

Los Radicales Libres y las Defensas Antioxidantes. Revisión.

MARÍA MONTERO

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Universidad de Santiago de Compostela. España.

RESUMEN:

En la vida de los organismos aerobios, es decir, aquellos que usan el oxígeno como medio para conseguir energía, existe el peligro de que sus defensas antioxidantes se vean sobrepasadas por las fuerzas oxidantes. Esta situación, denominada estrés oxidativo, es la base de una serie de aberraciones fisiológicas en los mamíferos, que incluye carcinogénesis, enfermedades cardiovasculares, enfermedades del sistema inmune, cataratas, enfermedades cerebrales e, incluso, el mismo proceso de envejecimiento. La causa de estas situaciones es el daño oxidativo originado en el DNA, lípidos y proteínas por los denominados oxirradicales. Frente a estas especies oxidantes, los organismos vivos han desarrollado una serie de mecanismos de defensa antioxidantes, tanto de naturaleza enzimática como no enzimática, y que se hallan presentes tanto en el propio organismo como en la dieta ingerida. En recientes investigaciones se establece una relación entre la producción de oxirradicales y la aparición de enfermedades degenerativas, así como la posibilidad de usar la dieta como una terapia antioxidante.

Palabras clave: Radicales libres, Estrés-oxidativo, Antioxidantes.

FREE RADICALS AND ANTIOXIDANT DEFENCES

SUMMARY :

In aerobic life, that is to say, in organisms that use oxygen to obtain energy, there is danger that their antioxidant defences are overcome by prooxidant forces. This situation, called oxidative stress, is the basis of a wide array of physiological aberrations in mammals, including carcinogenesis, cardiovascular diseases, immune system diseases, cataracts, brain dysfunctions and, even, the aging process. The source of these situations is the oxidative damage in DNA, lipids and proteins by oxyradicals. Against these oxidant species, living beings have developed a series of mechanisms of antioxidant defence, enzymatic and non enzymatic, that are present in both their organisms and in ingested diet. In recent investigations the relation between oxyradicals production and the appearance of degenerative diseases is established, as well as the possibility to use the diet as an antioxidant therapy. A review of these studies is made.

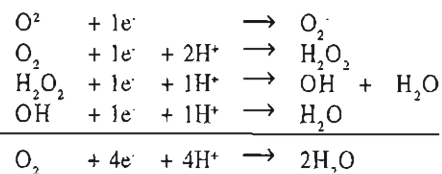
Key words: Free radicals, Oxidative-stress, Antioxidants.

LOS OXI-RADICALES

El oxígeno molecular apareció en la atmósfera como contaminante en un ambiente reductor, siendo un subproducto de la descomposición del agua en hidrógeno. Entonces, ciertos organismos empezaron a usarlo como medio de obtención de energía, apareciendo así los seres aerobios. Por otro lado, estos mismos crearon mecanismos de defensa antioxidantes, para protegerse de la toxicidad de las especies de oxígeno parcialmente reducidas.

Estas especies se denominan especies reactivas del oxígeno (RSOs) ⁽¹⁾, oxi-radicales ⁽²⁾ o intermediarios de la reducción del

oxígeno ⁽³⁾. Se originan como consecuencia de la reducción parcial del oxígeno a través de una serie de transferencias monoeléctricas.



Como podemos ver, la reducción monoeléctrica del oxígeno da lugar al radical anión superóxido, la dielectrónica al peróxido de hidrógeno y la trielectrónica al radical hidroxilo. La razón de estas reducciones monoeléctricas es que la moléculas de oxígeno po-

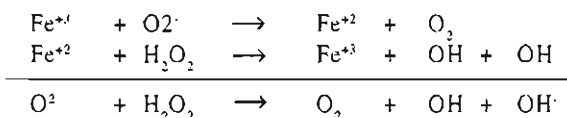
Correspondencia:

María Fe Montero Torreiro.

*Dpto. de Bioquímica y Biol. Molecular. Facultad de Farmacia.
Univ. de Santiago de Compostela. España.*

sec 2 electrones desapareados en orbitales X antienlazantes, lo que disminuye su capacidad de reacción y hace que se vea obligado a aceptar los electrones de uno en uno (⁴). Hemos de señalar que el peróxido de hidrógeno no es propiamente un radical libre, ya que no tiene ningún electrón desapareado. Otra especie reactiva del oxígeno es el oxígeno singlet O^2 , que posee el mismo número electrónico que el oxígeno molecular, pero presenta los dos electrones desapareados (⁵). Asimismo, existen productos de peroxidación lipídica, como los radicales hidroperóxido y peróxido, que pueden actuar como oxidantes.

Las especies reactivas radical unión superóxido y peróxido de hidrógeno pueden combinarse mediante la reacción de Haber-Weiss y originar el radical hidroxilo (⁶). Pero esta reacción, aunque termodinámicamente favorable, cinéticamente es muy lenta, por lo que necesita de catalizadores metálicos, como el hierro o el cobre, siendo éste el mecanismo propuesto:



De todas las especies reducidas del oxígeno, sin duda, la más dañina es el radical hidroxilo. Su alta toxicidad se debe a que posee una vida muy corta (10^{-9} segundos) y una alta reactividad, que le permite interactuar con todo tipo de sustratos. En cambio, otras especies, como el peróxido de hidrógeno, son más estables, por lo que pueden difundir grandes distancias y elegir la molécula sobre la que actúan (⁷).

El radical hidroxilo, por tanto, actúa sobre todo tipo de biomoléculas. Así, en los lípidos, provoca peroxidación lipídica de las membranas, en las proteínas, da lugar a inactivación enzimática, en el DNA, ocasiona mutaciones y, en los glúcidos, puede provocar alteraciones en los receptores celulares (⁸).

Dentro de las fuentes de sustancias oxidantes, tenemos dos grupos:

- 1) Las endógenas: Cadenas de transporte electrónico mitocondrial, peroxisomal y microsomal (citocromo P-450 y citocromo b5), enzimas citoplasmáticas (como la XOD, catecolamina y riboflavina) y enzimas fagocíticas (como la mieloperoxidasa y la NADPH-oxidasa).
 - 2) Las exógenas: Xenobióticos (benzopireno, quinonas, biperidilos), el humo del cigarro, ciertos componentes de la dieta (sales de hierro y cobre y compuestos fenólicos), las radiaciones y la hiperoxia.
- Un primer grupo de fuentes endógenas de RSOs lo constituyen las cadenas de transporte electrónico. En condiciones normales, estas cadenas de transporte son tan eficaces que ningún electrón se escapa a ellas. Sin embargo, pueden existir fugas en éstas por ruptura de la cadena o interacción con xenobióticos (⁹). Así, en el caso de la cadena de transporte mitocondrial, se ha comprobado que, tanto la ubiquinona como ciertos complejos ferro-sulfurados, en presencia de

antimicina A, se autooxidan, dando lugar a la pérdida de electrones y la formación de superóxido. Asimismo, en la cadena de transporte peroxisomal, intervienen las flavinoxidases, que producen peróxido de hidrógeno, que puede escapar de la cadena y originar radical hidroxilo. Por último, en la microsomal, también puede producirse cierta fuga electrónica, cuando la oxidación del sustrato no está bien acoplada al flujo electrónico, tanto en el caso de compuestos endógenos (prostaglandinas, ácidos grasos) como exógenos (xenobióticos del tipo del benzopireno).

Otra fuente endógena de RSOs es la fagocitosis activa por leucocitos, en la cual estas células generan una serie de sustancias oxidantes como el superóxido, el peróxido de hidrógeno, los óxidos de nitrógeno y el hipoclorito para atacar a virus y bacterias.

Por último, una mención a las fuentes endógenas:

- En primer lugar, están los xenobióticos, como las quinonas, biperidilos e hidrocarburos aromáticos, que intervienen en la formación de RSOs, vía citocromo P-450 y ciclo redox. Este ciclo redox puede definirse como un proceso en el cual un mediador de bajo PM (del tipo del FAD) acepta un electrón de un compuesto reducido y transfiere el electrón al oxígeno para producir superóxido (¹⁰). Este compuesto reducido puede ser tanto endógeno (ubiquinona) como exógeno (xenobióticos del tipo quinonas y biperidilos) y la reacción es catalizada por reductasas NAD(P)-H dependientes, de naturaleza flavoproteica y de baja selectividad por el sustrato. Cabe señalar que la cantidad de superóxido producida por esta vía es superior a la estequiométrica.
- Además, tenemos los óxidos de nitrógeno del humo del cigarro, que se ha comprobado que aumentan la oxidación de moléculas y disminuyen los antioxidantes. También están las sales de hierro y cobre, que aumentan la producción de oxo-radicales vía reacción de Fenton, y los compuestos fenólicos de plantas, que provocan un aumento de las oxidaciones vía ciclo redox (¹¹). Por último, existen otras fuentes, como las radiaciones y la hiperoxia.

LAS DEFENSAS ANTIOXIDANTES

Los organismos aerobios disponen de una batería de defensas antioxidantes, para protegerse frente a la producción de oxi-radicales. Un antioxidante puede definirse como cualquier sustancia que, presente a bajas concentraciones comparadas con las del sustrato, retrasa significativamente o previene la oxidación de dicho sustrato. El término "sustrato oxidable" incluye todo tipo de biomoléculas: glúcidos, lípidos, proteínas y DNA (⁵).

Esencialmente, las defensas antioxidantes se dividen en dos grandes grupos: los enzimáticos y los no enzimáticos:

- 1) Los enzimáticos están presentes en el organismo de los seres vivos y protegen frente a los RSOs producidos durante el metabolismo. Dentro de éstos, tenemos 3 principales: la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT) y la glutatión peroxidasa (GPX).

- La SOD (E.C. 1.15.1.1) cataliza la dismutación del anión superóxido, originando peróxido de hidrógeno. Existen distintas formas, dependiendo del metal del centro catalítico: I_2 , Zn, Cu-SOD citosólica, la Mn-SOD mitocondrial y la EC-SOC extracelular (12).
 - La CAT (E.C. 1.11.1.6) es un enzima tetramérica que cataliza la descomposición del peróxido de hidrógeno en agua. Está presente en la mayoría de las células eucariotas, localizándose a nivel de los peroxisomas (13).
 - Por último, está la GPX (E.C. 1.11.1.9), que también contribuye a la eliminación del peróxido de hidrógeno pero, a diferencia de la CAT, que usa el peróxido de hidrógeno como dador de electrones, utiliza el glutatión reducido. Existen dos formas: la selenio dependiente y la selenio independiente y, en vertebrados, se encuentran en el citosol y en las mitocondrias (14). Además está la glutatión reductasa (GR, E.C. 1.6.4.2), que se encarga de mantener la proporción GSH/GSSG.
- 2) Los antioxidantes no enzimáticos están presentes en la dieta ingerida por los seres vivos, sobre todo en las frutas y verduras. Sus principales características son que son sustancias capaces de neutralizar un único radical libre por molécula (cazadores estequiométricos), sólo actúan a concentraciones elevadas y tienen un papel despreciable frente a los anteriores.
- Un primer grupo de antioxidantes no enzimáticos lo constituyen moléculas reductoras de pequeño tamaño e hidrosolubles. Dentro de ellas tenemos al glutatión reducido y el ascorbato o vitamina C. Pueden actuar tanto como pro o antioxidantes. Así, pueden autooxidarse, especialmente en presencia de metales, para producir RSOs. Al ser hidrofílicos, no son efectivos frente a la peroxidación lipídica (15).
 - Un segundo grupo de antioxidantes no enzimáticos son las vitaminas liposolubles. Aquí están el α -tocoferol o vitamina E, que es capaz de impedir las reacciones en cadena producidas por los radicales hidroperoxilo durante la peroxidación lipídica (16) y el α -caroteno, que ofrece una protección eficaz frente al oxígeno singlet (16).

ENFERMEDADES DEGENERATIVAS OCASIONADAS POR LOS RSOs

Existen numerosas enfermedades que se han vinculado a la formación de RSOs e, incluso, el mismo proceso de envejecimiento. Tenemos aquí algunos ejemplos:

Carcinogénesis

Se ha comprobado la participación de los RSOs en la iniciación y promoción de la carcinogénesis. Pueden actuar como iniciadores y/o promotores, causan daño en el DNA, activan procarcinógenos y alteran el sistema de defensa antioxidante (17).

Infección crónica, inflamación y cáncer:

Los fagocitos usan para combatir contra los organismos patógenos una batería de oxidantes (NO, superóxido, peróxido de hidrógeno, hipoclorito). Estas especies pueden causar daño

en el DNA, mutaciones y, por lo tanto, cáncer. Algunos ejemplos: los virus de la hepatitis A y C son la mayor causa de hepatocarcinoma. La esquistomosis puede provocar cáncer de colon. Parásitos hepáticos, como el *Opisthorchis viverrini* y el *Chlonorchis sinensis*, aumentan el riesgo de colangiocarcinoma. La exposición a asbestos causa inflamación crónica y cáncer de pulmón (11).

Tabaco y cáncer:

El tabaco posee una gran cantidad de sustancias carcinógenas (como los óxidos de nitrógeno) y es la causa de la tercera parte de los cánceres en EE.UU. Así, el radical NO puede reaccionar con el radical superóxido para dar lugar al peroxinitrilo y con el radical peroxilo para originar el alquil peroxinitrilo, ambas especies fuertemente oxidantes (18).

Enfermedades Cardiovasculares:

Las reacciones de oxidación juegan un importante papel en la aterogénesis y la enfermedad vascular está relacionada con bajas concentraciones en plasma de ascorbato, α -tocoferol y β -caroteno. Una mayor evidencia es que la oxidación de la apolipoproteína B100 por productos de la peroxidación lipídica hace que ésta sea reconocida por la LDL y sea captada por los macrófagos, lo que conduce a la formación de placas ateroscleróticas (19).

Enfermedades del sistema inmunitario

Por estudios *in vitro*, se ha comprobado que los leucocitos polimorfonucleares y los macrófagos pueden inhibir la proliferación de linfocitos a través de la producción de RSOs, PG E₂ y NO y, por tanto, disminuye las defensas del individuo (11).

Cataratas

Se ha demostrado que, tanto el tabaco como las radiaciones, son las principales causas de aparición de cataratas. En esta patología, las proteínas de los ojos presentan más de un 60% de sus residuos de metionina oxidados (11). Asimismo se ha visto que los antioxidantes de la dieta retardan los procesos destructivos en la retina y en el epitelio retinal que conducen a la degeneración de la mácula (20).

Disfunciones generales

Los RSOs son causa de algunas patologías cerebrales, como la isquemia cerebral, la enfermedad de parkinson y la esclerosis lateral amiotrófica. Así, por ejemplo, tenemos que en los pacientes parkinsonianos se ha encontrado una alta cantidad de DNA en neuronas dopaminérgicas. En la isquemia cerebral, liberan grandes cantidades de hierro, que es un importante catalizador en la formación de RSOs. La mayor evidencia de la relación entre desórdenes neurológicos y formación de RSOs es la fuerte relación entre la esclerosis lateral amiotrófica y las mutaciones en la Cu, Zn-SOD, indicando que los RSOs son los responsables de la degeneración selectiva de la neuronas motoras (21).

NIVELES ÓPTIMOS DE ANTIOXIDANTES:

Según el Instituto Nacional de Cáncer y la Academia Nacional de Ciencias de EE.UU., se sugiere que dos frutas y tres verduras por día una ingesta adecuada ⁽¹⁾.

He aquí algunos ejemplos de alimentos ricos en antioxidantes:

- Alimentos ricos en vitamina E: maní, germen de trigo, aceites vegetales, aceituna, margarinas y espárragos.
- Alimentos ricos en vitamina C, que también contienen α -caroteno: pimientos rojos y verdes, fresas, naranjas, brécol, kiwi, zumo de tomate, naranja y uva, sandía, patata cocida y coles de brucas.
- Alimentos ricos en β -caroteno, que contienen vitamina C: papa dulce cocida, papaya, zanahorias, espinaca, tomates, albaricoque, manteca de maní y calabaza en lata.

Las frutas y verduras, además de proporcionar estos antioxidantes, poseen también micronutrientes, que pueden prevenir mutaciones. Así por ejemplo, el ácido fólico es necesario para la síntesis de nucleótidos en el DNA y se ha demostrado que su deficiencia causa ruptura cromosómica y es factor de riesgo en el infarto de miocardio. La niacina se requiere para formar la poli-ADP-ribosa, un componente del DNA.

A la hora de establecer los niveles diarios recomendables de antioxidantes, hay que tener en cuenta dos factores: En primer lugar, si el individuo está sano o presenta algún tipo de patología. Por ejemplo, en el caso de fumadores, estos necesitan mucha mayor cantidad de ascorbato que los no fumadores, ya que su catabolismo de vitamina C es mayor. Asimismo, las embarazadas también precisan una mayor ingesta por la pérdida de vitamina C que sufren a través de la placenta. En segundo lugar, los niveles de antioxidantes son un parámetro más adecuado que la ingesta diaria de antioxidantes, puesto que la metabolización en cada individuo es distinta ⁽¹⁾, siendo los niveles recomendados de 50 μ M para la vitamina C, 30 μ M para la vitamina E y 4 μ M para el β -caroteno ⁽²⁾.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Sies, H. *Eur. J. Biochem.* 1993; 215:213-219.
- 2) Halliwell, B. *Free Rad. Res. Comms.* 1990; 9(1): 1-32.
- 3) Fridovich, I. En: *Free Radicals in Biology*; Pryor, W.A. (ed). New York, Academic Press. 1976; (1). pp. 239-277.
- 4) Mc Cord, J. En: *Reviews in Biochemical Toxicology*. Hodgson E., Bend J. Y Philpot R.M. (Eds.). Elsevier/North Holland. New York. 1979; (1) pp.109-124.
- 5) Halliwell, B. y Gutteridge, J.M.C. En: *Free Radicals in Biology and Medicine*. 2nd edition. Clarendon Press. Oxford. U.K. 1989.
- 6) Haber, F. Y Weiss, J. *Proc. R. Soc. London (A)*. 1934; 147:332-351
- 7) Pryor, W.A. *Ann. Rev. Physiol.* 1986; 48:657-667.
- 8) Montero Torreiro, M.F. Tesis de Licenciatura. Universidad de Santiago de Compostela 1995.
- 9) Winston, G.W. En: *Stress responses in Plants. Adoption and acclimation Mechanisms*. pp.1990; 57-86.
- 10) Kappus, H. Y Sies, H. *Experientia*. 1981; 37:1233-1241.
- 11) Ames, B.N., Shigenaga, M.K. y Hagen, M.T. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*. 1993; 90: 7915-7922.
- 12) Fridovich, I. *Annu. Rev. Biochem.* 1975; 44:147-159.
- 13) Di Giulio, R.T. En: *Aquatic Toxicology and Risk Assessment*, 14th volume. ASTM STP 1124, M.A. Mayes y M.G. Barren, (eds.). American Society for testing and materials. Philadelphia. 1991; pp. 15-31.
- 14) Blum, J. y Fridovich, I. *Arch. Biochem. Biophys.* 1984; 228:617-620.
- 15) Doba, T., Burton, G.W. e Ingold, K.V. *Biochem. Biophys. Acta*. 1985; 835:298-303.
- 16) Niki, E., Saito T., Kawakami, A. Y Kamiya, Y. *J. Biol. Chem.* 1984; 259:4177-4182.
- 17) Sun, Y. *Free Rad. Biol. Med.* 1990; 8:583-599.
- 18) Eiserich, J.P., van der Vliet, A., Handelman, G.J., Halliwell, B. Y Cross, C.E. *Am. J. Clin. Nutr.* 62 1995; (6): 1490S-1500S
- 19) Witztum, J.L. *The Lancet*. 1994; 26:113-116.
- 20) Taylor, A., Jaques, P.F. y Epstein, E.M. *Am. J. Clin. Nutr.* 62(6) 1995; 1439S-1447S.
- 21) Jenner, P. *The Lancet*, 26 (2)1995; 99-101.
- 22) Gey, K.F., Stahelin, H.B. y Ballmer, P.E. *Ther. Umsch.* 1994; 51:465-482.