

El estrés oxidativo



Abelardo Sztrum Ángela B. Juárez María C. Ríos de Molina

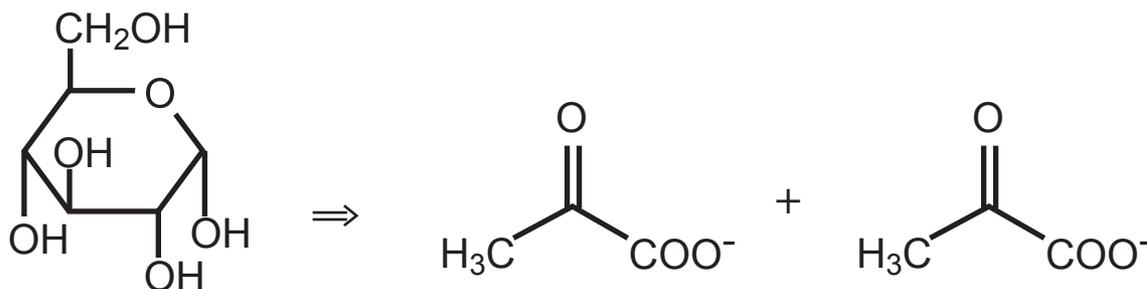
Laboratorio de Enzimología Estrés y Metabolismo,
Dpto. Química Biológica, FCEN, UBA

En 1789 tuvo lugar una violenta explosión popular que pasó a la historia como la Revolución Francesa. Ese mismo año, un francés que acompañó a la revolución desde la fila de los moderados empleó por primera vez el término “radical”. Se trataba de Lavoisier, era químico, y cuando hablaba de radical no se refería a la política sino a una “entidad” que componían los ácidos con el oxígeno. Lavoisier perdió la cabeza en la guillotina, pero hoy no se puede hablar de química sin rendirle un republicano tributo.

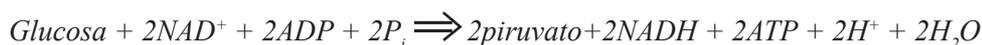
Hacia fines del siglo XIX, Eduard Buchner demostró que procesos claves para el mantenimiento de la vida, como la fermentación, podían ocurrir fuera de la célula viva; además propuso que la fermentación resulta de la actividad de una enzima, que llamó zimasa. Años más tarde Buchner ganaría el premio Nobel por estas investigaciones.

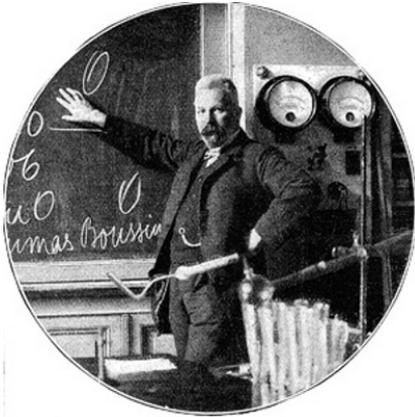
Actualmente incluimos este proceso en el llamado proceso de la glucólisis, del griego glycos: azúcar + lysis: ruptura. La glucólisis es la vía metabólica encargada de oxidar la glucosa y producir energía química, almacenada principalmente en el ATP (adenosín trifosfato), energía química que es utilizada por la célula para cumplir sus funciones vitales.

La glucólisis no requiere la presencia de oxígeno, es decir ocurre en condiciones anaeróbicas. A partir de los descubrimientos de Buchner, pudo aceptarse también que este proceso, indispensable para la vida, surgió con la aparición de las primeras células, o antes. En 1941, Fritz Lipman y Herman Kalkar descubrieron las funciones de los compuestos de alta energía como el ATP en el metabolismo celular. La glucólisis anaerobia tiene un rendimiento energético de 2 moléculas de ATP (compuesto de alto contenido energético) por molécula de glucosa.



Los organismos primitivos se originaron hace más de 3.500 millones de años, en un mundo cuya atmósfera carecía de oxígeno molecular (O_2), por lo cual la glucólisis se considera como la vía metabólica más primitiva. Esta vía metabólica consiste de 10 reacciones enzimáticas en las cuales la glucosa se convierte en piruvato. Dicha transformación conlleva a la producción de dos moléculas de ATP.





Eduard Buchner (1860-1917) fue un químico alemán galardonado con el premio Nobel en 1907 por su descubrimiento de la fermentación en ausencia de células vivas.

Murió a los 57 años por las heridas de balas recibidas en batalla, durante la Primera Guerra Mundial, donde sirvió en un hospital de campaña en primera línea.

El “metabolismo aerobio”¹ (respiración aerobia) surgió después de la aparición del proceso de fotosíntesis oxigénica en las primeras cianobacterias (organismos procariotas), las cuales fueron responsables de que se liberara oxígeno a la atmósfera. El enriquecimiento de la atmósfera terrestre con O₂, representó hace unos 2.000 millones de años, el factor evolutivo que permitió el desarrollo de un metabolismo aerobio mucho más eficiente que el anaerobio y favoreciendo así la gran diversificación de los organismos.

Durante el proceso conocido como respiración celular, los organismos aerobios utilizan el oxígeno atmosférico en la combustión de moléculas como la glucosa, para la obtención de la energía requerida por la célula. La respiración celular tiene lugar en tres etapas: glucólisis, ciclo de Krebs y cadena respiratoria (Fig.1) que, en las células eucariotas, se lleva a cabo gracias a una organela celular especializada, la mitocondria, que representa la “usina” de las células eucariotas con metabolismo aerobio. La primera etapa ocurre sin la intervención del oxígeno, estando presente tanto en células aerobias como anaerobias, en tanto que las dos últimas son exclusivas de las células aerobias. Si bien el Ciclo de Krebs no utiliza directamente O₂, lo requiere al estar asociado a la fosforilación oxidativa acoplada a la cadena de transporte de electrones (cadena respiratoria). Si se considera la degradación total de la molécula de glucosa, la célula obtiene un total de 38 ATP, es decir 19 veces el rendimiento obtenido mediante el metabolismo anaeróbico (glucólisis más fermentación). Aunque los hidratos de carbono (principalmente la glucosa) son las principales moléculas degradadas por la respiración aerobia, también pueden degradarse lípidos y proteínas. La respiración celular es, por lo tanto, el conjunto de reacciones bioquímicas por medio de las cuales se degradan los compuestos orgánicos (hidratos de carbono, lípidos, proteínas) provenientes de las fuentes de reserva celulares o, en el caso de animales, de la alimentación, a sustancias inorgánicas, liberando energía que es almacenada en forma de ATP.

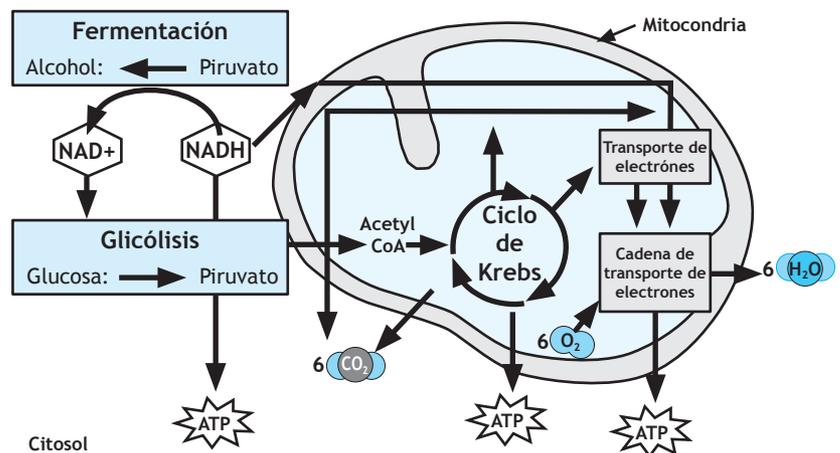
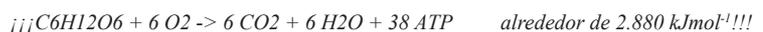


Fig. 1. Esquema simplificado de las tres etapas bioquímicas del metabolismo aeróbico. La gran ventaja energética de los organismos aerobios eucariotas reside en la adquisición de las mitocondrias, donde tienen lugar el ciclo de Krebs y la cadena de transporte electrónico de la respiración celular.



1) El adjetivo “aerobio” se aplica tanto a los procesos implicados como a los ambientes donde se realizan (“metabolismo aerobio” y “ambiente aeróbico”, respectivamente). Un “ambiente aerobio” es rico en oxígeno, en tanto que en uno anaeróbico el oxígeno está ausente.



El extraordinario aumento de la eficiencia energética adquirido por los organismos que desarrollaron un metabolismo aeróbico en respuesta a una atmósfera enriquecida por oxígeno, representó también uno de los primeros grandes eventos de toxicidad que condujo, a través de la evolución, a que los organismos desarrollen mecanismos de defensa contra los productos de las sucesivas reducciones monoeléctricas que sufre el oxígeno, formando las Especies Reactivas del Oxígeno (EROs en castellano, ROS por las siglas en inglés). Estas moléculas poseen una altísima reactividad con la mayoría de las moléculas biológicas, provocando su oxidación, la cual puede devenir en pérdida de función y/o lisis.

En 1789 Antoine-Laurent de Lavoisier utilizó el término “radical” para describir una “entidad” que componían los ácidos con el oxígeno. Este término se siguió asociando a distintos tipos de moléculas orgánicas, aunque prescindiéndose a confusión en muchas oportunidades. Posteriormente, en 1847, Michael Faraday demostró las fuertes propiedades paramagnéticas del oxígeno, propiedades que luego se atribuirían a las moléculas con electrones desapareados llamadas Radicales Libres. Recién en el año 1900, los experimentos de Moses Gomberg dieron una base sólida para explicar la existencia de los radicales, que se caracterizaban por su alta reactividad; desde entonces, numerosos estudios químicos se orientaron a dilucidar la naturaleza de estas moléculas reactivas e inestables [1], las cuales hoy se incluyen dentro de las llamadas EROs.

Con el desarrollo de las técnicas de Resonancia Paramagnética Electrónica, en 1954 fue posible detectar y cuantificar la presencia de radicales libres en tejidos animales y vegetales, encontrando una asociación entre el estado metabólico y la producción de dichos radicales [2]. Asimismo, se propuso que los radicales libres eran los responsables de la toxicidad del oxígeno [3]. Este hecho tuvo una fuerte repercusión en la fisiología, ya que hasta el momento se consideraba que la inestabilidad de los radicales libres conocidos y su corta vida media, los hacían poco relevantes para los procesos bioquímicos en los que se podían formar [2]. Dos años después, Denham Harman describió a los radicales libres como “Cajas de Pandora” que se forman como sub-productos de ciertas reacciones enzimáticas y causan daños celulares, mutagénesis, cáncer y los procesos degenerativos del envejecimiento biológico [4]. El descubrimiento de la enzima Superóxido Dismutasa y su función neutralizadora del radical superóxido [5], confirmó de manera contundente la relevancia de los radicales libres en la biología [4].

Desde el punto de vista químico, los compuestos capaces de aceptar electrones son agentes oxidantes y los donantes son agentes reductores. Cuando un agente reductor dona su electrón, está causando la reducción de otro compuesto y recíprocamente, un oxidante acepta el electrón de un agente que se está oxidando. Desde un punto de vista biológico, los agentes reductores y oxidantes que interactúan con las macromoléculas de los organismos suelen denominarse antioxidantes y pro-oxidantes respectivamente [6].

En 1985, Helmut Sies definió el término estrés oxidativo referido a un sistema biológico como “una perturbación del equilibrio pro-oxidantes/antioxidantes, a favor de los primeros, que conduce a un potencial daño” [7]. Todos los organismos aeróbicos generan un nivel basal de especies pro-oxidantes como consecuencia de la respiración mitocondrial, el cual es contrarrestado por la producción de enzimas y metabolitos antioxidantes [7]. En el caso de los organismos fotosintéticos, muchos eventos relacionados a la etapa fotoquímica de la fotosíntesis son generadores de radicales libres y otras EROs. Cuando la intensidad lumínica es elevada y la incidencia de fotones en el cloroplasto sobrepasa la capacidad fotosintética del mismo, tiene lugar el efecto conocido como fotoinhibición, entrando la célula de este modo en estado de estrés oxidativo [8-9]. El estrés oxidativo ejerce un amplio rango de efectos a nivel celular, entre



Denham Harman, nacido en 1916, es reconocido como el padre de la teoría que explica el rol de los radicales libres en el envejecimiento.

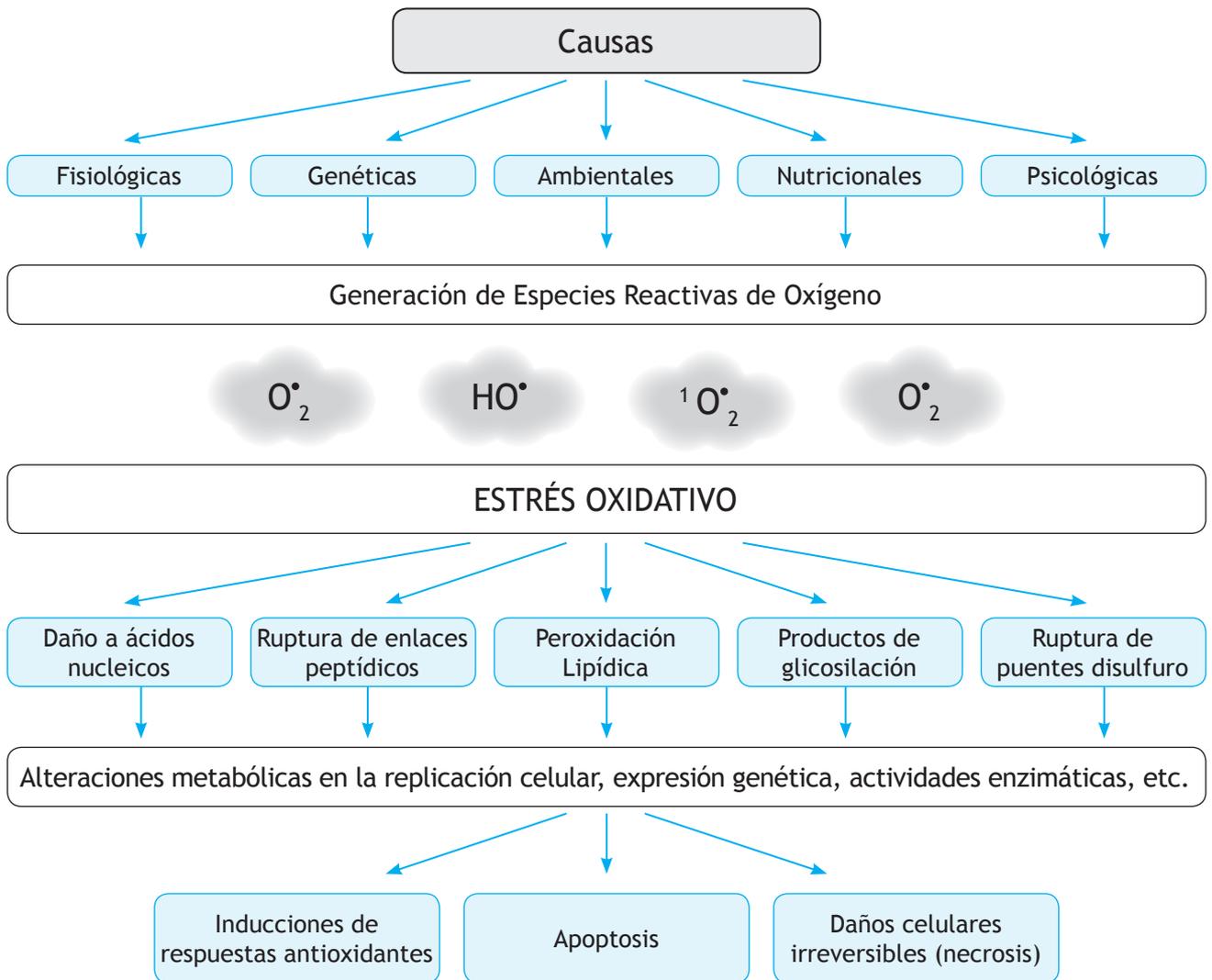


Fig. 2. Esquema de las causas y efectos relacionados con el estrés oxidativo.
 $O_2^{\bullet -}$ - radical superóxido, HO^{\bullet} radical hidroxilo, $^1O_2^{\bullet}$ oxígeno singulete, ROO^{\bullet} Radical peróxido

los que se encuentran tanto la inhibición de la división como la elevada proliferación celular, la senescencia, la necrosis y/o la apoptosis [10] (Fig. 2).

El normal funcionamiento de un organismo implica una ligera preponderancia de las especies pro-oxidantes por sobre las antioxidantes [10], es decir, que el sistema antioxidante no anula a las especies pro-oxidantes, sino que las regula [11]. Este hecho se ha explicado desde el punto de vista energético de la célula: generar un exceso de defensas antioxidantes podría ser más costoso que reparar una cierta cantidad de macromoléculas dañadas [10]. Otro motivo por el cual la “balanza” de los organismos aeróbicos está siempre inclinada hacia el lado de las especies pro-oxidantes, es la excepcional reactividad de algunas de ellas, como es el caso del radical hidroxilo (OH^{\bullet}), que reacciona inmediatamente con cualquier molécula que encuentre en su entorno, transformándola en otra especie prooxidante, lo que contribuye a mantener el desbalance hacia el estado general prooxidante. Como concepto general, ante una situación de estrés, un organismo puede atravesar distintos estados de perturbación que, según su intensidad y duración, pueden progresar hacia daños más severos o revertir hacia un estado de salud [12].

El estrés oxidativo se encuentra involucrado en procesos relacionados con el cáncer, diabetes, hipertensión y enfermedades degenerativas (Parkinson, Al-





La búsqueda del elixir de la vida, la panacea (del griego panakos, remedio para todo) para garantizar la vida y juventud eterna, acompañó los sueños de la humanidad durante siglos.

En la Edad Media, junto a la piedra filosofal, el elixir constituyó la principal preocupación de los alquimistas, como Roger Bacon y Alberto Magno, quienes creían que el oro disuelto en agua era la mentada panacea. Como sucedió tantas veces a lo largo de la historia de la ciencia, aunque los objetivos puedan resultar risibles en el siglo XXI, promovieron prácticas y habilidades que prepararon el terreno para la química moderna.

En la imagen, Roger Bacon, tal como fue retratado en Thirty more famous stories retold, de James Baldwin

zheimer, etc.), entre otras [13]. Sin embargo actualmente se sabe que en los seres vivos las EROs endógenas también están involucradas en numerosas cascadas de señalizaciones, imprescindibles para la homeostasis de los organismos, actuando como moléculas de defensa contra patógenos en fagocitos, durante los procesos de inflamación, como señales reguladoras de diversas vías metabólicas y en la respuesta a ciertas hormonas y factores de crecimiento involucrados en la señalización dependiente del estado de óxido-reducción del sistema [14].

El creciente interés por los efectos, tanto beneficiosos como perjudiciales, asociados al estrés oxidativo queda reflejado con el incremento en los trabajos publicados en esta área del conocimiento que para el año 2009 alcanzaron a más de 11.000 contribuciones (Fig. 3) de las cuales un número significativo se encuentra relacionado con las alteraciones de diversos parámetros fisiológicos por exposición a contaminantes [15-17]. Dichos estudios han permitido proponer al estrés oxidativo, evaluado como daño celular y/o alteración en los niveles de defensas antioxidantes, como un valioso biomarcador de exposición a los más diversos agentes físico-químicos, área dentro de la cual se encuentran enmarcados los estudios que realizamos en el Laboratorio de Enzimología Estrés y Metabolismo del Departamento de Química Biológica de la FCEyN - UBA, a través de los cuales se evaluó el efecto pro-oxidante de metales pesados [18-20] y plaguicidas [21-22].

Estudios sobre estrés oxidativo se están realizados en los más diversos sistemas

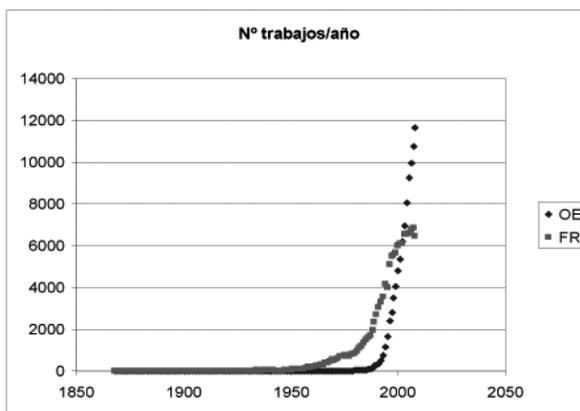
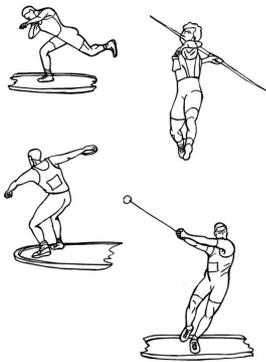


Fig. 3. Evolución de publicaciones sobre EO a lo largo de los años. (Fuente: Scopus, 2009) OE: Oxidative stress (estrés oxidativo), FR: Free radicals (radicales libres).

biológicos, bajo condiciones fisiológicas o bajo la acción de una fuente exógena de estrés. Procariontes [23], organismos autótrofos y heterótrofos [24-26] incluyendo humanos [27-28], cadenas tróficas [22] y Virus [29], son algunos de modelos actualmente en estudio.

En medicina se ha demostrado la participación del estrés oxidativo en la etiología de numerosas enfermedades y paralelamente se están estudiando numerosas fuentes de antioxidantes, de aplicación fundamentalmente en medicina preventiva. También se ha comprobado la efectividad de pre-tratamientos con oxígeno hiperbárico a pacientes que deben ser transplantados, lo que les produce un aumento en las defensas antioxidantes al momento del trasplante. Durante la escisión del órgano se produce un estado de anoxia, la cual se revierte bruscamente al volver a conectar los vasos sanguíneos; este fenómeno conocido como "isquemia - reperfusión" provoca estrés oxidativo, lo que podría llegar a dañar irreversiblemente al órgano transplantado.

En el área de salud nutricional, ha aumentado la administración de dietas hipocalóricas, con un marcado consumo de verduras frescas, la mayoría de las cuales contienen varios componentes antioxidantes, favoreciendo la salud y por ende el aspecto general de la persona. Además, en el área cosmética, día a día aumenta la oferta de productos antioxidantes, fundamentalmente para el mejoramiento y protección de la piel.



La ciencia aplicada al deporte competitivo ha determinado que el balance u homeostasis del estado oxidativo, para el caso de la actividad física intensa, está íntimamente relacionado tanto con las características del ejercicio (intensidad, duración, grupos musculares involucrados, etc.) [30], como con el estado propio del atleta (fisiológico, metabólico, nutricional, psicológico, etc.) [31-32] y las condiciones externas en las cuales se realiza dicha actividad (altitud, variaciones estacionales, ambientales, etc.) [33]. Las complejas interacciones entre estos y otros factores han motivado, en las principales potencias deportivas del mundo, una gran cantidad de estudios enfocados al conocimiento y desarrollo de marcadores tempranos del estado oxidativo de los atletas de alto rendimiento, que contribuyan a protegerlos del daño molecular y celular asociado a la intensa actividad física realizada por los mismos [30, 34-35].

El estrés oxidativo representa, por lo tanto, uno de los grandes desafíos de la ciencia actual para vislumbrar la complejidad de los mecanismos que operan en el delicado equilibrio que existe entre lo beneficioso y lo perjudicial para los seres vivos. Dichos mecanismos, por ser propios de todas las formas de vida aerobia conocida, aportan evidencias sobre la evolución de la vida en nuestro planeta, así como la posibilidad de desarrollo de numerosas aplicaciones relacionadas con la salud. De este modo, los seres humanos esperamos satisfacer, al mismo tiempo, dos de los mayores motivadores de nuestras inquietudes a lo largo de la historia: La curiosidad por nuestro origen sobre la tierra y la obstinada búsqueda del “elixir” que nos permita mejorar y prolongar nuestra esperanza de vida.

Bibliografía

- [1] Parsons AF. 2000. *An introduction to free radical chemistry*. Blackwell Science Ltd., London.
- [2] Commoner B, Townsend J, Pake GE. 1954. *Free Radicals in Biological Materials*. *Nature* 174:689-691.
- [3] Gerschman R, Gilbert DL, Nye SW, Dwyer P, Fenn WO. 1954. *Oxygen Poisoning and X-Irradiation: A Mechanism in Common*. *Science* 119:623-626.
- [4] Dröge W. 2002. *Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function*. *Physiological Reviews* 82:47-95.
- [5] Mc Cord JM, Fridovich I. 1969. *Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocyte protein (hemocuprein)*. *J Biol Chem* 244:6049-6055.
- [6] Kohen R, Nyska A. 2002. *Oxidation of Biological Systems: Oxidative Stress Phenomena, Antioxidants, Redox Reactions, and Methods for Their Quantification*. *Toxicol Pathol* 30:620-650.
- [7] Sies H. 1985. *Oxidative stress: introductory remarks*. In Sies H, ed. *Oxidative stress*. Academic Press, London, p. 18.
- [8] Asada K. 1996. *Radical Production and Scavenging in the Chloroplasts*. In Baker NR, ed. *Photosynthesis and the Environment*. Kluwer Academic Publishers, pp 123-150.
- [9] Niyogi KK. 1999. *Photoprotection Revisited: Genetic and molecular approaches*. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 50:333-359.
- [10] Halliwell B. 2007. *Biochemistry of oxidative stress*. *Biochemical Society Transactions* 035:1147-1150.
- [11] Pomposiello PJ, Bennik MHJ, Demple B. 2001. *Genome-Wide Transcriptional Profiling of the Escherichia coli Responses to Superoxide Stress and Sodium Salicylate*. *J Bacteriol* 183:3890-3902.
- [12] Depledge MH. 1989. *The rational basis for detection of the early effects of marine pollutants using physiological indicators*. *Ambio* 18:301-302.
- [13] Packer L, Cadenas E. 2007. *Oxidants and antioxidants revisited*. *New concepts of oxidative stress*. *Free Radical Research* 41:951-952.
- [14] Winterbourn CC. 2008. *Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species*. *Nat Chem Biol* 4:278-286.
- [15] Adams SM. 2001. *Biomarker/bioindicator response profiles of organisms can help differentiate between sources of anthropogenic stressors in aquatic ecosystems*. *Biomarkers* 6:33-44.
- [16] Valavanidis A, Vlahogianni T, Dassenakis M, Scoullou M. 2006. *Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 64:178-189.
- [17] Di Giulio RT. 1991. *Indices of oxidative stress as biomarkers for environmental contamination*. In Mayes MA, Barron MG, eds. *Aquatic toxicology and risk assessment: Fourteenth volume*. ASTM STP, Philadelphia, pp 15-31.
- [18] Sabatini SE, Chaufan G, Juárez AB, Coalova I, Bianchid L, Eppis MR, Molina MdCRd. 2009. *Dietary copper effects in the estuarine crab, Neohelice (Chasmagnathus) granulata, maintained at two different salinities*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 150:521-527.
- [19] Rocchetta I, Mazzuca M, Conforti V, Ruiz L, Balzaretto V, Molina MdCRd. 2006. *Effect of chromium on the fatty acid composition of two strains of Euglena gracilis*. *Environmental Pollution* 141:353-358.
- [20] Sabatini SE, Juárez AB, Eppis MR, Bianchi L, Luquet CM, Ríos de Molina MC. 2009. *Oxidative stress and antioxidant defenses in two green microalgae exposed to copper*. *Ecotoxicol Environ Safety* 72:1200-1206.
- [21] Romero DM, Molina MdCRd, Juárez AB. 2011. *Oxidative stress induced by a commercial glyphosate formulation in a tolerant strain of Chlorella kessleri*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* En prensa.
- [22] Chaufan G, Juárez A, Basack S, Ithurralde E, Sabatini SE, Genovese G, Oneto ML, Kesten E, Molina MdCRd. 2006. *Toxicity of hexachlorobenzene and its transference from microalgae (Chlorella kessleri) to crabs (Chasmagnathus granulatus)*. *Toxicology* 227:262-270.
- [23] Ziegelhoffer EC, Donohue TJ. 2009. *Bacterial responses to photo-oxidative stress*. *Nat Rev Micro* 7:856-863.
- [24] Brain RA, Cedergreen N. 2009. *Biomarkers in aquatic plants: selection and utility (Review)*. *Rev Environ Contam Toxicol* 198:49-109.
- [25] Torres MA, Barros MP, Campos SCG, Pinto E, Rajamani S, Sayre RT, Colepicolo P. 2008. *Biochemical biomarkers in algae and marine pollution: A review*. *Ecotoxicol Environ Saf* 71:1-15.
- [26] Kammenga JE, Dallinger R, Donker MH, Köhler HR, Simonsen V, Triebkorn R, Weeks JM. 2000. *Biomarkers in terrestrial invertebrates for ecotoxicological soil risk assessment (review)*. *Rev Environ Contam Toxicol* 164:93-147.
- [27] Hong Y, Park M, Koh J, Oh S, Kim H, Park E, Lee K, Leem J, Ha E. 2008. *Is Oxidative Stress from Environmental Chemical Exposure Causing Insulin Resistance in Urban Population?* *Epidemiology* 19:S285.
- [28] Miller EA, Ríos de Molina MC, Domínguez G, Guerra LN. 2008. *Thyroid hormone effect in human hepatocytes*. *Redox Report* 13:185-191.
- [29] Riva DA, Ríos de Molina MC, Rocchetta I, Gerhardt E, Coulombié FC, Mersich SE. 2006. *Oxidative stress in Vero cells infected with vesicular stomatitis virus*. *Intervirology* 49:294-298.
- [30] Finaud J, Lac G, Filaire E. 2006. *Oxidative Stress: Relationship with Exercise and Training*. *Sports Medicine* 36:327-358.
- [31] Paik I-Y, Jeong M-H, Jin H-E, Kim Y-I, Suh A-R, Cho S-Y, Roh H-T, Jin C-H, Suh S-H. 2009. *Fluid replacement following dehydration reduces oxidative stress during recovery*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 383:103-107.
- [32] Venkatraman JT, Pendergast DR. 2002. *Effect of Dietary Intake on Immune Function in Athletes*. *Sports Medicine* 32:323-337.
- [33] Pialoux V, Brugniaux JV, Fellmann N, Richalet J-P, Robach P, Schmitt L, Couderc J, Mounier R. 2009. *Oxidative stress and HIF-1[alpha] modulate hypoxic ventilatory responses after hypoxic training on athletes*. *Respiratory Physiology & Neurobiology* 167:217-220.
- [34] Vollaard NBJ, Shearman JP, Cooper CE. 2005. *Exercise-Induced Oxidative Stress: Myths, Realities and Physiological Relevance*. *Sports Medicine* 35:1045-1062.
- [35] Teixeira V, Valente H, Casal S, Pereira L, Marques F, Moreira P. 2009. *Antioxidant status, oxidative stress, and damage in elite kayakers after 1 year of training and competition in 2 seasons*. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism* 34:716-724.

