

Radicales libres y mecanismos antioxidantes. Generalidades y aplicaciones en la práctica clínica

A. de la Peña Fernández y P. Redondo Bellón *

Departamento de Medicina Interna. * Departamento de Dermatología. Clínica
Universitaria de Navarra. Pamplona.

Correspondencia: A. de la Peña Fernández.
Departamento de Medicina Interna. Clínica Universitaria de Navarra.
Avda. Pío XII, s/n.
31080 Pamplona (Navarra).

INTRODUCCIÓN

Cada vez es más frecuente encontrar términos en la literatura médica y científica que hacen referencia a reacciones mediadas por radicales libres, al estrés oxidativo y a mecanismos de defensa antioxidante. Dichos fenómenos aparecen involucrados en múltiples mecanismos fisiopatológicos y clínicos, tales como procesos inflamatorios, carcinogénesis, envejecimiento, daño por isquemia-reperfusión y otros ¹. El papel lesivo que estas reacciones pueden producir de forma directa o bien como respuesta desencadenada frente a otras formas de daño biológico hace que el conocimiento de los mecanismos de estrés oxidativo y control antioxidante sea una herramienta terapéutica que el clínico debe conocer y aprender a manejar en la práctica médica diaria.

CONCEPTO DE RADICAL LIBRE, ESTRÉS OXIDATIVO Y ANTIOXIDANTES

Los radicales libres son moléculas que contienen en su orbital más externo un electrón «impar», esto es, el electrón de dicho orbital necesita de otro para poseer una configuración bioquímica y electromagnéticamente estable. Es por ello que los radicales libres tienden a reaccionar ávidamente con otras moléculas cercanas para eliminar este orbital incompleto, pero a expensas de desestabilizar la configuración electrónica de las moléculas con las que reaccionan, convirtiéndolas a su vez en especies reactivas y pudiendo desencadenar reacciones en cadena ². Los radicales o prorradicales más abundantes y reactivos en los sistemas biológicos son el oxígeno molecular (O_2) y los productos derivados de su reducción tetravalente en agua, esto es, el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y radical hidróxilo ($OH\cdot$). El peróxido de hidrógeno, al igual que otros peróxidos orgánicos como los lipoperóxidos, no son propiamente radicales libres, pues no poseen electrones desapareados, pero tienen una alta tendencia a transformarse en ellos e inducir reacciones oxidativas en cadena al aceptar fácilmente electrones procedentes de metales reducidos como el Fe^{2+} y el Cu^{+3} .

Los radicales libres y otras especies oxigenadas reactivas proceden de fuentes metabólicas endógenas o de agresiones oxidativas externas. En la tabla 1 están indicados los principales radicales libres y sus mecanismos de generación.

Dentro de las fuentes endógenas de producción de radicales libres podemos incluir las siguientes:

- 1) La cadena electrónica mitocondrial, máxime en situaciones de daño mitocondrial, en que una mayor proporción de anión superóxido escaparía al control de los citocromos ⁴.
- 2) Una excesiva actividad de la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidado (NADPH) oxidasa fagocitaria ⁵.
- 3) La activación del metabolismo del ácido araquidónico en los procesos inflamatorios ⁶.
- 4) La deslocalización de metales de transición como el Fe²⁺ y el Cu⁺ de sus lugares de depósito, proteínas transportadoras, grupos prostéticos, etc., los cuales se convierten en pivotes de óxido-reducción en cadena de peróxidos a través de las reacciones de Haber-Weiss o de Fenton catalizada por metales ⁷.
- 5) La hiperactividad de la xantina oxidasa que en la reperfusión tras situaciones de isquemia utiliza el O₂ en lugar del NAD⁺ para la oxidación citosólica de hipoxantina y xantina hasta ácido úrico con la siguiente reducción de O₂ en anión superóxido ⁸.
- 6) La activación de enzima óxido nítrico sintetasa (NOS) por acción de citocinas, endotoxinas o del aumento del calcio intracelular. El óxido nítrico (NO·) es un radical que en presencia de anión superóxido se convierte en el tóxico anión peroxinitrito (ONOO⁻) ⁹.
- 7) Una deficitaria capacidad de los mecanismos protectores antioxidantes ¹⁰.

Como fuentes exógenas de daño oxidativo podemos citar los siguientes mecanismos:

- 1) Los ataques externos por radiaciones ionizantes (rayos X, radiación ultravioleta) ¹¹.
- 2) El aumento en la disponibilidad de metales de transición como ocurre en algunas enfermedades metabólicas (hemocromatosis y enfermedad de Wilson) o en los procesos inflamatorios ⁷.
- 3) La acción de xenobióticos y fármacos con capacidad redox cycling o capacidad de generar anión superóxido por acción enzimática a través de la oxidorreducción cíclica de flavoproteínas ¹².
- 4) El exceso en la concentración de oxígeno o los procesos en que concurren fenómenos de isquemia-reperfusión, como ocurre en ciertos tipos de cirugía ¹³.

La vida media y la capacidad reactiva de los distintos radicales libres y especies oxigenadas son muy distintas entre sí. Algunos son altamente reactivos, pero con una escasa capacidad de difusión por su breve vida media, como es el caso del radical hidróxilo (HO·) y otros son más estables y pueden difundir lejos de su lugar de origen provocando daño oxidativo en un mayor radio de acción, como es el caso de los radicales peróxido. El daño de estas especies, por tanto, depende de la concentración local que puedan alcanzar, de la capacidad de difusión determinada por su vida media y

su solubilidad en el medio (liposolubilidad o hidrosolubilidad), de la capacidad reactiva de la molécula y de los mecanismos amplificadores o neutralizadores del entorno en que se produce la acción oxidativa ¹⁴ (tabla 2).

No obstante, la célula está dotada de un potente armamento defensivo compuesto de mecanismos neutralizantes (*scavengers*), formado por enzimas y compuestos moleculares y transportadores que evitan tanto la formación incontrolada y excesiva de radicales libres, como la neutralización, eliminación y bloqueo de su reactividad en cadena. De la falta de equilibrio entre los fenómenos prooxidantes y los mecanismos de defensa antioxidante en favor de los primeros se derivará lo que ha venido en llamarse «estrés oxidativo». Por otro lado, podremos considerar que una sustancia tiene capacidad antioxidante si, presente a baja concentración con respecto al sustrato oxidable, es capaz de retrasar o inhibir de forma significativa la oxidación de dicho sustrato ^{15,16}.

FISIOPATOLOGÍA DEL DAÑO BIOLÓGICO MEDIADO POR ESTRÉS OXIDATIVO

El mecanismo fisiopatológico nocivo que puede provocar el estrés oxidativo en los sistemas biológicos deriva de la capacidad que tienen los radicales libres de atacar y reaccionar con componentes moleculares de estructuras celulares como son los lípidos de membrana, las proteínas estructurales y enzimáticas, los carbohidratos y los ácidos nucleicos ¹⁷. Como se puede ver en la figura 1 todos los mecanismos, tanto bioquímicos como funcionales de daño biológico por estrés oxidativo, pueden llevar por diversas vías a la destrucción de la célula bien sea por necrosis o por apoptosis. La exposición a bajas dosis (10-100 μ M) de H₂O₂ induce apoptosis en una gran variedad de células, mientras que la exposición a dosis más altas induce necrosis, lo que sugiere que la severidad del insulto determina la forma en que la célula muere ¹⁸.

El daño por estrés oxidativo en una célula ocurre a diversos niveles que podemos simplificar de la siguiente manera (tabla 3):

Ataque sobre membranas celulares y subcelulares (mitocondrias, microsomas, etc.)

Provoca los siguientes efectos:

- 1) Deterioro de las propiedades fisicoquímicas de la membrana confiriéndole mayor rigidez y trastornos en la permeabilidad, con el riesgo sobre el control de la homeostasis iónica celular ^{19,20}.
- 2) Alteración funcional de proteínas de membrana, tanto estructurales como con función de receptor, transportadoras, enzimáticas, etc., y entre ellas, de la Ca²⁺-ATP-asa²¹, que localizada en la membrana citoplasmática y microsomal regula los niveles de Ca²⁺ en los diversos compartimentos celulares. Esto lleva a un incremento citosólico de Ca²⁺, capaz de activar diversas fosfolipasas y proteasas ²².
- 3) Puesta en marcha de las reacciones en cadena de peroxidación lipídica con la consiguiente amplificación y aumento de la difusión de los mecanismos de daño oxidativo y la generación de hidroperóxidos y otros productos tóxicos (MDA, 4-HNE, etc.) para la célula ²³.

- 4) Alteraciones en la cadena electrónica mitocondrial con inhibición en la síntesis de ATP y desacoplamiento del flujo de electrones²⁴. Se produce un incremento en el índice intracelular NADH/NAD⁺, un descenso del índice ATP/ADP y un mayor aporte de intermediarios oxigenados reactivos al medio que escapan de los complejos enzimáticos de la cadena mitocondrial y contribuyen a aumentar el daño por estrés oxidativo¹⁷.
- 5) Alteraciones en la permeabilidad mitocondrial. En condiciones normales la membrana interna mitocondrial es impermeable, permitiéndose el paso sólo a través de transportadores específicos. En situaciones de daño oxidativo se produce un aumento brusco de la permeabilidad conocida como «transición de permeabilidad de la membrana mitocondrial» (MMPT). Se inicia un colapso del gradiente iónico de la membrana mitocondrial con la consiguiente alteración funcional; se produce el vertido del contenido mitocondrial hacia el citoplasma, mientras que productos citoplasmáticos alcanzan libremente la matriz mitocondrial. La mitocondria se despolariza y se baloniza como paso previo a su destrucción y a la necrosis celular¹⁷. Se conocen dos mecanismos de MMPT²⁵:
 - a) por daño inespecífico de la membrana mitocondrial interna como consecuencia de la peroxidación lipídica o de la actividad de la fosfolipasa A₂, y
 - b) por apertura de un poro específico de la membrana interna que permite el paso a moléculas de bajo peso molecular. Se sabe que la apertura de este poro o megacanal puede ser inducida por acumulación de ácidos grasos y lisofosfolípidos, por ADP-ribosilación de proteínas de membrana mitocondrial y por aumento de los niveles de calcio en la matriz mitocondrial y puede ser inhibida por el pH ácido, por ciclosporina A y por l-carnitina²⁶, que actuarían como mecanismos cito-protectores.
- 6) Aceleración de la fibrogénesis inducida por los productos de la peroxidación lipídica²⁷.

Mecanismos de daño oxidativo sobre estructuras en el citosol

La acción de productos oxigenados y otros radicales sobre proteínas, cofactores y grupos prostéticos del citosol provoca su modificación o inactivación por mecanismos oxidativos²⁸. De esto se derivan diversos trastornos del metabolismo. Disminuye la producción de ATP por bloqueo de la glucólisis mediante la inhibición de la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa por el H₂O₂²⁹. Este déficit de ATP conduce, por un lado, a la inactivación de la bomba ATP-asa N⁺/K⁺, con la consiguiente pérdida del gradiente iónico, osmótico y eléctrico y acumulación de Ca²⁺ intracelular, y por otro, a la progresiva acidificación de la célula por generación de ácido láctico desde el metabolismo anaerobio, liberación de protones de la hidrólisis de nucleósidos de fosfato y por inhibición de la bomba Na⁺/H⁺²⁹. La acidosis celular protege contra la necrosis celular, mientras que la alcalinización favorece la muerte celular durante la depleción de ATP, y el estrés oxidativo es lo que se conoce como la paradoja del pH³⁰.

Además, el aumento de Ca²⁺ intracitosólico conduce a la activación de proteasas y de la fosfolipasa A₂, involucradas en los mecanismos de necrosis celular^{31,32}. La activación de proteasas resulta en la degradación de enzimas esenciales y componentes del citoesqueleto y en la proteólisis activadora (como es el caso de la xantina oxidasa) o inhibidora de diversas enzimas; la actividad de la fosfolipasa provoca daño en las membranas celulares. Asimismo, el incremento del Ca²⁺ altera la función mitocondrial y

conduce a una pérdida de su potencial de membrana con el consiguiente bloqueo de la actividad ATP-sintasa⁴.

El radical óxido nítrico (NO·) se puede formar por un mecanismo Ca^{2+} dependiente o por otro citocina-dependiente. Éste, en presencia de O_2^- , es capaz de formar el tóxico peroxinitrito, involucrado en la oxidación directa de grupos sulfhidrilos y la iniciación de la peroxidación lipídica sin el concurso de metales de transición³³.

Se ha visto previamente el papel amplificador que poseen ciertos metales de transición en la generación de productos oxigenados altamente reactivos como el radical hidróxilo o los radicales alcóxilo, peróxilo, etc. Estos metales suelen estar secuestrados en depósitos o proteínas transportadoras, pudiendo ser movilizados mediante diversos mecanismos. La liberación del hierro desde la ferritina está estimulada por agentes reductores como el ácido ascórbico, el glutatión (GSH) o el anión superóxido³⁴. Un pH ácido, un exceso de NADH o de NADPH o un incremento en la actividad de la xantina oxidasa favorecen la liberación de hierro desde la ferritina y la hemosiderina³⁵ facilitando su papel catalítico.

Acción sobre estructuras nucleares

El ADN está considerado como la principal diana del ataque por sustancias oxidantes *in vivo*, habiéndose calculado una media de más de 10^3 lesiones por daño oxidativo al día en el ser humano³⁶. El principal agente involucrado en el daño directo es el radical hidroxilo, capaz de provocar la escisión monocatenario o bicatenaria de la molécula de ADN. Por otra parte, el daño oxidativo subletal ha sido asociado a alteraciones de la transcripción y la expresión de genes y a interacciones entre el ARN mensajero y los ribosomas^{37,38}. Cuando el ADN sufre un insulto, como es el caso del daño por estrés oxidativo, los niveles de la proteína p53 y su actividad transcripcional incrementan dramáticamente. La p53 es una fosfoproteína nuclear que actúa como un gen supresor de tumores al ser capaz de detener el ciclo celular en G_1 ³⁹. La acumulación de p53 lleva a un bloqueo del ciclo en G_1 , lo que le permite a la célula poner en marcha su mecanismo enzimático de reparación del ADN. Si el daño es extenso e irreparable la célula sigue la vía de la apoptosis como mecanismo defensivo para protegerse de las consecuencias de una mutación sostenida⁴⁰.

Por otro lado, la proteína bcl-2, localizada en las mitocondrias y membranas microsomales y nucleares, previene el desarrollo de apoptosis en situaciones de estrés oxidativo como las radiaciones ionizantes o el déficit celular de GSH⁴¹ de formas aún no totalmente aclaradas. Se ha descrito que la bcl-2 es capaz de interactuar con la superóxido dismutasa mitocondrial⁴² y de suprimir la peroxidación lipídica⁴³, con lo que cabe especular que el efecto de la bcl-2 está involucrada en la activación de diversos mecanismos antioxidantes de la célula^{44,45} que la protegerían frente al insulto oxidativo.

El factor de transcripción nuclear κB (NF κB) es rápida y potentemente activado tras la exposición de las células al H_2O_2 . Por contra, la inducción de este factor por diversos mecanismos puede ser inhibida mediante antioxidantes como la N-acetilcisteína, un precursor del GSH⁴⁶. De aquí se sugiere que un estado de estrés oxidativo en la célula induce la activación del NF κB . El NF κB es un factor de transcripción nuclear

citoplasmático que tras su activación induce la expresión en el núcleo de un variado número de genes involucrados en la respuesta inmune e inflamatoria" (antígenos de HLA de clase I, TNF- α , IL-6, IL-1 β , el receptor para la IL-2, moléculas de adhesión como VCAM-1 y ELAM-1, etc.). Además de activar de forma directa al NF κ B citoplasmático, las especies oxigenadas reactivas inducen un incremento en la transcripción de su ARN-m⁴⁸. De ello se deduce que el estrés oxidativo a través del NF κ B contribuye al aumento de síntesis de diversas proteínas celulares como las moléculas de HLA, citocinas e incluso protooncogenes⁶ con las consecuencias que ello trae sobre los fenómenos inflamatorios, inmunológicos y carcinogénicos.

Cuando la molécula de ADN se daña uno de los sucesos que ocurre inmediatamente es la activación de la enzima nuclear poli-ADP-ribosa polimerasa cuya finalidad celular, aún no totalmente aclarada, parece estar relacionada con los mecanismos de reparación nuclear del ADN⁴⁹. Esta enzima al utilizar como sustrato los nucleótidos de nicotinamida para formar polímeros que se unen a la cadena de ADN lesionada⁵⁰ depleciona los depósitos celulares de NAD⁺ y con ello inhabilita las vías metabólicas de síntesis de ATP y la consiguiente capacidad de mantener la homeostasis del calcio intracelular⁵¹.

Durante los procesos de reparación del ADN se puede producir la incorporación de bases nitrogenadas modificadas por acción de fenómenos oxidativos. Así, el radical OH \cdot provoca la hidroxilación de la deoxiguanosina para formar 8-hidroxideoxiguanosina (8-OHdG), que es capaz de promover en la célula un efecto mutagénico y carcinogénico⁵². Por último, con el daño oxidativo sobre el núcleo se liberan metales de transición que se encuentran unidos a la molécula de ADN o que en situaciones de estrés oxidativo son capaces de unírsele rápidamente, lo que provoca una significativa amplificación del daño oxidativo¹⁶.

TERAPÉUTICA ANTIOXIDANTE

La célula posee un sofisticado y complejo sistema de mecanismos antioxidantes que le permiten defenderse de los ataques provocados por el estrés oxidativo. Este sistema es en apariencia redundante, como suele ocurrir con los sistemas de control decisivos para la viabilidad biológica de la célula y se puede agrupar en dos grandes grupos: sistemas enzimáticos y sistemas no enzimáticos. Desde el punto de vista terapéutico existen sustancias exógenas que pueden prevenir el daño oxidativo utilizando mecanismos análogos a estos sistemas antioxidantes endógenos, inhibiendo o previniendo la generación de radicales libres, potenciando la actividad enzimática antioxidante o bloqueando la amplificación del daño oxidativo⁵³ (tabla 4).

Sustancias con actividad enzimática antioxidante

La superóxido dismutasa (SOD) es el sistema enzimático encargado de promover la reducción del radical superóxido (O₂⁻ \cdot) en peróxido de hidrógeno (H₂O₂). Esta reacción se puede realizar de forma espontánea, aunque ocurre de una manera muy lenta. Si la SOD cataliza dicha reacción la velocidad se aumenta más de 10⁹ veces. Se ha utilizado SOD recombinante en la práctica clínica, pero su eficacia está limitada por la escasa

vida media (6 segundos) que presenta ⁵⁴. Se han empleado diversos métodos para obviar este problema y facilitar su difusión celular, como son su unión covalente con polietilén-glicol (PEG), prolongando su vida media hasta 40 horas o su incorporación en lisosomas, con lo que se consigue también una buena difusión celular y una vida media de 4 horas ⁵⁵. De forma experimental la SOD se ha utilizado en el tratamiento de los traumatismos craneoencefálicos severos ⁵⁶ y en la enfermedad de Crohn ⁵⁷, y tópicamente en la fibrosis inducida por radioterapia ⁵⁸.

Existen diversas sustancias que, sin presentar actividad enzimática, pueden realizar la misma función que la SOD. El ácido diisopropilsalicílico de cobre (Cu-DIPS) es lipofílico, puede atravesar membranas y actuar intracelularmente neutralizando aniones superóxido ⁵⁹. El desferal-Mn, un complejo formado por desferroxiamina y manganeso, puede actuar de la misma manera, aunque el manganeso intracelular puede resultar tóxico ⁶⁰.

La catalasa, enzima encargada de la eliminación intracelular de H₂O₂, se puede utilizar de forma análoga a la SOD conjugada con PEG o incorporada en lisosomas, lo que mejora su biodisponibilidad y vida media ⁵⁶. Recientemente se ha utilizado la aplicación tópica de un gel de pseudocatalasa, asociado a cloruro cálcico y luz ultravioleta (UV) en el tratamiento del vitiligo, con unos resultados muy satisfactorios ⁶¹.

El oltipraz es una molécula sintética de ditiol-tiona con efectos anticancerígenos que parece actuar mediante la inducción de las isoenzimas de la glutatión-S-transferasa con capacidad de neutralizar lipoperóxidos ⁶². Algunos vegetales como las coles de Bruselas, el repollo, etc., son ricos en ditiol-tionas. Previamente el oltipraz se ha utilizado con éxito en el tratamiento de la esquistomiasis a dosis de 1-4,5 g/día durante 1-3 días ⁶³. Hasta la fecha, el oltipraz ha sido un inhibidor efectivo de la carcinogénesis en modelos experimentales de cáncer de mama, vejiga, hígado, estómago, colon y piel. Además de no ser mutagénico, el oltipraz es eficaz como radioprotector y resulta útil en la intoxicación por paracetamol. Recientemente se han iniciado protocolos de prevención en pacientes con poliposis colónica o neoplasias incipientes de mama a dosis de 125-250 mg/día ⁶⁴.

El ebselen es un compuesto selenoorgánico de escasa toxicidad que posee una actividad análoga a la de la enzima GSH-peroxidasa ⁶⁵. Asimismo, posee propiedades antiinflamatorias, antiarterioescleróticas y citoprotectoras. En un modelo experimental de artritis reumatoide la administración de 100 mg/kg/día de ebselen resultó más eficaz que 2 mg/kg/día de indometacina ⁶⁶; posiblemente el ebselen actúe inhibiendo la migración transendotelial de los leucocitos polimorfonucleares neutrófilos y la actividad enzimática de la NADPH-oxidasa, la lipooxigenasa y la óxido nítrico sintetasa ⁶⁷.

Inhibidores de los sistemas enzimáticos prooxidantes

Inhibidores de la xantina-oxidasa

Tanto el alopurinol como su metabolito activo, el oxipurinol, son análogos estructurales de la hipoxantina, que bloquean de forma competitiva la acción de la enzima xantina oxidasa/deshidrogenasa en el catabolismo de los derivados purínicos hasta ácido úrico. El alopurinol, a dosis de 300-900 mg/día, es el tratamiento de elección de las

hiperuricemias crónicas. El alopurinol reduce la formación de radicales libres, por lo que puede utilizarse en aquellos procesos que cursan con un desequilibrio entre la producción y la neutralización o *scavenging* de estos elementos. Específicamente, el alopurinol a dosis de 10 mg/kg/día resulta eficaz en el tratamiento del síndrome de distrés respiratorio de monos prematuros⁶⁸. Asimismo, reduce el daño por reperfusión (aumento de la permeabilidad vascular, edema y posible necrosis tisular) en el músculo esquelético⁶⁹. La asociación de alopurinol a 5-FU en procesos oncológicos resulta útil al disminuir la toxicidad de este último sin afectar su eficacia terapéutica⁷⁰. El alopurinol también se ha utilizado mediante enjuagues en las estomatitis inducidas por metotrexate⁷¹ o 5-FU⁷² y en el tratamiento de la herpangina⁷³. Por último, se ha demostrado la eficacia de este fármaco en el tratamiento y prevención del sangrado gástrico secundario a la ingesta de antiinflamatorios no esteroideos (AINE) a dosis de 50 mg cuatro veces al día⁷⁴.

El ácido fólico y el compuesto pterin-aldehído también inhiben de forma competitiva la actividad de la enzima. El tungsteno impide la correcta incorporación de la molécula de molibdeno en el núcleo activo de la xantina oxidasa, favoreciendo la producción de enzima inactiva⁷⁵.

Inhibidores de la NADPH-oxidasa

Los anestésicos locales⁷⁶, los bloqueadores de los canales del calcio⁷⁷ o los antiinflamatorios no esteroideos⁷⁸ pueden interferir de forma inespecífica con la función de NADPH-oxidasa. El ioduro de difenilene —un agente lipofílico que reduce la formación de radicales libres— inhibe específicamente la NADPH-oxidasa al unirse al componente flavoproteico de la oxidasa⁷⁹. La adenosina puede modular la generación de anión superóxido actuando sobre un receptor A₂ del neutrófilo⁸⁰. Por último, la actividad de la NADPH-oxidasa puede ser bloqueada en un 90% mediante un anticuerpo monoclonal específico⁸¹.

Minerales antioxidantes

El cobre, manganeso, zinc, hierro y selenio son cofactores necesarios para el buen funcionamiento de enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa, la catalasa y la glutatión peroxidasa¹⁵. El zinc, además de ser cofactor de esas enzimas, presenta acciones inmunomoduladoras, favoreciendo la producción de anticuerpos por linfocitos B y la actividad de las células natural killer (NK). Tanto el cobre como el zinc están comercializados en asociación a otros complejos vitamínicos.

El selenio es necesario para el funcionamiento de la glutatión peroxidasa dependiente de selenio y otras dos selenoenzimas que protegen frente al estrés oxidativo: la fosfolípido hidroperóxido glutatión peroxidasa y la selenoproteína P^{82, 83}. Este oligoelemento es indispensable para la vida humana y se requiere un aporte diario de 50-200 µg/día o al menos 1µg por kg de peso corporal. Una disminución grave de los niveles de selenio produce cardiopatía (enfermedad de Keshan), incrementa la incidencia de diversos tipos de cáncer y puede producir degeneración necrótica hepática por incapacidad para neutralizar la peroxidación lipídica^{84, 85}.

Precusores de GSH

El GSH es el tiol intracelular más prevalente, y entre sus múltiples funciones se encuentra la de poseer una actividad antioxidante intracelular decisiva; se ha descrito que las células «deprivadas» de glutatión típicamente sufren un severo daño oxidativo asociado a degeneración mitocondrial ⁸⁶. Dado que el GSH no puede ser asimilado directamente por las células humanas, la administración de ésteres de glutatión o de precursores de su síntesis constituyen alternativas eficaces para aumentar los niveles intracelulares de glutatión ⁸⁷.

N-acetilcisteína

La N-acetilcisteína (NAC) es un fármaco bien tolerado que reacciona con los reactivos intermediarios el oxígeno e incrementa los niveles intracelulares de glutatión ⁸⁷. La NAC inhibe la acción del NFκB, probablemente gracias al mantenimiento del potencial redox dentro de la célula ⁸⁸. El NFκB puede ser inducido por diversos radicales libres, como el peróxido de hidrógeno y algunas citocinas: TNF-α e IL-1. El NFκB a su vez induce la transcripción de múltiples genes proinflamatorios, como ya hemos comentado. La NAC y el GSH inhiben la síntesis de TNF-α en ratas diabéticas ⁸⁹ y también previenen el daño pulmonar mediado por TNF-α en ratones estimulados con LPS ^{90,91}. Recientemente hemos comprobado in vitro sobre linfocitos de sangre periférica que la NAC inhibe la producción de TNF-α e IL-1β tras el estímulo con LPS ⁹²; por el contrario, no se observa ningún efecto sobre la IL-6 e IL-8. La NAC a dosis elevadas administradas por vía parenteral se considera el tratamiento de elección para neutralizar el estrés oxidativo inducido por la intoxicación con paracetamol ⁹³. Este derivado de la cisteína ha sido utilizado clásicamente en los últimos 20 años con expectorante en múltiples procesos pulmonares. Las dosis terapéuticas alcanzadas en modelos experimentales in vitro pueden ser administradas in vivo, siendo bien toleradas ⁹⁴. Dada su escasa toxicidad este fármaco podría utilizarse en múltiples procesos inflamatorios secundarios a daño tisular, y en otras patologías donde el estrés oxidativo y la formación de radicales libres desempeñan un papel importante. Así, la NAC sola o en combinación con otros fármacos inmunosupresores podría constituir un agente terapéutico de primera línea en aquellas enfermedades inflamatorias en las que las citocinas TNF-α e IL-1β ejercen un papel esencial. Entre estas enfermedades podrían incluirse esencialmente el síndrome del distrés respiratorio, el shock séptico, la malaria cerebral, el lupus eritematoso sistémico, la artritis reumatoide, la esclerosis múltiple, la enfermedad inflamatoria intestinal y los estados caquéticos asociados a procesos oncológicos. Por su acción para detoxificar metabolitos reactivos derivados del metabolismo de sulfonamidas y antiepilépticos y al mismo tiempo modular la reacción inflamatoria hemos postulado la utilización de la NAC en reacciones adversas graves a fármacos, como la necrólisis epidérmica tóxica y el síndrome de hipersensibilidad ⁹⁵.

También se han descrito otros efectos antiinflamatorios de la NAC, antagonizando el desarrollo de acciones irritativas cutáneas y de hipersensibilidad de contacto ⁹⁶, así como modulando la expresión de ICAM-1 por los queratinocitos ⁹⁷.

Recientemente, se ha comprobado el efecto inhibitor de la NAC sobre la apoptosis celular, concretamente sobre neuronas in vitro, por lo que este fármaco puede ser útil en la prevención de enfermedades neurológicas degenerativas ⁹⁸. También la NAC inhibe

la mutagenicidad inducida por diversos compuestos químicos, disminuyendo de forma significativa la incidencia de lesiones neoplásicas o preneoplásicas (pulmón, hígado, colon, mama, etc.) en roedores tras la utilización de carcinógenos químicos⁹⁹.

Otros

En la clínica habitual también se utilizan otros precursores del GSH como la S-adenosilmetionina en el tratamiento y prevención de hepatopatías e intoxicación por fármacos¹⁰⁰. En la actualidad este medicamento sólo es disponible por vía parenteral a dosis de 100-800 mg/día. Teóricamente la mayor parte de sus indicaciones deberían ser superponibles a las de la NAC, aunque posee un adicional efecto beneficioso sobre las membranas celulares al participar también en reacciones de transmetilación¹⁰¹. El ácido L-2-oxotiazolidin-4-carboxílico (OTC) es otro precursor del glutatión que ha sido utilizado en experimentación animal y humana con finalidad antioxidante¹⁰². Asimismo, de forma experimental, se han utilizado los monoésteres de glutatión que pueden penetrar directamente en la célula, siendo hidrolizado el GSH en su interior⁸⁷.

Vitaminas

Vitamina E (α-tocoferol)

La vitamina E es una vitamina liposoluble esencial que incluye ocho formas o esteroisómeros, siendo el más conocido el α-tocoferol. Se localiza preferentemente en las membranas celulares, donde funciona como protector frente al daño producido por radicales libres. De hecho, la vitamina E es el único antioxidante natural liposoluble que puede inhibir la peroxidación lipídica en las membranas celulares, constituyendo sin lugar a dudas el antioxidante lipofílico más importante¹⁰². Se encuentra principalmente en vegetales, semillas de soja y trigo, nueces, etc., siendo la dosis diaria recomendada entre 8-10 mg. Los requerimientos aumentan con una ingesta elevada de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA); así, pacientes que se alimentan esencialmente de pescado y derivados incrementan los peróxidos lipídicos y requieren un mayor suplemento de vitamina E para mantener una respuesta inmune adecuada¹⁰³. Su toxicidad es escasa y no se han observado efectos secundarios con dosis de hasta 3.200 mg/día. El déficit severo de α-tocoferol es raro, pudiendo ocurrir en recién nacidos prematuros, pacientes con colestasis crónica, en la abetalipoproteinemia y en los síndromes de malabsorción de grasas¹⁰⁴. Este déficit puede provocar esterilidad, hemólisis y anemia, degeneración neurológica y muscular y necrosis hepática, como efectos más reseñables. Por su acción antioxidante la vitamina E parece desempeñar un papel protector en el daño por radicales libres asociado a cáncer, enfermedad cardiovascular y en el envejecimiento prematuro. También en otras muchas enfermedades como la diabetes tipo II, el asma y los trastornos inflamatorios de vías aéreas se aprecia un incremento de la oxidación lipídica sobre el que podría actuar esta vitamina¹⁰⁵. Concretamente, la vitamina E protege del estrés oxidativo de células en cultivo; inhibe la oxidación de glóbulos rojos, reduciendo claramente la hemólisis que se produce tras el uso de sulfonas; previene el daño muscular secundario al ejercicio físico y evita en parte la fotoperoxidación lipídica del cristalino, retrasando de esta manera la aparición de cataratas¹⁰⁶. También la oxidación de lipoproteínas de baja densidad (LDL), que favorece el desarrollo de arterioesclerosis, es inhibida por el α-tocoferol por un mecanismo de acción

desconocido. Recientes datos epidemiológicos indican que dosis elevadas de vitamina E (1.000 UI/día) reducen el riesgo de enfermedad cardiovascular ¹⁰⁷, aunque los datos son controvertidos ¹⁰⁸. De hecho, la asociación de 400 UI/día de vitamina E a 325 mg/día de aspirina es más eficaz que ésta sola en la prevención de la enfermedad isquémica vascular cerebral ¹⁰⁹. Asimismo, el α -tocoferol inhibe la claudicación intermitente y el daño por isquemia-reperusión que se origina en la cirugía cardíaca extra-corpórea; un suplemento, previo a la cirugía, de α -tocoferol ejerce un factor protector atenuando el daño peroxidativo.

Diversos experimentos y estudios epidemiológicos sugieren que la vitamina E puede reducir el riesgo de cáncer. Esta vitamina inhibe la mutagénesis y transformación celular, principalmente a través de su acción antioxidante, eliminando radicales libres de oxígeno y disminuyendo el daño sobre el ADN. Algunos estudios randomizados demuestran una disminución en la incidencia de tumores de estómago y esófago con la presencia de niveles elevados de α -tocoferol ¹¹¹. En cambio, otros trabajos no asocian la suplementación de vitamina E y otros antioxidantes (beta carotenos, vitamina C) con una menor incidencia de cáncer de colon o de cáncer de pulmón en pacientes fumadores ^{112, 113}. Se necesitan estudios más extensos respecto al número de pacientes y al tiempo, así como dosis más altas de vitamina E para valorar su posible acción terapéutica en la profilaxis oncológica.

Vitamina C (ácido ascórbico)

El ácido ascórbico o vitamina C (C₆-H₈-O₈) es una querolactona, estructuralmente similar a la glucosa. La vitamina C está presente fundamentalmente en frutas frescas (cítricos, tomates y pimientos verdes), patatas y vegetales, aunque también se encuentra en algunos derivados animales como la leche. Algunas frutas como las bayas (300 mg/100 g) o las uvas pasas (150-230 mg/100 g) son particularmente ricas en ácido ascórbico. Los requerimientos diarios de ácido ascórbico oscilan entre 60-100 mg. Entre sus funciones, la vitamina C actúa como cofactor de múltiples enzimas implicadas en la síntesis de carnitina, catecolaminas, oxitocina y hormona antidiurética; posee una acción antihistamínica y estimula la síntesis de colágeno, proteoglicanos y otros constituyentes orgánicos de la matriz intercelular, favoreciendo la cicatrización de heridas ¹¹⁴. Asimismo, el ácido ascórbico es considerado un potente antioxidante, reaccionando rápidamente con radicales superóxido, peróxido, hidróxilo y tilíco; también actúa como *scavenger* del oxígeno «singlete» y se combina con el ácido hipocloroso, eliminando rápidamente este oxidante que se produce en los procesos inflamatorios. Esta unión a radicales libres es especialmente importante en los ojos y en el fluido extracelular pulmonar, donde protege frente a agentes oxidantes como el ozono ¹¹⁵. Es clásico el papel inmunomodulador del ácido ascórbico, aumentando la movilidad leucocitaria y protegiendo su membrana del estrés oxidativo ¹¹⁶. Recientemente se ha demostrado la efectividad de la vitamina C en el tratamiento de abscesos cutáneos de repetición refractarios a otras terapias ¹¹⁷.

Su posible acción antitumoral, al igual que la de la vitamina E, es controvertida. Objetivamente por sus propiedades antioxidantes, mejorar la función inmune, bloquear la formación de nitrosaminas y por aumentar el aclaramiento hepático de toxinas vía el sistema enzimático citocromo P-450, la vitamina C debería ejercer un efecto protector antitumoral. Esta acción parece más clara en el carcinoma oral, esofágico, gástrico y

colorrectal, y quizá también en el pulmonar. Por el contrario, la vitamina C no ha demostrado ser eficaz en la prevención del carcinoma de mama ¹¹⁸.

Aunque se ha comprobado una mayor incidencia de arterioesclerosis en cerdos con déficit de vitamina C, su papel en la prevención y desarrollo de la enfermedad cardiovascular en humanos no es claro ¹¹⁹. Por el contrario, estudios *in vitro* demuestran que el ácido ascórbico previene la opacidad del cristalino al inhibir la fotoperoxidación lipídica, existiendo una relación inversa entre los niveles séricos de vitamina C y la aparición de cataratas ¹²⁰.

Respecto al envejecimiento cutáneo, hoy día se acepta que el oxígeno activado y los radicales libres están directamente implicados en la lesión cutánea inducida por la exposición solar. Estudios en animales demuestran que tras la exposición aguda a radiación UV hay una disminución inmediata de la capacidad antioxidante enzimática y no enzimática de la epidermis. Los antioxidantes lipofílicos e hidrofílicos (vitamina C) se encuentran en la epidermis a una concentración superior a la de la dermis. Bisset et al demostraron en ratones que la aplicación de ácido ascórbico previa a la exposición crónica a la luz UV reducía los cambios visibles (arrugamiento cutáneo), histológicos (alteración del colágeno dérmico), así como la formación de tumores cutáneos ¹²¹. Es posible que la radiación UV, mediante la depleción cutánea de ácido ascórbico, facilite el aumento de radicales libres oxigenados que, actuando sobre las membranas lipídicas, favorecen el fotoenvejecimiento y el desarrollo de neoplasias cutáneas.

La vitamina C interviene en el reciclaje de la vitamina E, reduciendo el radical α -tocoferóxilo y transformándolo de nuevo en α -tocoferol, acción demostrada *in vitro*, pero no confirmada *in vivo* ¹²². Es posible que de no existir el ácido ascórbico, el α -tocoferóxilo se transforme en α -tocoferil-quinona de forma irreversible, no pudiendo recuperarse la molécula original, aunque seguramente existen otros mecanismos de regeneración del α -tocoferol ¹⁵.

Carotenoides

Los carotenoides (precursores de la vitamina A derivados de las plantas) constituyen pigmentos liposolubles que originan el color amarillo-naranja de muchas frutas y vegetales. Existen más de 600 tipos diferentes, aunque sólo a unos 50 se les ha demostrado actividad biológica propia de la vitamina A, siendo los más conocidos y abundantes los beta-carotenos. Los animales —incluyendo los seres humanos— no son capaces de sintetizar de *novo* beta-carotenos, siendo su fuente principal los vegetales (patatas, zanahorias) y frutas, leche y derivados, peces y crustáceos ¹⁵.

Aunque la vitamina A no es considerada una sustancia antioxidante, los carotenoides sí actúan como tal, inhibiendo fundamentalmente la peroxidación lipídica en condiciones de baja concentración de oxígeno. Es posible que esta acción consista esencialmente en transformar el radical α -tocoferóxilo en α -tocoferol, regenerando de esta manera el potencial antioxidante de esta vitamina ¹²³. A concentraciones normales de oxígeno son menos eficaces y complementan la acción de otras moléculas antioxidantes como la catalasa, la glutatión peroxidasa y las vitaminas E y C. Los carotenoides inhiben la mutagénesis y la transformación celular *in vitro* y mejoran la respuesta inmune. Al contrario que las vitaminas E y C, los carotenoides influyen escasamente en la

prevención de la enfermedad cardiovascular. Respecto a su posible acción antitumoral, existen más de 50 trabajos epidemiológicos en los que se demuestra una menor incidencia de cáncer de pulmón, displasia cervical, cáncer de estómago y esófago en pacientes cuya dieta fue suplementada con carotenoides. Aunque en cualquier caso hay que ser cautos, pues un artículo más reciente demuestra lo contrario respecto al cáncer de pulmón ¹²⁴.

Los beta-carotenos protegen a las plantas de la oxidación causada por la fotosíntesis. Las bacterias que no sintetizan beta-carotenos son destruidas por foto-oxidación cuando se exponen a la luz UV. Especialmente se ha estudiado la aplicación clínica de los carotenoides en pacientes con reacciones de fotosensibilidad y en la prevención de carcinogénesis secundaria a radiación UV. Estas sustancias son útiles en pacientes con patologías que presentan una mayor sensibilidad a la luz UV, como son: la protoporfiria eritropoyética, la porfiria cutánea tarda, la erupción solar polimorfa, el reticuloide actínico, la urticaria solar y el hidroa estival ¹²⁵. En muchos de estos casos con una dosis de 150-200 mg/día de beta-carotenos se obtiene una importante mejoría sintomática con excelente tolerancia.

Flavonoides

Los efectos beneficiosos de frutas y vegetales, tradicionalmente atribuidos al ácido ascórbico y a los carotenoides, en parte son debidos a los flavonoides y otros polifenoles derivados de plantas. La ingesta diaria de estos compuestos, de los que se conocen más de 4.000 especies, es significativa, pudiendo ser de aproximadamente 1 g/día en una dieta mediterránea convencional. A los flavonoides se les atribuye actividad antiinflamatoria, antimicrobiana, antihelmíntica, antivírica, antihormonal, hepatoprotectora, antitrombótica y antineoplásica. Son capaces de modificar la actividad de múltiples sistemas enzimáticos, entre los que se incluyen proteín-cinasa C, proteín-tirosín-cinasa, aldolasa reductasa, mieloperoxidasa, NADPH-oxidasa, xantina oxidasa, fosfolipasa A2, fosfolipasa C, transcriptasa reversa, ornitín decarboxilasa, fosfodiesterasa, lipoxigenasa, cicloxigenasa, epóxido hidrolasa y glutatión-S-transferasa, entre otras ¹²⁶.

Los flavonoides poseen una gran acción antioxidante, aunque directamente no está claro si inhiben la formación de radicales libres o los eliminan una vez formados, como, por ejemplo, ocurre con el radical hidróxilo. Protegen las LDL de la lipoperoxidación, reduciendo de esta manera su aterogenicidad, e influyen positivamente sobre aquellas enfermedades en las que en su patogenia están envueltos productos de la peroxidación lipídica. Indirectamente favorecen la acción del ácido ascórbico (aumentan la absorción, favorecen su estabilización y reducen el paso de dehidroascorbato a ascorbato) y mantienen la acción del α -tocoferol sobre las membranas celulares. También forman complejos con metales, que de esta manera son eliminados o permanecen inactivos. A su vez, la vitamina C mantiene la actividad biológica de los flavonoides ¹²⁷.

Los flavonoides protegen frente a la enfermedad hepática, alteraciones vasculares y enfermedad cardíaca. Estos componentes de la dieta previenen la arterioesclerosis no sólo inhibiendo la oxidación de las LDL, sino también aumentando la resistencia celular a los efectos negativos de las LDL oxidadas. Un estudio reciente demuestra que una disminución en la ingesta de flavonoides aumenta la incidencia de enfermedad

cardíaca ¹²⁸. Algunos flavonoides, como la quercetina y componentes fenólicos del vino tinto son altamente eficaces al prevenir la oxidación de las LDL ¹²⁹. Por otra parte, se ha demostrado la eficacia de estas sustancias en la prevención del cáncer en animales de experimentación. Es posible que sus efectos sobre distintos sistemas enzimáticos influyan sobre la activación metabólica de carcinógenos químicos, inhibiendo la promoción tumoral ¹³⁰.

En concreto, la silimarina, un 3-OH flavonoide derivado de *Silybum marianum*, protege las mitocondrias del hígado de rata de la lipoperoxidación inducida por Fe^{2+} , ascorbato y NADPH-Fe^{3+} ¹³¹. Su acción antiperoxidativa es 10 veces mayor que la del β -tocoferol. Otra de sus acciones reconocidas estriban en un incremento de la expresión y actividad de la SOD ¹³². La silimarina previene de la depleción hepática de GSH y de la peroxidación lipídica inducida por una intoxicación alcohólica aguda en ratas ¹³³. Asimismo, protege de la peroxidación lipídica y de la hemólisis inducida en eritrocitos de rata cuando son incubados con fenilhidracina ¹³⁴. Administrada tópicamente en animales de experimentación reduce la carcinogénesis epidérmica inducida por promotores tumorales, como el TPA o radicales libres ¹³⁵. La silimarina presenta efectos hepato-protectores frente a la intoxicación por amanita faloides ¹³⁶ y se ha utilizado ampliamente en Europa en el tratamiento de la enfermedad alcohólica hepática y enfermedades asociadas con un aumento de la permeabilidad vascular y fragilidad capilar. Otros preparados comercializados conteniendo flavonoides extraídos de aurantiáceas, flavodato disódico o extracto de *Lespedeza capitata* podrían tener aplicaciones clínicas similares.

Otros

Otros scavengers no enzimáticos

El manitol y el dimetilsulfóxido son capaces de neutralizar radicales $\text{OH}\cdot$. Los lazaroides o 21-aminoesteroides (U-74389G, comercialmente no disponibles) son unos compuestos esteroideos sintéticos carentes de actividad mineral o glucocorticoide, capaces de eliminar radicales superóxido y lipoperóxidos y de inhibir la liberación del ácido araquidónico, esencial para la posterior síntesis de endoperóxidos cíclicos ¹³⁷. Experimentalmente se han utilizado en ratas, donde disminuyen la inflamación en un modelo de meningitis neumocócica ¹³⁸ y en otro de enfermedad inflamatoria intestinal ¹³⁹.

Quelantes del hierro

Los quelantes de metales de transición, como la deferoxamina, funcionan como antioxidantes al evitar la formación de radicales hidróxilo altamente reactivos generados mediante las reacciones de Haber-Weiss o Fenton. El uso de quelantes del hierro ha demostrado su eficacia en el daño por reperfusión del corazón y el riñón isquémicos, disminuye la toxicidad hepática mediada por H_2O_2 , puede beneficiar la evolución de ciertas enfermedades neurológicas degenerativas, disminuye la hepatotoxicidad por CCl_4 , etc. ¹⁴⁰ No obstante, aún se necesitan estudios clínicos controlados a doble ciego para confirmar estos hallazgos ¹⁴¹.

Otros inhibidores de la lipoperoxidación

El probucol es un fármaco útil en las hiperlipidemias al disminuir los niveles de LDL y HDL colesterol y triglicéridos. Posee una acción antioxidante, demostrada in vitro como un poderoso *scavenger* de superóxidos¹⁴², que inhibe o retrasa la aparición de arterioesclerosis, posiblemente debido a la reducción del nivel sérico de peróxidos lipídicos¹⁴³. Clínicamente se ha utilizado en la prevención de la cardiopatía inducida por adriamicina, sin disminuir la efectividad quimioterápica de este fármaco¹⁴⁴. La dosis habitual es de 500 mg dos veces al día, pudiendo aparecer como efecto secundario de forma esporádica un incremento del intervalo QT que, sobre todo, debe ser controlado en mujeres, pacientes con hipoalbuminemia o enfermedad cardíaca previa¹⁴⁵.

CONCLUSIÓN

Los antioxidantes son fármacos bien conocidos, generalmente con escasa toxicidad, que durante muchos años han venido utilizándose con unas indicaciones poco concretas. Últimamente se han ido conociendo efectos beneficiosos de interesante trascendencia. Muchos de estos fármacos son eficaces en la prevención tumoral y de la enfermedad cardiovascular, en el tratamiento y profilaxis del síndrome de isquemia-reperfusión y en la prevención del fotoenvejecimiento. También la acción antiinflamatoria de algunos antioxidantes, junto al papel que ejercen regulando la inmunidad celular y humoral, incrementa sus aplicaciones clínicas al menos desde un punto de vista teórico. El futuro terapéutico de estos fármacos resulta prometedor, no sólo cuando se administren aisladamente, sino también usándolos como coadyuvantes de otros fármacos específicos. En cualquier caso es preciso mantener un rigor científico y esperar los resultados de amplios estudios randomizados que confirmen estos hallazgos y permitan la aplicación clínica, aislada o combinada, con una mayor eficacia y seguridad.

BIBLIOGRAFÍA

1. Halliwell B, Gutteridge JMC. Free radical in biology and medicine. Oxford: Clarendon Press, 1989.
2. Whitten KW, Gailey KD. Química general (1.ª ed). México DF: Nueva Editorial Interamericana, 1985.
3. Pryor WA. Oxy-radicals and related species: their formation, lifetimes and reactions. *Annu Rev Physiol* 1986; 48:657-667.
4. Kass GEN, Bellomo G, Juedes MJ, Orrenius S. Toxic effects of calcium on mitochondria. *Methods Toxicol* 1993; 2:278-288.
5. Gabig TG, Babior BM. The O₂(-) forming oxidase responsible for the respiratory burst in human neutrophils. Properties of the solubilized enzyme. *J Biol Chem* 1979; 254:9.070-9.074.
6. Winyard PG, Morris CJ, Winrow VR, Zaidi M, Blake D. Free radical pathways in the inflammatory response. En: Rice-Evans CA, Burdon RH, eds. Free radical damage and its control. Amsterdam: Elsevier Science BV, 1994; 361-383.

7. Halliwell B, Gutteridge JMC. Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. *Arch Biochem Biophys* 1986; 246:501-514.
8. Chambers DE, Parks DA, Patterson G, et al. Xantine-oxidase as a source of free radical damage in myocardial ischemia. *J Mol Cell Cardiol* 1985; 17:145-152.
9. Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87:1.620-1.624.
10. Hyslop PA, Hinshaw DB, Halsey WA, et al. Mechanisms of oxidant-mediated cell injury. *J Biol Chem* 1988; 263:1.665-1.675.
11. Fridovich I. Superoxide radical: an endogenous toxicant. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 1983; 23:239-257.
12. Trush MA, Mimnaugh EG, Gram TE. Activation of pharmacologic agents to radical intermediates. Implications for the role of free radicals in drug action and toxicity. *Biochem Pharmac* 1982; 31:3.335.
13. Roy RS, McCord JM. Superoxide and ischemia: conversion of XD to XO. En: Greenwald R, Cohen G, eds. *Oxy radical and their scavenger systems (vol 2). Cellular and molecular aspects*. New York: Elsevier Science, 1983; 145-153.
14. Pryor WA. Oxy-radicals and related species: their formation, lifetimes and reactions. *Annu Rev Physiol* 1986; 48:657-667.
15. Diplock AT. Antioxidants and free radical scavengers. En: Rice-Evans CA, Burdon RH, eds. *Free radical damage and its control*. Amsterdam: Elsevier Science BV, 1994; 113-130.
16. Halliwell B. Oxidants and human disease: some new concepts. *FASEB J* 1987; 1:358-364.
17. Rosser BG, Gores GJ. Liver cell necrosis: cellular mechanisms and clinical implications. *Gastroenterology* 1995; 108:252-275.
18. Lennon SV, Martin SJ, Cotter TG. Dose-dependent induction of apoptosis in human tumour cells lines by widely diverging stimules. *Cell Prolif* 1991; 24:203-214.
19. Dobretsov GE, Borschevskaya TA, Petrov VA, Vladimirov YA. The increase of phospholipid bilayer rigidity alter lipid peroxidation. *FEBS Lett* 1977; 84:125-128.
20. Coolbear KP, Keough KM. Lipid oxidation and gel to liquid-crystalline transition temperatures of synthetic polyunsaturated mixed-acid phosphatidylcholines. *Biochem Biophys Acta* 1983; 732:531-540.
21. Jones DP, Thor H, Smith MT, et al. Inhibition of ATP-dependent microsomal Ca^{2+} sequestration during oxidative stress and its prevention by glutathione. *J Biol Chem* 1983; 258:6.390-6.393.
22. Bellomo G, Orenius S. Altered thiol and calcium homeostasis in oxidative hepatocellular injury. *Hepatology* 1985; 5:876-882.
23. Tribble DL, Aw TY, Jones DP. The pathophysiological significance of lipid peroxidation in oxidative cell injury. *Hepatology* 1987; 7:377-387.
24. Aw TY, Andersson BS, Jones DP. Suppression of mitochondrial respiratory function after short term anoxia. *Am J Physiol* 1987; 252:C362-C368.
25. Bernardi P, Vasanelli S, Veronese P, Colonna R, Szabo I, Zoratti M. Modulation of the mitochondrial permeability transition pore. *J Biol Chem* 1992; 267:2.934-2.939.

26. Pastorino JG, Snyder JW, Serroni A, Hoek JB, Farber JL. Cyclosporine and carnitine prevent anoxic death of cultured hepatocytes by inhibiting the mitochondrial permeability transition. *J Biol Chem* 1993; 268:7917-98.
27. Houglum K, Breener DA, Chojkier M. D-alpha tocopherol inhibits collagen alpha 1 gene expression in cultured human fibroblasts. Modulation of constitutive collagen gene expression by lipid peroxidation. *J Clin Invest* 1991; 87:2.230-2.235.
28. Hyslop PA, Hinshaw DB, Halsey W, et al. Mechanisms of oxidant mediated cell injury: the glycolytic and mitochondrial pathways of ADP phosphorylation are major intracellular targets inactivated by hydrogen peroxide. *J Biol Chem* 1988; 263:1.665.
29. Herman B, Gores GJ, Nieminen AI, Kawanishi T, Herman A, Lemasters JJ. Calcium and pH in anoxic and toxic injury. *Crit Rev Toxicol* 1990; 21: 217-248.
30. Bronk SF, Gores GJ. Acidosis protects against lethal oxidative injury of liver sinusoidal endothelial cells. *Hepatology* 1991; 14:150-157.
31. Chakraborti S, Gurtner GH, Michael JR. Oxidant mediated activation of phospholipase A₂ in pulmonary epithelium. *Am J Physiol* 1989; 257:L430-L437.
32. Liao D, Gurtner GH. Calcium dependence of the serine proteases involved in oxidant activation of phospholipases A₂. *FASEB J* 1993; 7:A346.
33. Radi R, Beckman JS, Bush KM, Freeman B. Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *Arch Biochem Biophys* 1991; 288:481-487.
34. Biernond P, Swaak AJG, Van Eijk HG, Koster JF. Superoxide dependent iron release from ferritin in inflammatory diseases. *Free Radic Biol Med* 1988; 4:185-198.
35. Tophem T, Goger M, Pearce E, Schultz P. The mobilization of ferritin iron by liver cytosol. *Biochem J* 1989; 261:137-143.
36. Ames BN, Gold LS, Willett WC. The causes and prevention of cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92:5.258-5.265.
37. DeForge LE, Preston AM, Takeuchi E, Kenney J, Boxer LA, Remick DG. Regulation of interleukin 8 gene expression by oxidant stress. *J Biol Chem* 1993; 268:25.568-25.576.
38. Houglum D, Breener DA, Chojkier M. D-alpha tocopherol inhibits collagen alpha 1(I) gene expression in cultured human fibroblasts. Modulation of constitutive collagen gene expression by lipid peroxidation. *J Clin Invest* 1991; 87:2.230-2.235.
39. Levine A, Momand J, Finlay C. The p53 tumour suppressor gene. *Nature* 1991; 351:453-456.
40. Lane D. p53, guardian of the genome. *Nature* 1992; 358:15-16.
41. Zhong LT, Sarafian R, Kane DJ, et al. Bcl-2 inhibits death of central neural cells induced by multiple agents. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 90:4.533-4.537.
42. Itoh N, Tsujimoto Y, Nagata S. Effects of bcl-2 on Fas antigen-mediated cell death. *J Immunol* 1993; 151:621-627.
43. Hockenbery D, Oltvai Z, Yin XM, Millman C, Korsmeyer S. Bcl-2 functions in an antioxidant pathway in apoptosis. *Cell* 1993; 75:241-251.
44. Hockenbery B, Núñez G, Millman C, Schreiber RD, Korsmeyer SJ. Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature* 1990; 348:334-336.

45. Kane K, Sarafín T, Auton S, et al. Bcl-2 inhibition of neural cell death: decreased generation of reactive oxygen species. *Science* 1993; 262: 1. 274-1.276.
46. Schreck P, Rieber P, Baeuerle PA. Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-Kappa B transcription. *EMBO J* 1991; 10:2.247-2.258.
47. Baeuerle PA, Baltimore. En: Cohen P, Foulkes JG, eds. *Molecular aspects of celular regulation (vol 6)*. Amsterdam: Elsevier, 1991; 423-446.
48. Brach MA, Hass R, Sherman ML, Gunji H, Weichselbaum R, Kufe D. Ionizing radiation induces expression and binding activity of the nuclear factor Kappa B. *J Clin Invest* 1991; 88:691-695.
49. Shell S. The function of poly (ADP-ribosylation) in DNA breakage and rejoining. *Mol Cell Biochem* 1994; 138:71-75.
50. Lindhal T, Satoh MS, Poirier GG, Klungland A. Post-translational modification of poly(ADP-ribose) polymerase induced by DNA strand breaks. *TIBS* 1995; 20:405-401.
51. 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* 1986; 77:1.312-1.316.
52. Kuchino Y, Mori F, Kasal FI, et al. Misreading of DNA templates containing 8-hydroxydeoxyguanosine at the modified base and at adjacent residues. *Nature* 1987; 327:77-79.
53. Sies H. Strategies of antioxidant defense. *Eur J Biochem* 1993; 215:213-219.
54. Bannister JV, Bannister WH, Rotilio G. Aspects of the stucture, function and application of superoxide dismutase. *CRC Critical Reviews of Biochemistry* 1987; 22:111-180.
55. Turrens JF, Crapo JD, Freeman BA. Protection against oxygen toxicity by intravenous injection of liposome-entrapped catalase and superoxide dismutase. *J Clin Invest* 1984; 73:87-95.
56. Muizelaar JP. Clinical trials with dismutec (pegorgotein, polyethylene glycol-conjugated superoxide dismutase, PEG-SOD) in the treatment of severe closed head injury. *Adv Exp Med Biol* 1994; 366:389-400.
57. Emerit J, Pelletier S, Likforman J, Pasquier C, Thuillier A. Phase II trial of copper zinc superoxide dismutase (CuZn SOD) in the treatment of Crohn's disease. *Free Radic Res Commun* 1991; 12-13 Pt 2:563-569.
58. Perdereau B, Campana F, Vilcoq JR, De la Rochefordiere A, Barbaroux C, Fourquet A, Magdelenat FI. Superoxide dismutase (Cu/Zn) in cutaneous application in the treatment of radiation-induced fibrosis. *Bull Cancer Paris* 1994; 81:659-669.
59. Harrison JR, Rillema DP, Ham JH, Sando JJ. Inhibition of phorbol ester stimulated interleukin 2 production by copper (II) complexes. *Cancer Res* 1986; 46:5.571-5.575.
60. Darr DJ, Yanni S, Pinnell SR. Protection of chinese hamster ovary cells from paraquat-mediated cytotoxicity by a low molecular weight mimic of superoxide dismutase (DF-Mn). *Free Radic Bid Med* 1988; 4:357-363.
61. Schallreuter KU, Wood JM, Lemke KR, Levenig C. Treatment of vitiligo with a topical application of pseudocatalase and calcium in combination with short-term UVB exposure: a case study of 33 patients. *Dermatology* 1995; 190:223-229.

62. Bolton MG, Muñoz A, Jacobson LP, et al. Transient intervention with oltipraz protects against aflatoxin-induced hepatic tumorigenesis. *Cancer Res* 1993; 53:3.499-3.504.
63. Nare B, Smith JM, Prichard RK. Mechanisms of inactivation of schistosoma mansoni and mammalian glutathione S-transferase activity by the antischistosomal drug oltipraz. *Biochem Pharmacol* 1992; 43:1.345-1.351.
64. Benson AB. Oltipraz: a laboratory and clinical review. *J Cell Biochem* 1993 (suppl); 17F:278-291.
65. Parnham MJ, Graf E. Seleno-organic compounds and the therapy of hydroperoxide-linked pathological conditions. *Biochem Pharmacol* 1987; 36:3.095-3.102.
66. Gao JX, Issekutz AC. The effect of ebselen on T-lymphocyte migration to arthritic joints and dermal inflammatory reactions in the rat. *Int J Immunopharmacol* 1994; 16:279-287.
67. Schewe T. Molecular actions of ebselen, an antiinflammatory antioxidant. *Gen Pharmacol* 1995; 26:1.153-1.169.
68. Jenkinson SG, Roberts RJ, DeLemos RA, et al. Allopurinol-induced effects in premature baboons with respiratory distress syndrome. *J Appl Physiol* 1991; 70:1.160-1.167.
69. Oredsson S, Plate G, Qvarfordt P. Allopurinol-a free radical scavenger-reduces reperfusion injury in skeletal muscle. *Eur J Vasc Surg* 1991; 5:47-52.
70. Merimsky O, Inbar M, Chaitchik S. Treatment of advanced colorectal cancer by 5-fluorouracil-leucovorin combination with or without allopurinol: a prospective randomized study. *Anticancer Drugs* 1991; 2:447-451.
71. Montecucco C, Caporali R, Rossi S, Porta C. Allopurinol mouthwashes in methotrexate-induced stomatitis. *Arthritis Rheum* 1994; 37:777-778.
72. Tsavaris NB, Komitsopoulou P, Tzannou I, Loucatou P, Tsaroucha-Noutsou A, Kilafis G, Kosmidis P. Decreased oral toxicity with the local use of allopurinol in patients who received high dose 5-fluorouracil. *Sel Cancer Ther* 1991; 7:113-117.
73. Waldfahrer F, Iro H. Successful treatment of herpangina with allopurinol mouthwashes. *Laryngoscope* 1995; 105:1.405.
74. Salim AS. A new approach to the treatment of nonsteroidal anti-inflammatory drugs induced gastric bleeding by free radical scavengers. *Surg Gynecol Obstet* 1993; 176:484-490.
75. Granger DN, McCord JM, Parks DA, Hollwarth ME. Xanthine oxidase inhibitors attenuate ischemia-induced vascular permeability changes in the cat intestine. *Gastroenterology* 1986; 90:80-84.
76. Irita K, Fujita I, Takeshige K, Minakami S, Yoshitake J. Cinchocaine and amethocaine inhibit activation and activity of superoxide production in human neutrophils. *Br J Anaesth* 1986; 58:639-645.
77. Irita K, Fujita I, Takeshige K, Minakami S, Yoshitake J. Calcium channel antagonist induced inhibition of superoxide production in human neutrophils. *Biochem Pharmacol* 1986; 35:3.465-3.471.
78. Biemond P, Swaak AJG, Penders JMA, Beindorf CM, Koster JF. Superoxide production by polymorphonuclear leucocytes in rheumatoid arthritis and osteoarthritis: in vivo inhibition by the antirheumatic drug piroxicam due to interference with the activation of the NADPH-oxidase. *Ann Rheum Dis* 1986; 45:249-255.

79. Cross AR, Jones OTG. The effect of the inhibitor diphenylene iodonium on the superoxide generation system of neutrophils. *Biochem J* 1986; 237:111-116.
80. Cronstein BN, Rosenstein ED, Kramer SB, Weissmann G, Hirschhorn R. Adenosine: a physiologic modulator of superoxide anion generation by human neutrophils, adenosine acts via an A2 receptor on human neutrophils. *J Immunol* 1985; 135:1.366-1.371.
81. Berton G, Dusi S, Serra MC, Bellavite P, Rossi F. Studies on the NADPH oxidase of phagocyte. Production of a monoclonal antibody which blocks the enzymatic activity of pig neutrophil NADPH oxidase. *J Biol Chem* 1989; 264:5.564-5.568.
82. Lawrence RA, Burk RF. Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochem Biophys Res Commun* 1976; 71:952-959.
83. Diplock AT. The role of antioxidants in clinical practice. *Br J Clin Pract* 1990; 44:257-258.
84. Combs GF, Combs SB. The role of selenium in nutrition. New York: Academic Press, 1989; 532.
85. Burk RF, Hill KE, Awad JA, Morrow JD, Kato T, Cockell KA, Lyons PR. Pathogenesis of diquat-induced liver necrosis in selenium-deficient rats: assessment of the roles of lipid peroxidation and selenoprotein P. *Hepatology* 1995; 21:561-569.
86. Meister A. Glutathione, ascorbate and cellular protection. *Cancer Research* 1994; 54 (suppl):1.969s-1.975s.
87. Meister A. Glutathione metabolism and its selective modification. *J Biol Chem* 1988; 263:17.205-17.208.
88. Staal FJT, Roederer M, Herzenberg LA. Intracellular thiols regulate activation of nuclear factor kB and transcription of human immunodeficiency virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87:9.943-9.947.
89. Sagara M, Satoh J, Zhu XP, et al. inhibition with N-acetylcysteine of enhanced production of tumor necrosis factor in streptozotocin-induced diabetic rats. *Clin Immunol Immunopathol* 1994; 71:333-337.
90. Peristeris P, Clark BD, Gatti S, et al. N-acetylcysteine and glutathione as inhibitors of tumor necrosis factor production. *Cell Immunol* 1992; 140:390-399.
91. Faggioni R, Gatti S, Demitri MT, et al. Role of xanthine oxidase and reactive oxygen intermediates in LPS and TNF-induced pulmonary edema. *J Lab Clin Med* 1994; 123:394-399.
92. Redondo P, Subirá ML. N-acetylcysteine inhibits production of tumor necrosis factor- α and interleukin-1 β . *Arch Int Med* 1996; 156:1.238-1.241.
93. Burgunder JM, Varriale A, Lauterburg BH. Effect of N-acetylcysteine on plasma cysteine and glutathione following paracetamol administration. *Eur J Clin Pharmacol* 1989;36:127-131.
94. Vale JA, Proudfoot AT. Paracetamol (acetaminophen) poisoning. *Lancet* 1995; 346:547-552.
95. Redondo P, De Felipe I, De la Peña A, Aramendia JM, Vanaclocha V. Drug-induced hypersensitivity syndrome and toxic epidermal necrolysis. Treatment with N-acetylcysteine. *Br J Dermatol* 1997; 136:645-646.
96. Senaldi G, Pointare P, Piguet P-F, Grau GE. Protective effect of N-acetylcysteine in hapten-induced irritant en contact hypersensitivity reactions. *J Invest Dermatol* 1994; 102:934-937.

97. Ikeda M, Schroeder KK, Mosher LB, Woods CW, Akeson AI. Suppressive effect of antioxidants on intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression in human epidermal keratinocytes. *J Invest Dermatol* 1994; 103: 791-796.
98. Ferrari G, Van CY, Greene LA. N-acetylcysteine (D- and L-stereoisomers) prevents apoptotic death of neuronal cells. *J Neurosci* 1995; 15: 2.857-2.866.
99. De Flora S, Cesarone CF, Balansky RM, et al. Chemopreventive properties and mechanisms of N-acetylcysteine. The experimental background. *J Cell Biochem* 1995; 22 (suppl):33-41.
100. Osman E, Owen JS, Burroughs AK. S-adenosyl-L-methionine: a new therapeutic agent in liver disease. *Aliment Pharmacol Ther* 1993; 7:21-28.
101. Duce AM, Ortiz P, Cabrero C, Mato JM. S-adenosyl-L-methionine synthetase and phospholipid methyltransferase are inhibited in human cirrhosis. *Hepatology* 1988; 8:65-68.
102. Porta P, Aebi S, Summer K, Lauterburg BH. L-2-oxothiazolidine-4- carboxylic acid, a cysteine prodrug-pharmacokinetics and effects on thiols in plasma and lymphocytes in humans. *J Pharmacol Exp Ther* 1991; 257: 331-334.
103. Burton GW, Joyce A, Ingold KU. Is vitamin E the only lipid-soluble chain breaking antioxidant in human blood plasma and erythrocyte membranes? *Arch Biochem Biophys* 1983; 221:281-290.
104. Diplock AT. Fat soluble vitamins. London: Heinemann, 1985; 319.
105. Sies H, Murphy ME. Role of tocopherols in protection of biological systems against oxidative damage. *J Photochem Photobiol* 1991; 8:211-224.
106. Varma SD, Beachy NA, Richards RD. Photoperoxidation of lens lipids: prevention by vitamin E. *Photochem Photobiol* 1982; 36:623-626.
107. Stampfer MJ, Hennekens CH, Manson JE, Colditz GA, Rosner B, Willett WC. Vitamin E consumption and the risk of coronary disease in women. *N Engl J Med* 1993; 328:1.444-1.449.
108. Hense HW, Stender M, Bors W, Keil U. Lack of an association between serum vitamin E and myocardial infarction in a population with high vitamin E levels. *Atherosclerosis* 1993; 103:21-28.
109. Steiner M, Glantz M, Leko A. A study comparing vitamin E plus aspirin vs aspirin alone in patients with TIA. *Am J Clin Nutr* 1995; 62: 1.381S-1.384S.
110. Coghlan JG, Flitter WD, Clutton SM, Ilsley CD, Rees A, Slater TF. Lipid peroxidation and changes in vitamin E levels during coronary artery bypass grafting. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1993; 106:268-274.
111. Taylor PR, Li B, Dawsey SM, Li JY, Yang CS, Guo W, Blot WJ. Prevention of esophageal cancer: the nutrition intervention trials in Linxian, China. Linxian Nutrition intervention Trials Study Group. *Cancer Res* 1994; 54:2.029S-2.031S.
112. The Alpha-tocopherol Beta Carotene Cancer Prevention Study Group: the effect of vitamin E and beta carotene on the incidence of lung cancer and other cancers in male smokers. *N Engl J Med* 1994; 330: 1.029-1.035.
113. Greenberg ER, Baron JA, Tosteson TD, et al. A clinical trial of antioxidant vitamins to prevent colorectal adenoma. *N Engl J Med* 1994; 331:141-147.
114. Levine M. New concepts in the biology and biochemistry of ascorbic acid. *N Engl J Med* 1986; 314:892-902.
115. Meister A. On the antioxidant effects of ascorbic acid and glutathione. *Biochem Pharmacol* 1992; 44:1.905-1.915.
116. Kennes B, Dumont I, Brohee D, Hubert C, Neve P. Effect of vitamin C supplements on cell-mediated immunity in old people. *Gerontology* 1983; 29:305-310.

117. Levy R, Shriker O, Porath A, Riesenber K, Schlaeffer F. Vitamin C for the treatment of recurrent furunculosis in patients with impaired neutrophil function. *J Infect Dis* 1996; 173:1.502-1.505.
118. Hunter DJ, Manson JE, Colditz GA, et al. A prospective study of the intake of vitamins C, E and A and the risk of breast cancer. *N Engl J Med* 1993; 329:234-240.
119. Rimm EB, Stampfer MJ, Ascherio A, Giovannucci E, Colditz GA, Willett WC. Vitamin E consumption and the risk of coronary heart disease in men. *N Engl J Med* 1993; 328:1.450-1.456.
120. Robertson JM, Donner AP, Trevithick JR. Vitamin E intake and risk of cataracts in humans. *Ann NY Acad Sci* 1989; 570-572.
121. Bisset DL, Chatterjee R, Hannon DP. Photoprotective effect of superoxide-scavenging antioxidants against ultraviolet radiation-induced chronic skin damage in the hairless mouse. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 1990; 7:56-62.
122. Chan AC, Tran K, Raynor T, Ganz PR, Chow CK. Regeneration of vitamin E in human platelets. *J Biol Chem* 1991; 266:17.290-17.295.
123. Palozza P, Krinsky NI. Beta-carotene and alpha-tocopherol are synergist antioxidants. *Arch Biochem Biophys* 1992; 297:184-187.
124. Bendich A. The safety of beta-carotene. *Nutr Cancer* 1988; 11:207-214.
125. Fusaro RM, Johnson JA. Hereditary polymorphic light eruption in American indians. *JAMA* 1980; 244:1.456-1.459.
126. Middleton E, Jr, Kandaswami C. Effects of flavonoids on immune and inflammatory cell function. En: Harbone JB, ed. *The flavonoids: advances in research science 1986*. London: Ed Chapman and Hall, 1993: 619.
127. Kandaswami C, Perkins E, Soloniuk DS, Drzewiecki G, Middleton E, Jr. Ascorbic acid-enhanced antiproliferative effect of flavonoids on squamous cell carcinoma in vitro. *Anli Cancer Drugs* 1993; 4:91-96.
128. Hertog MGL, Feskens EJM, Hollman PCH, Rata MB, Kromhout D. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *Lancet* 1993; 342:1.007-1.011.
129. Frankel EN, Kanner J, German JB, Parks E, Kinsella JE. Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine. *Lancet* 1993; 341:454-457.
130. Sharma DK, Hall IH. Hypolipidemic, anti-inflammatory and antineoplastic activity and citotoxicity of flavonolignans isolated from *Hydnocarpus wightiana* seeds. *J Nat Prod* 1991; 54:1.298-1.302.
131. Bindoli A, Cavallini L, Siliprandi N. Inhibitory action of silymarin on lipid peroxide formation in rat liver mitochondria and microsomes. *Biochem Pharmacol* 1977; 26:2.405-2.409.
132. Lang I, Deak G, Muzes G, Pronai L, Feher J. Effect of the natural bioflavonoid antioxidant silymarin on superoxide dismutase (SOD) activity and expression in vitro. *Biotechnol Ther* 1993; 4:263-270.
133. Valenzuela A, Lagos C, Schmidt K, Videla LA. Silymarin protection against hepatic lipid peroxidation induced by acute ethanol intoxication in the rat. *Biochem Pharmacol* 1985; 34:2.209-2.212.
134. Valenzuela A, Barcia T, Guerra T, Garrido A. Inhibitory effect of the flavonoid silymarin on the erythrocyte hemolysis induced by phenylhydrazine. *Biochem Biophys Res Commun* 1985; 126:712-718.

135. Agarwal R, Katiyar SK, Lundgren DW, Mukhtar H. Inhibitory effect of silymarin, an antihepatotoxic flavonoid, on 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced epidermal ornithine decarboxylase activity and mRNA in SENCAR mice. *Carcinogenesis* 1994; 15:1.099-1.013.
136. Tuchweber B, Sieck R, Trost W. Prevention by silybin of phalloidin-induced acute hepatotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 1979; 51:265-275.
137. Johnson G, Lefer AM. Protective effects of a novel 21-aminosteroid during splanchnic artery occlusion shock. *Circ Shock* 1990; 30:155-164.
138. Lorenzl S, Koedel U, Frei K, Bernatowicz A, Fontana A, Pfister HW. Protective effect of a 21-aminosteroid during experimental pneumococcal meningitis. *J Infect Dis* 1995; 172:113-118.
139. Yue G, Sun FF, Dunn C, Yin K, Wong PY. The 21-aminosteroid tirilazad mesylate can ameliorate inflammatory bowel disease in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 1996; 276:265-270.
140. Halliwell B, Gutteridge JMC. Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. *Arch Biochem Biophys* 1986; 246:501-514.
141. Halliwell B. Drug antioxidant effects. A basis for drug selection? *Drugs* 1991; 42:569-605.
142. Bridges AB, Scott NA, Belch JJ. Probucol a superoxide free radical scavenger in vitro. *Atherosclerosis* 1991; 849:263-265.
143. Paterson JR, Rumley AG, Oldroyd KG, et al. Probucol reduces plasma lipid peroxides in man. *Atherosclerosis* 1992; 97:63-66.
144. Singal PK, Siveski-Lliskovic N, Hill M, Thomas TP, Li T. Combination therapy with probucol prevents adriamycin-induced cardiomyopathy. *J Moll Cell Cardiol* 1995; 27:1.055-1.063.
145. Ohya Y, Kumamoto K, Abe I, Tsubota Y, Fujishima M. Factors related to QT interval prolongation during probucol treatment. *Eur J Clin Pharmacol* 1993; 45:47-52.

Tabla 1. Principales mecanismos de generación de radicales libres en los sistemas biológicos

Mecanismo	Sustrato	Radical
Cadena mitocondrial*	O ₂	O ₂ ^{-·}
Reacciones metabólicas de reducción (oxididasas)	O ₂	O ₂ ^{-·} , H ₂ O ₂
NADPH oxidasa (LPMN)	O ₂	O ₂ ^{-·}
Mieloperoxidas (LPMN)	Cl ⁻ , H ₂ O ₂	ClO ^{-·}
Superóxido dismutasa (SOD)	O ₂ ^{-·}	H ₂ O ₂
Xantina oxidasa	O ₂	O ₂ ^{-·}
Citocromos microsomales	O ₂ , xenobióticos**(Q)	O ₂ ^{-·} , Q [·]
Radiaciones ionizantes	H ₂ O ₂	O ₂ ^{-·} , OH [·]
Deslocalización de metales de transición***	H ₂ O ₂ , O ₂ ^{-·} , LOOH, Fe ³⁺ , Cu ²⁺	OH [·] , LOO [·] , LO [·]
Activación NO sintetasa	L-arginina, O ₂ ^{-·}	NO [·] , ONOO ⁻

*Del 1%-5% del O₂ utilizado para generar ATP se escapa fisiológicamente del control de los citocromos en forma de anión superóxido.

**A través del mecanismo *redox cycling* o mecanismo de óxido-reducción cíclica enzimática del citocromo P_{<450+}, por ejemplo, con paraquat, adriamicina, etc.

***A través de la reacción de fenton o Haber-Weiss catalizada por metales. O₂^{-·}: radical superóxido; OH[·]: radical hidroxilo; Q: quinona; Q[·]: radical semiquinona; LOOH: lipoperóxidos; LOO[·]: radical peróxilo; LO[·]: radical alcóxilo; NO: radical óxido nítrico; ONOO: peroxinitrito.

Tabla 2. Biodisponibilidad de los principales radicales libres y especies oxigenadas reactivas

Compuesto		Vida media
Anión superóxido	O ₂ ^{-·}	[O ₂ ^{-·}] o [SOD] dependiente
Radical hidróxilo	OH [·]	10 ⁻⁹ s
Radical alcóxilo	RO [·]	10 ⁻⁶ s
Radical peróxilo	ROO [·]	7 s
Peróxido de hidrógeno	H ₂ O ₂	Estable [enzima], dependiente
Oxígeno singlete	¹ O ₂	10 ⁻⁶ s
Semiquinona	Q [·]	Días
Óxido nítrico	NO [·]	1 – 10 s
Peroxinitrito	ONOO ⁻	0,05 – 1 s

Tabla 3. Principales mecanismos fisiopatológicos de daño oxidativo sobre la célula

Lugar de acción	Alteración funcional
Membranas celulares y subcelulares	Alteración de las propiedades fisicoquímicas de la membrana → ↑ rigidez; ↓ permeabilidad celular
	Amplificación del daño oxidativo a través de las reacciones en cadena de peroxidación lipídica
	Disfunción de proteínas de membrana (bombas de transporte, enzimas) → pérdida de la homeostasis del Ca ⁺ citosólico y compartimental
	Alteración de la cadena electrónica mitocondrial → ↓ síntesis de ATP, ↑ índice NADH/NAD ⁺ , ↑ liberación de O ₂ ⁻
	Alteraciones de la permeabilidad mitocondrial (MMPT)*
Estructuras del citosol	Acción sobre proteínas enzimáticas, cofactores y grupos prostéticos → ↓ ATP, ↑ metabolismo anaerobio, inhibición de bombas Na ⁺ /K ⁺ , Na ⁺ /H ⁺ → ↓ Ca ²⁺ intracelular, ↑ NADH/NAD ⁺
	↑ Ca ²⁺ intracelular → activación de proteasas y fosfolipasas
	Deslocalización de metales de transición → producción de radicales peróxilo (ROO·) y alcóxilo (RO·)
Estructuras nucleares	Rotura monocatenaria o bicatenaria de ADN mediante radicales OH·
	Activación de la poli-ADP-ribosa polimerasa → ↓ NAD ⁺ , ↓ ATP
	Alteraciones transcripcionales
	Interacción de radicales con el ARNm y los ribosomas
	Activación del gen y la proteína p53 → inducción de apoptosis
	Activación del factor de transcripción NFκB
	Hidroxilación de deoxiguanosina en 8-OHdG → mutagénesis y carcinogénesis

MMPT: mecanismo conocido como “transición de permeabilidad de la membrana mitocondrial” que provoca en último término el colapso y destrucción de la mitocondria, perdiéndose su capacidad para generar energía y amplificando el daño oxidativo por liberación de intermediarios oxigenados reactivos. 8-OHdG: 8-hidroxideoxiguanosina.

Tabla 4. Antioxidantes exógenos utilizados en biomedicina

Mecanismo	Antioxidante	Sustancia diana
Inhibidor de la xantina oxidasa	Alopurinol	
	Oxipurinol	
	Ácido fólico	Xantina oxidasa
	Pterín aldehído	
	Tungsteno	
Inhibidores de la NADPH oxidasa	Adenosina	
	Anestésicos locales	
	AINE	
	Bloqueantes de canales de Ca ²⁺	NADPH oxidasa
	Ioduro de difenilene	
	Ácido monoclonal anti-NADPH-oxidasa	
Superóxido dismutasa	SOD nativa	
	IgA ₁ -SOD	
	PEG-SOD	O ₂ ⁻
	SOD en liposomas	
	Silimarina	
Simuladores de SOD	Desferoxamina-manganeso	O ₂ ⁻
	Cu-DIPS	
	Nitróxidos cíclicos	
Catalasa	Catalasa nativa	H ₂ O ₂
	PEG-catalasa	
	Catalasa en liposomas	
Otros scavengers no enzimáticos	Manitol	OH ⁻
	Albúmina	LOOH, HOCl
	DMSO	OH ⁻
	DMTU	OH ⁻ , H ₂ O ₂
	“Lazaroides” (21-aminoesteroides)	LOOH, O ₂
Inhibidores del redox cycling y quelantes del hierro	Desferoxamina	Fe ³⁺
	Ceruloplasmina	
Inhibidores de la lipoperoxidación	Alfa-tocoferol (vit-E)	
	Ácido ascórbico (vit-C)	
	Carotenoides	LOO [·] y LOOH
	Flavonoides	
	Probucol	
Potenciadores de los mecanismos antioxidantes naturales	Oltipraz	Inductor de GSH-Tx
	Ebselen	“GSH-PX”-like
	Monoésteres de glutatión	Precursor de GSH
	N-acetil-cisteína	Precursor de GSH
	S-adenosil-metionina	Precursor de GSH
	OTC	Precursor de GSH

AINE: antiinflamatorio no esteroideo; SOD: superóxido dismutasa; IgA₁: inmunoglobulina A-1; PEG: polietilén-glicol; Cu-DIPS: ácido diisopropilsalicílico de cobre; DMSO: dimetilsulfóxido; DMTU: dimetiltiourea; OTC: ácido L-2-oxotiazolidina-4-carboxílico. Modificada de Schiller HJ, Reilly PM, Bulkley GB. Antioxidant therapy. Crit Care Med 1993; 21:S92-S102.

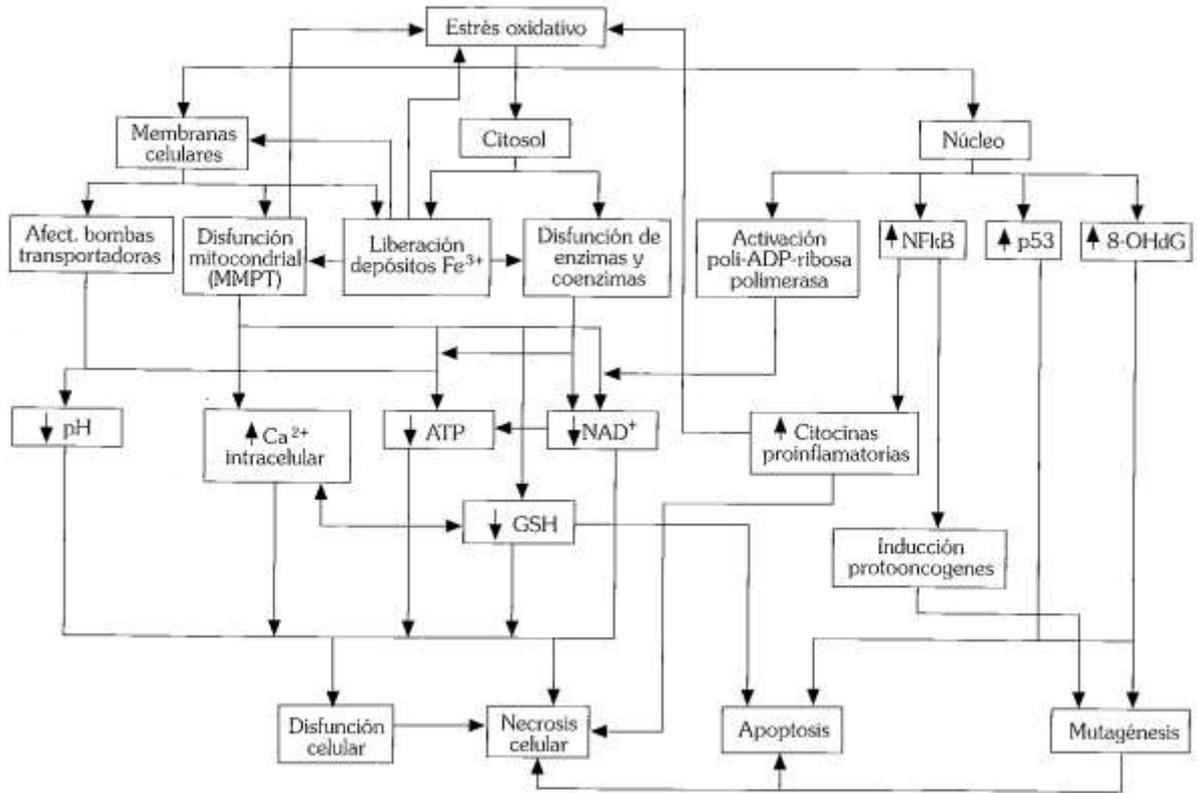


Figura 1. Esquema que representa las complejas vías por las cuales el estrés oxidativo provoca toxicidad y muerte celular.