

## Estrés oxidativo: Principios básicos



### Información clave

- El estrés oxidativo ocurre como consecuencia de un desequilibrio entre oxidantes y antioxidantes corporales.
- Especies de oxígeno reactivo son los oxidantes clave que se producen normalmente en condiciones fisiológicas, pero pueden causar daños a las células y a los tejidos cuando ocurren en altas concentraciones, que los oxidantes no consiguen compensar. Es posible evaluar el estrés oxidativo a diferentes niveles: 1) Midiendo la capacidad antioxidante (evaluando componentes individuales con propiedades antioxidantes, por ej. tocoferol (Vitamina E) o glutatión peroxidasa, o evaluando estos componentes globalmente, por ejemplo, como la capacidad antioxidante total. 2) Al cuantificar el daño oxidativo en moléculas orgánicas; por ejemplo, con la monitorización de la peroxidación lipídica midiendo sustancias reactivas al ácido tio-bartitúrico, y 3) a través de la evaluación indirecta de radicales libres al cuantificar los primeros productos de la oxidación, como los hidroperóxidos.
- El Glutatión es un antioxidante clave. Se trata de un tripéptido que contiene cisteína y un incremento del requerimiento de glutatión cambia el metabolismo de la metionina para producir cisteína. El Glutatión generalmente se mide como un indicador de estrés oxidativo.

### Introducción

En condiciones normales, los organismos vivos usan más del 90 % del oxígeno consumido en la cadena de transporte de electrones (las principales fuentes de ATP en las células), a través de la reducción de cuatro electrones. A esto se añade la oxidación de nutrientes, lo que resulta en la producción de energía, dióxido de carbono y agua. Sin embargo, menos del 5 % del oxígeno consumido entra a la reducción parcial de un electrón a través de la adición de electrones que llevan a la formación de una serie de productos colectivamente denominados especies reactivas de oxígeno (ROS) (Lushchak and Semchyshyn, 2012). Estos abarcan el radical anión superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), radicales de hidróxilo ( $OH^{\bullet}$ ), peróxilo ( $RO_2^{\bullet}$ ), alcoxilo ( $RO^{\bullet}$ ), así como los óxidos de nitrógeno (especie reactivas de oxígeno: RNS). Otros radicales libres son por ejemplo el átomo de hidrógeno o radicales que se han separado de electrones que constituyen el azufre o iones de transición del metal como Fe o Cu (Halliwell and Gutteridge, 1999). Sin embargo, nos centraremos en las ROS.

Las ROS, especialmente cuando son producidas en grandes cantidades necesitan ser neutralizadas. La neutralización de las ROS ocurre a través de la acción del sistema antioxidante corporal, sino dañarían las moléculas orgánicas, células y tejidos.

Existen varias definiciones de estrés oxidativo. La definición más reciente y completa es la siguiente: "estrés oxidativo es un aumento pasajero o crónico del nivel fijo de ROS, que afecta la parte central de las células y señala un proceso que lleva a la modificación oxidativa de los constituyentes celulares de forma perjudicial" (Lushchak and Semchyshyn, 2012). Diciéndolo de una manera más simple y fácil de entender: "El estrés oxidativo es un desequilibrio entre la producción de ROS y la detoxificación".

**Figura 1** Oxidación de una manzana y prevención de la oxidación usando limón que contiene vitamina C (ácido ascórbico) que es antioxidante



El daño provocado por el estrés oxidativo a las células y tejidos puede compensarse con antioxidantes naturales. La Figura 1 presenta un ejemplo fácil y conocido que muestra el daño oxidativo en una rodaja de manzana y cómo es posible evitarlo mediante el uso de un antioxidante. En este caso particular, el jugo de limón se usa como una fuente

de antioxidante ya que contiene considerables cantidades de vitamina C (ácido ascórbico) que es un antioxidante que previene la oxidación de la manzana.

El estrés oxidativo es un tema de gran interés en la actualidad ya que cada vez hay más publicaciones y presentaciones sobre los aminoácidos azufrados. Esto se debe a que el glutatión (GSH) contiene cisteína que es un antioxidante clave para el cuerpo. Por consiguiente, en este artículo vamos a profundizar sobre los elementos básicos del estrés oxidativo.

### Oxidación

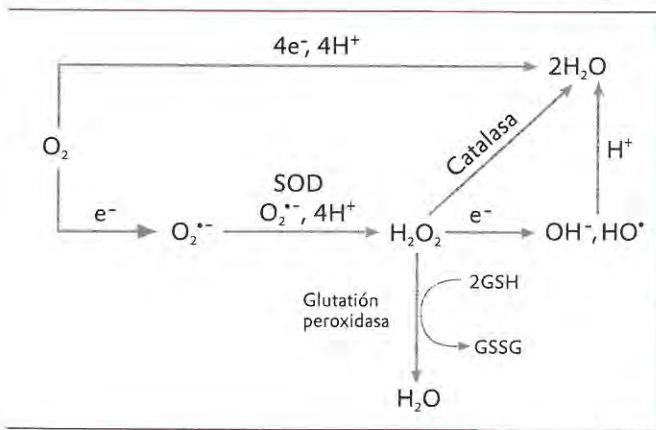
La oxidación es una reacción química que transfiere electrones o hidrógeno de una sustancia a un agente oxidante. La reacción de oxidación produce radicales libres. A su vez, los radicales libres interactúan con compartimentos celulares o moléculas circundantes, dañando o matando a la célula. La oxidación está siempre vinculada a la reducción, por ejemplo, la molécula que recibe un electrón será reducida. Estas dos reacciones juntas se denominan sistema redox (reducción-oxidación).

### ROS

El oxígeno consumido por los organismos vivos se usa para absorber electrones al final de la cadena de transporte de electrones (la principal fuente de producción de ATP en las células). Son 4 los electrones que normalmente reducen el oxígeno (Figura 2). La reducción parcial del oxígeno (por ejemplo, reducción de un electrón) lleva a la formación de moléculas reactivas llamadas ROS.

Las ROS se clasifican en dos categorías de radicales y no radicales (Evans and Halliwell, 2001). Los radicales son muy activos y tienen una vida media muy corta. Deben reaccionar inmediatamente con las moléculas circundantes (por ej. compartimentos celulares). Debido a ello, el foco principal es el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) que posee una vida media más larga. El  $H_2O_2$  es generado por varias enzimas in vivo; además, su producción es una parte importante de la defensa inmune innata. La liberación rápida de ROS (por ej. radical superóxido y  $H_2O_2$ ), también llamado estallido respiratorio o estallido oxidativo de la fagocitosis, es una reacción crucial para degradar partículas internalizadas y bacterias. El  $H_2O_2$  también se mezcla fácilmente con el agua y se difunde dentro y entre células, pudiendo llegar al torrente sanguíneo.

**Figura 2** Diferentes maneras de reducción del oxígeno y neutralización de ROS producido. radical anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), radical hidroxilo  $H_2O_2$ , anión hidroxilo ( $HO^{\cdot}$ ), hydroxyl anion ( $OH^-$ ), superóxido dismutasa (SOD) (Adaptado de Lushchak y Semchyshyn, 2012)

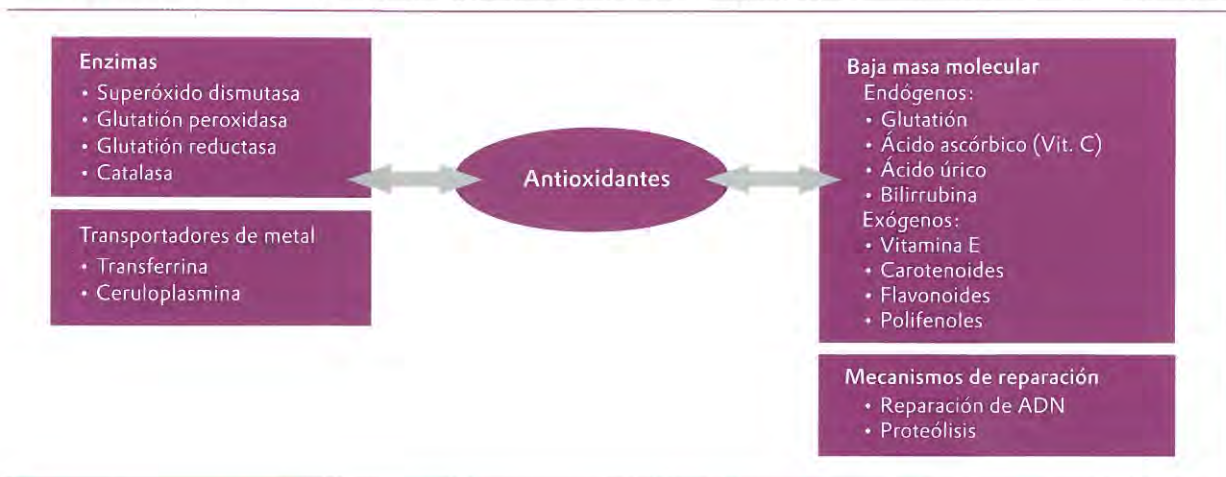


### Antioxidantes

Los antioxidantes son el sistema de defensa corporal contra las moléculas reactivas. El sistema antioxidante es complejo y variado (Figura 3) y restringirlo puede causar efectos irreversibles de ROS en moléculas orgánicas como lípidos, proteínas, ADN o ARN y, consecuentemente, com-

prometer sus funciones fisiológicas. El sistema antioxidante consiste en antioxidantes de masa molecular baja, como las vitaminas C y E, enzimas como SOD, transportadores de metal, y también mecanismos de reparación que compensan los daños oxidativos a bajos niveles.

**Figura 3** Lista de diferentes sistemas antioxidantes corporales (Adaptado de Evans y Halliwell, 2001)

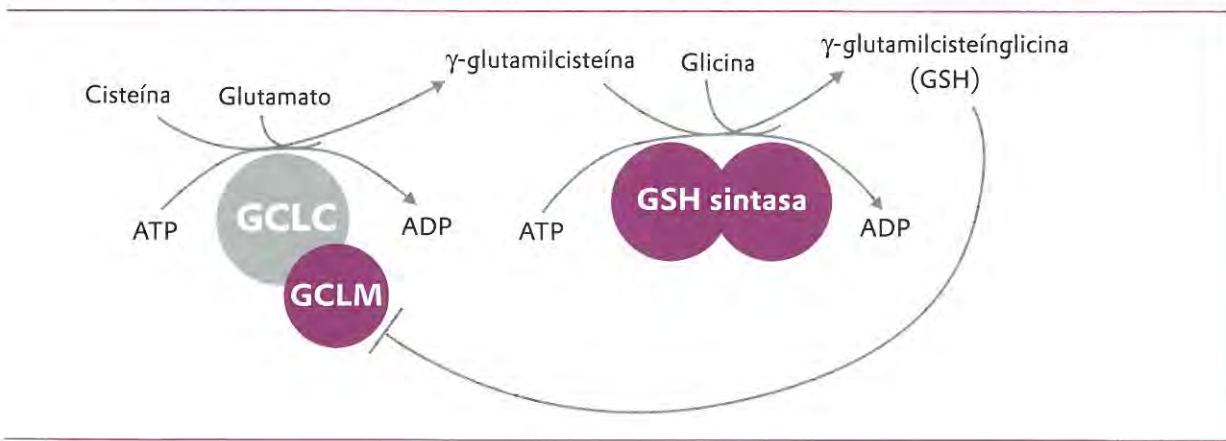


### GSH: El antioxidante clave

El GSH (nombre bioquímico:  $\gamma$ -glutamilcisteinilglicina) es uno de los antioxidantes de baja masa molecular y constituye el principal antioxidante corporal. El GSH es un tripéptido con una conexión entre cisteína, glicina y glutamato (Figura 4). El GSH es importante para nosotros porque posee cisteína como un aminoácido azufrado en su estructura. Un aumento en los requerimientos de GSH como consecuencia del estrés oxidativo corporal incrementará el requerimiento de cisteí-

na y cambiará la ruta del metabolismo de metionina para la producción de cisteína. Se sabe que la cisteína no limitará la tasa de producción de GSH en el hígado (un órgano fundamental para la detoxificación que necesita GSH) y los eritrocitos (glóbulos rojos) (Courtney-Martin *et al.*, 2012; Courtney-Martin *et al.*, 2010; Courtney-Martin *et al.*, 2008) lo que significa que la falta de cisteína será cubierta por la transulfuración de metionina. La biosíntesis de GSH ocurre en el citosol de una

**Figura 4** Síntesis de GSH. La síntesis de GSH ocurre a través de un proceso enzimático de dos fases que requiere ATP. La GCL cataliza la primera parte que está compuesta de subunidades catalíticas y de modificación (GCLC y GCLM). Este paso conjuga cisteína con glutamato generando  $\gamma$ -glutamilcisteína. El segundo paso es catalizado por la GSH sintasa, que añade glicina al  $\gamma$ -glutamilcisteína para formar  $\gamma$ -glutamilcisteinilglicina. El GSH ejerce una inhibición de feedback negativo sobre la GCL (Adapted from Lu, 2013)



forma extremadamente regulada. Determinantes clave de la síntesis de GSH son la disponibilidad del precursor de aminoácidos sulfurados, cisteína y la actividad de enzima limitante de tasa, glutamato cisteína ligasa (GCL). La segunda enzima de la síntesis del GSH es la GSH sintasa (GS) (Lu, 2013).

El GSH existe en dos formas: forma reducida y oxidada. La transformación GSH de la forma reducida a la oxidada depende de actividades enzimáticas específicas (Figura 5). La oxidación de GSH provoca la reducción de  $H_2O_2$  a agua para así proteger compartimentos celulares del daño ROS.

**Figura 5** El sistema GSH consiste en GSH reducido, glutatión oxidado, glutatión peroxidasa y glutatión reductasa. Adaptado de Pompella *et al.* (2003)



#### Modificación de lípidos inducida por ROS

La oxidación de lípidos inducida por ROS se denomina "peroxidación lipídica (PL)". Varios productos de la PL son comúnmente usados como medidas de la modificación lipídica y la evaluación de la concentración del malonil dialdehído (MDA) ocupa la posición principal. Con frecuencia se mide usando ácido tiobarbitúrico, lo que explica porque los productos medidos incluyendo otros compuestos además del MDA son denominados sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS). Sin embargo, éste es un método inespecífico y debería ser usado con muchas precauciones (Lushchak *et al.*, 2011). Recientemente, se introdujo una técnica HPLC para medir solamente la concentración de MDA (versus TBARS midiendo MDA además de otras moléculas) y por ser más específico puede recomendarse donde sea posible utilizar (Fedotcheva *et al.*, 2008).

#### Modificación de lípidos inducida por ROS

Las alteraciones en las proteínas causadas por ROS preocupan especialmente en relación a la tirosina que lleva a la 3-nitrotirosina; fenilalanina y triptófano pueden también ser nitrados; el ataque de ROS resulta en una multiplicidad de productos finales. Para evaluar el daño oxidativo de la proteína, los niveles de proteína carbonilo son usados como un indicador de modificación oxidativa de la proteína. Carbonilación es la reacción que introduce al monóxido de carbono a sustancias orgánicas e inorgánicas. La carbonilación de proteína se refiere a la modificación de cadenas laterales de aminoácidos originarios en la proteína a derivados carbonilo (aldehído o cetona) (Dalle-Donne *et al.*, 2003). Además, la determinación de proteína conteniendo ditirosina como productos transversales, denominados productos proteicos de oxidación avanzada también se usa para investigar el daño oxidativo a las proteínas (Witko-Sarsat *et al.*, 1998).

Generalmente las proteínas oxidadas modificadas son degradadas por diferentes proteasas. En algunos casos se pueden acumular o incluso convertir en productoras de ROS. El nivel de las proteínas oxidadas modificadas se emplea usualmente como marcador de estrés oxidativo (Lamarre *et al.*, 2009; Lushchak, 2007). Lo que todo indica que la medida de los carbonilos de la proteína es el abordaje más conveniente (Lenz *et al.*, 1989; Lushchak *et al.*, 2011).

#### Modificación del ADN inducida por ROS

La oxidación del ADN es una consecuencia más de la presencia de ROS en la célula. Este tipo de daño es muy importante para las funciones celulares, ya que puede llevar a mutaciones. Usualmente existen sistemas específicos que reparan el daño, no obstante, algunos se pueden detectar *in vivo*. 8-Oxoguanina es el marcador que se evalúa más frecuentemente para establecer el daño del ADN y se mide a través de HPLC (Olinski *et al.*, 2006) o técnicas inmunológicas (Ohno *et al.*, 2009). Además, el llamado ensayo cometa, así como el acortamiento de los telómeros se aplican para controlar grandes daños en el ADN en los organismos (Jha, 2008; Vevers and Jha, 2008; Balasubramanyam *et al.*, 2010).

### Papeles benéficos de ROS

No toda la producción de ROS o RNS es accidental. Sin embargo, el cuerpo puede usar estos sustratos para su propio beneficio. El óxido nítrico (NO•) encuentra una multiplicidad de usos, por ejemplo, como un regulador del tono vascular y como mensajero del sistema nervioso central. (Bredt, 1999). La producción de especies reactivas por los neutrófilos activados, macrófagos y muchos otros tipos de células se utiliza en la destrucción bacteriana. De hecho ROS y RNS pueden tener una variedad de funciones, incluyendo la regulación de la expresión génica (Jabs, 1999) y la inducción de apoptosis (Stewart, 1994): la muerte celular programada que participa en el desarrollo del feto y la remodelación de tejidos donde se producen los cambios en el tipo y distribución de tejidos (Evans y Halliwell, 2001). Un ejemplo más sobre el papel regulador de ROS es la regulación de las citoquinas pro-inflamatorias y factores de transcripción relacionados con la inflamación (Kudva y Kaushal, 2013).

### Conclusión

En este artículo compartimos conocimientos básicos sobre estrés oxidativo y sus elementos (antioxidantes y moléculas reactivas), así como una lista de los factores medidos comúnmente que se usan para presentar la gravedad del estrés oxidativo.

### Siglas

GCL	Glutamato cisteína ligasa
GSH	Glutación
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrógeno
LPO	Peroxidación lipídica
MDA	Malonil dialdehído
RNS	Especies de nitrógeno reactivo
ROS	Especies de oxígeno reactivo
SOD	Superóxido dismutasa
TBARS	Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico

### Bibliografía

- Balasubramanyam, M., A. Adaikalakoteswari, Z. Sameermahmood, and V. Mohan (2010): Biomarkers of oxidative stress: methods and measures of oxidative DNA damage (COMET assay) and telomere shortening. *Methods in Molecular Biology* (Clifton, N.J.) 610: 245-261.
- Bredt, D. S. (1999): Endogenous nitric oxide synthesis: biological functions and pathophysiology. *Free Radical Research* 31 (6): 577-596.
- Courtney-Martin, G., R. O. Ball, and P. B. Pencharz (2012): Sulfur amino acid metabolism and requirements. *Nutrition Reviews* 70 (3): 170-175.
- Courtney-Martin, G., A. M. Moore, R. O. Ball, and P. B. Pencharz (2010): The addition of cysteine to the total sulphur amino acid requirement as methionine does not increase erythrocytes glutathione synthesis in the parenterally fed human neonate. *Pediatric Research* 67 (3): 320-324.
- Courtney-Martin, G., M. Rafii, L. J. Wykes, R. O. Ball, and P. B. Pencharz (2008): Methionine-adequate cysteine-free diet does not limit erythrocyte glutathione synthesis in young healthy adult men. *The Journal of Nutrition* 138 (11): 2172-2178.
- Dalle-Donne, I., R. Rossi, D. Giustarini, A. Milzani, and R. Colombo (2003): Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clinica Chimica Acta, International Journal of Clinical Chemistry* 329 (1-2): 23-38.
- Evans, P. and B. Halliwell (2001): Micronutrients: oxidant/antioxidant status. *The British Journal of Nutrition* 85, Suppl. 2: S67-S74.
- Fedotcheva, N. I., E. G. Litvinova, Z. G. Amerkhanov, S. V. Kamzolova, I. G. Morgunov, and M. N. Kondrashova (2008): Increase in the contribution of transamination to the respiration of mitochondria during arousal. *Cryo Letters* 29 (1): 35-42.
- Halliwell, B. and J. M. Gutteridge (1999): *Free radicals in biology and medicine*. New York: Oxford University Press Inc.

- Jabs, T. (1999): Reactive oxygen intermediates as mediators of programmed cell death in plants and animals. *Biochemical Pharmacology* 57 (3): 231-245.
- Jha, A. N. (2008): Ecotoxicological applications and significance of the comet assay. *Mutagenesis* 23 (3): 207-221.
- Kudva, A. K. and N. Kaushal (2013): Oxidative stress and inflammation: „The lesser of two evils“ in Carcinogenesis. *Post Doc Journal* 1 (2): 89-101.
- Lamarre, S. G., N. R. Le Francois, W. R. Driedzic, and P. U. Blier (2009): Protein synthesis is lowered while 20S proteasome activity is maintained following acclimation to low temperature in juvenile spotted wolffish (*Anarhichas minor* Olafsen). *The Journal of Experimental Biology* 212 (Pt 9): 1294-1301.
- Lenz, A. G., U. Costabel, S. Shaltiel, and R. L. Levine (1989): Determination of carbonyl groups in oxidatively modified proteins by reduction with tritiated sodium borohydride. *Analytical Biochemistry* 177 (2): 419-425.
- Lu, S. C. (2013): Glutathione synthesis. *Biochimica et Biophysica Acta* 1830 (5): 3143-3153.
- Lushchak, V. and H. M. Semchyshyn (2012): *Oxidative Stress - Molecular Mechanisms and Biological Effects*. Rijeka, Croatia: InTech.
- Lushchak, V. I. (2007): Free radical oxidation of proteins and its relationship with functional state of organisms. *Biochemistry (Mosc.)* 72 (8): 809-827.
- Lushchak, V. I., H. M. Semchyshyn, and O. V. Lushchak (2011): *The Classic Methods to Measure Oxidative Damage: Lipid Peroxides, Thiobarbituric-Acid Reactive Substances, and Protein Carbonyls*. *Oxidative Stress in Aquatic Ecosystems* (John Wiley & Sons, Ltd.): 420-431.
- Ohno, M., S. Oka, and Y. Nakabeppu (2009): Quantitative analysis of oxidized guanine, 8-oxoguanine, in mitochondrial DNA by immunofluorescence method. *Methods in Molecular Biology* (Clifton, N.J.) 554: 199-212.
- Olinski, R., R. Rozalski, D. Gackowski, M. Foksinski, A. Siomek, and M. S. Cooke (2006): Urinary measurement of 8-OxoG, 8-OxoGua, and 5HMUra: a noninvasive assessment of oxidative damage to DNA. *Antioxidants and Redox Signaling* 8 (5-6): 1011-1019.
- Stewart, B. W. (1994): Mechanisms of apoptosis: integration of genetic, biochemical, and cellular indicators. *Journal of National Cancer Institute* 86 (17): 1286-1296.
- Vevers, W. F. and A. N. Jha (2008): Genotoxic and cytotoxic potential of titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>) nanoparticles on fish cells *in vitro*. *Ecotoxicology (London, England)* 17 (5): 410-420.
- Witko-Sarsat, V., M. Friedlander, T. N. Khoa, C. Capeillere-Blandin, A. T. Nguyen, S. Canteloup, J. M. Dayer, P. Jungers, T. Drüeke, and B. Descamps-Latscha (1998): Advanced oxidation protein products as novel mediators of inflammation and monocyte activation in chronic renal failure. *Journal of Immunology* 161 (5): 2524-2532.



Dr. Behnam Saremi  
behnam.saremi@evonik.com