *Free Radic Biol Med* 14:115,1993
39. Ingold KU, Burton GW, Foster DO et al. A new vitamin E analogue more active than alpha-tocopherol in the rat curative myopathy bioassay. *FEBS lett* 205:117-20,1986
40. Witting LA. Vitamin E and lipid antioxidants in free radical initiated reactions. En Pryor A, ed. *Free radicals in biology IV*. Academic Press 259-319,1980
41. Gey KF, Brubacher GB, Stahelin HB. Plasma levels of antioxidant vitamins in relation to ischemic heart disease and cancer. *Am J Clin Nutr* 45:1368-77,1987
42. Muller DPR, Lloyd JK, Wolff OH. Vitamin E and neurological function. *Lancet* 1:225-7,1983
43. Weffers H, Sies H. The protection by ascorbate and glutathione against microsomal lipid peroxidation is dependent on vitamin E. *Eur J Biochem* 174:353-7,1988
44. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free radicals in biology and medicine*. Oxford. Clarendon Press,1989
45. Halliwell B, Hoult JRS, Blake DR. Oxidants, inflammation and the anti-inflammatory drugs. *FASEB J* 2:2867-73,1989
46. Clhoun WS, Salisbury SM, Bush RK, Busse WW. Increased superoxide release from alveolar macrophages in symptomatic asthma. *Am Rev Respir Dis* 135:224,1987.
47. Baldwin SR, Simon RH, Grum CM, Ketali LH, Boxer LA, Devalli LJ. Oxidant activity in expired breath of patients with adult respiratory distress syndrome. *Lancet* 1:11,1986.
48. Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, Khoo JC, Witztum JL. Beyond cholesterol modifications of low density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N Engl J Med*.320:915-24,1989
49. Mc Cord JM, Oxygen derived free radicals in post ischemic tissue injury. *N Engl J Med* 312:159-63,1985
50. Cochrane CG. Cellular injury by oxidants. *Am J Med* 91:23-30,1991
51. Kawai K, Yamamoto M, Kameyama S, Kawamata H, Rademaker A, Oyasu R. Enhancement of rat urinary bladder tumorigenesis by lipopolysaccharide induced inflammation. *Cancer Res* 53:5172,1993
52. Friedman GD, Van den Eeden SK. Risk factor for pancreatic cancer: an exploratory study. *Int. J. Epidemiol* 22:30-7, 1993.
53. McLaren GD, Muir WA, Kellermer RW. Iron overload disorders: natural history, pathogenesis, diagnosis and therapy. *CRC Crit Rev Clin Lab Sci* 19:205-66,1983
54. Shiota H, Katayama K, Ono H et al. Pharmacological properties of N-methoxy 3-(3,5-ditert-butyl-4-Hydroxybenzylidene)-2-pyrrolidone (E5110) a novel nonsteroidal anti-inflammatory agent. *Agent Actions* 21:250-2,1987
55. Kato K, Terao S, Chimamoto M, Hirata M. Studies on scavengers of active oxygen species I. Synthesis and biological activity of 2-O-alkylascorbic acids. *Med Chem* 31:793-8,1988
56. Miesel R, Haas R. Reactivity of an active center analog of Cu2Zn2Superoxide dismutase in murine model of acute and chronic inflammation. *Inflammation* 17:595,1993
57. Hall ED. Effect of the 21-aminosteroid U74006F on post-traumatic spinal cord ischemia in cats. *J Neurosurg* 68:462-5,1988
58. Hall ED, Yonkers PA, McCall JM, Braughler JM. Effect of the 21-aminosteroid U74006F on experimental head injury in mice. *J Neurosurg* 68:456-461,1988.