

7. Biopatología de los radicales libres

GUILLERMO SÁEZ TORMO

INTRODUCCIÓN

Los radicales libres se caracterizan por la presencia de electrones individuales, no apareados, en los orbitales más externos de su estructura atómica. Se adquiere, con esta configuración, también conocida como paramagnética, la capacidad de reaccionar de forma muy rápida con diversas biomoléculas a las que oxidan al secuestrar de éstas un electrón. Esto conlleva, frecuentemente, cambios estructurales y/o funcionales importantes que encuentran su repercusión tanto a nivel celular como tisular y orgánico.

Esta forma de oxidación, aparentemente espontánea, se ha venido denominando estrés oxidativo, si bien, no debe ser interpretado necesariamente ni exclusivamente como un fenómeno citotóxico. La biogénesis de radicales libres acontece, y es inherente a la naturaleza aerobia de los seres vivos, siendo el resultado natural de la oxido-reducción de moléculas orgánicas. Podemos definir el estrés oxidativo como un **«fenómeno o estado de oxidación de moléculas vitales con modificación secundaria de su estructura y función biológica y responsable, con el paso del tiempo, del deterioro y claudicación de los distintos aparatos y sistemas de los seres vivos»**.

Durante las dos últimas décadas, el estrés oxidativo emerge y se consolida como un mecanismo subyacente en la fisiopatología de numerosas enfermedades de carácter degenerativo. Paradójicamente el oxígeno, elemento del que depende la vida de las células aeróbicas, es también el responsable de la degeneración progresiva de éstas y, por lo tanto, de las alteraciones orgánicas y funcionales que acontecen en los seres vivos desde las etapas más tempranas de su desarrollo hasta su senescencia.

Su mecanismo de acción, así como sus efectos biológicos, han sido descritos a nivel bioquímico y molecular con bastante precisión. Los recientes hallazgos obtenidos en este campo de la investigación biomédica parecen prometedores, tanto para el seguimiento como para el pronóstico y tratamiento más efectivo de aquellas patologías que cursan con estrés oxidativo.

FORMACIÓN DE INTERMEDIARIOS REACTIVOS DE OXÍGENO (ROS)

En el metabolismo aeróbico entre el 1 al 5% del oxígeno que consumimos, se reduce por mecanismo mono o divalente a especies parcialmente reducidas y reactivas (ROS) tales como el radical aniónico superóxido ($O_2^{\cdot-}$) y el peróxido de oxígeno (H_2O_2) respectivamente (Figura 1). Los procesos metabólicos donde estas especies moleculares se generan son numerosos destacando, por la intensidad de su producción, la cadena de transporte electrónico mitocondrial. Existe otra especie reactiva, conocida como radical hidroxilo ($\cdot OH$), considerada última responsable de los efectos citotóxicos de los ROS. Su vida media es de

Reducción Monovalente del Oxígeno Molecular

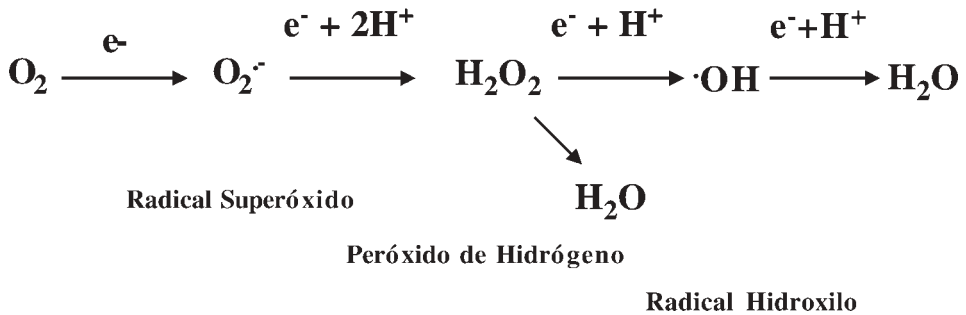


FIGURA 1. *Metabolitos reactivos en la reducción monovalente del oxígeno. La incorporación sucesiva de electrones en los orbitales del oxígeno molecular es un proceso termodinámicamente favorecido como resultado del cual se producen en las células aeróbicas intermediarios altamente reactivos.*

unos de 10^{-9} segundos, su reactividad es indiscriminada, y presenta afinidad manifiesta hacia los ácidos grasos polidesaturados, los hidratos de carbono, las proteínas y las bases nucleotídicas del ADN (1-3).

La secuencia reactiva de los ROS en un medio orgánico es compleja y sus consecuencias biológicas difíciles de predecir. La formación de estas especies se da bajo condiciones fisiológicas a través de múltiples procesos metabólicos. La autooxidación de leucoflavinas, hidroquinonas, catecolaminas, tioles, tetrahidropterinas, hemoproteínas y ferrodoxinas puede producir la reducción incompleta del oxígeno y generar radicales superóxido. Esta especie también se genera en el interior de orgánulos celulares como cloroplastos y mitocondrias. A la formación de especies reactivas contribuyen un número extenso de reacciones del metabolismo oxidativo donde éstas se generan ya sea como intermediarios de la reacción o como producto de la misma. La formación del radical superóxido y otras especies relacionadas tras la activación de neutrófilos y macrófagos constituye, además, la base molecular de su efecto biocida (3-5). El conocimiento de este mecanismo de acción permitió entender mejor tanto la función defensiva de estas células como la sintomatología del cuadro inflamatorio al mismo tiempo que explica su estimulación por diversos alérgenos y promotores tumorales (6, 7).

La dismutación del radical $O_2^{\cdot -}$ da lugar a la especie no paramagnética peróxido de oxígeno o agua oxigenada, cuyo poder oxidante da cuenta de su utilidad como desinfectante.

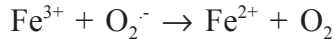


El radical superóxido puede actuar tanto como agente reductor como oxidante. Se comporta como un buen agente monoreductor con un potencial standard, $E^0 = -0.33V$ para la reacción parcial $O_2 + e \rightarrow O_2^{\cdot -}$ y también es un oxidante potente desde el punto de vista termodinámico, $E^0 = +0.87V$, si bien este proceso es más lento.

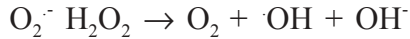
La reactividad del radical superóxido para generar radicales $\cdot OH$ tiene importantes connotaciones en relación con su formación y consecuencias sobre los sistemas biológicos. El radical hidróxilo es mucho más reactivo que el radical superóxido. La formación de éste transcurre a través de la reacción de Fenton:



y la óxido reducción cíclica del metal por parte del superóxido:



siendo la suma de ambas reacciones



conocida, esta última, como reacción de Haber-Weiss, desde que Beauchamp y Fridowich así la bautizaran en la década de los setenta (1-6).

Superóxido, peróxido de hidrógeno y radical hidróxilo reaccionan con relativa facilidad con macromoléculas clave para la correcta función celular, como son los ácidos grasos de las estructuras fosfolipídicas, proteínas, hidratos de carbono y ácidos nucleicos (1-3). Algunos productos de degradación oxidativa, especialmente procedentes de estructuras lipídicas, tras la lipoperoxidación, mantienen una reactividad importante que les permite actuar como mecanismos de reacción en cadena,

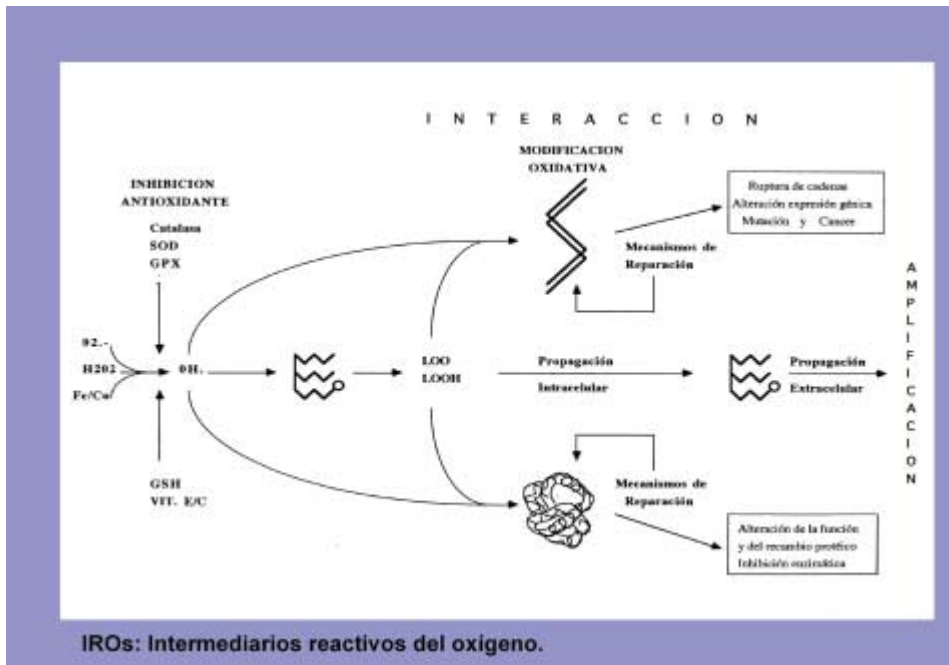


FIGURA 2. Interacción de los intermediarios reactivos del oxígeno con biomoléculas orgánicas. El poder oxidante de los IROs induce oxidaciones de biomoléculas a las que modifica y altera su función biológica.

propagando el poder oxidante de los ROS a estructuras tanto próximas como alejadas del foco inicial, e incluso pasar a sangre y ser transportadas en forma de LDL modificadas para su distribución, en minutos, por todo el organismo (Figura 2).

SISTEMAS Y MECANISMOS ANTIOXIDANTES

Un antioxidante es una estructura molecular capaz de prevenir y/o evitar la oxidación de otra molécula, bien por interacción y estabilización de especies reactivas, bien por la transformación de éstas a configuraciones más estables y de reactividad reducida.

Los antioxidantes representan un grupo variado de elementos dotados, todos ellos, de una función homeostática de gran importancia, como es el control de los niveles fisiológicos de especies reactivas. Éstas deben mantenerse por debajo de su umbral citotóxico.

En condiciones fisiológicas, el nivel de antioxidantes supera en varios órdenes de magnitud la concentración de especies reactivas en su estado estacionario. A pesar de esto, la formación de ROS tiene lugar de forma continua pero controlada. En estas condiciones, se dice que las especies reactivas ejercen efectos reguladores (2, 8), dando así lugar a lo que podríamos denominar como «**fisiología oxidativa**», término que proponemos para describir los efectos fisiológicos de los ROS, en contraposición con el estrés oxidativo, definido por Helmut Sies.

En términos generales, los antioxidantes biológicos pueden dividirse en dos grandes grupos de moléculas. Aquellas de estructura compleja y alto peso molecular que constituye el grupo de las enzimas antioxidantes, y los de menor tamaño y peso molecular entre los que se encuentran las vitaminas E, C, el glutatión reducido (GSH), el ácido úrico, carotenos, compuestos fenólicos, etc. A cada uno de ellos corresponde la estabilización de una o más especies reactivas y en el compartimento celular adecuado (3, 5, 7, 9).

Para una protección antioxidante eficaz se requiere de la actuación sincronizada de tres enzimas, la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (Cat.) y la glutatión peroxidasa (GPx) (Figura 3). Se trata de reducir a las especies reactivas superóxido y peróxido de hidrógeno a moléculas

las más estables, agua y oxígeno, al mismo tiempo que se evita la interacción entre las anteriores en presencia o ausencia de metales de transición y, así, la formación de la especie oxigenada más reactiva, el radical $\cdot\text{OH}$, a través de las reacciones anteriormente descritas (Haber-Weiss y Fenton).

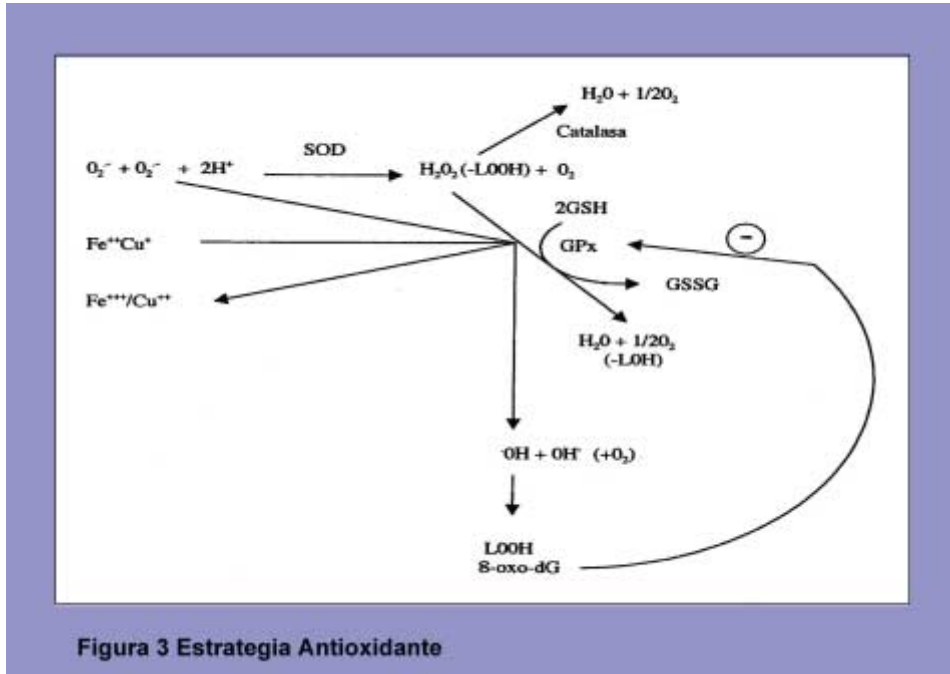


FIGURA 3. Estrategia antioxidante. Las enzimas antioxidantes son las encargadas de evitar la formación de los radicales hidróxilos en la defensa contra el estrés oxidativo.

La superóxido dismutasa se encarga de la dismutación de radicales O_2^- a H_2O_2 , esta última, aunque más estable, sigue poseyendo una reactividad alta. Un aumento de copias de esta enzima se produce en sujetos afectados con el síndrome de Down. El descubrimiento de esta enzima en 1969 marcó un hito en la investigación biomédica. Posteriormente se han ido identificando variantes moleculares de la enzima: Cu/Zn-SOD (citosólica, 30kDa; SOD-1) MnSOD (mitocondrial, 80kDa; SOD-2) y Cu/Zn-SOD extracelular o SOD-3. La constante de velocidad de la reacción de dismutación es aproximadamente de $2 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

Las catalasas catalizan la dismutación y peroxidación de dos moléculas de H_2O_2 para rendir oxígeno y agua. Es una de las actividades catalíticas más rápidas que se conoce con un K_m y V_{max} muy altos para el H_2O_2 , lo que la convierte en el agente antioxidante más efectivo contra esta especie.

La glutatión peroxidasa (GPx) elimina hidroperóxidos y peróxidos orgánicos (ROOH) al mismo tiempo que oxida su sustrato fisiológico, el GSH, a glutatión oxidado (GSSG). Existen también distintas variantes moleculares (GPx1 a GPx5), selenio-dependiente (tetramérica) y selenio independiente (dimérica). Su K_m para el H_2O_2 es reducida, encargándose de la degradación de esta especie a bajas concentraciones y actuando como mecanismo complementario de la catalasa. Existe una GPx selenio dependiente de localización intralipídica. Esta última actuaría directamente sobre los hidroperóxidos formados en las membranas celulares (7, 10).

El ácido ascórbico, o vitamina C, es un antioxidante de bajo peso molecular cuyas propiedades antioxidantes fueron anticipadas por el investigador húngaro Alfred Szent-Györdyi en 1928 (11). Actúa contra las especies moleculares O_2^- , $\cdot OH$, H_2O_2 y oxígeno singulete (1O_2). Su regeneración a ácido ascórbico depende de sistemas a su vez dependientes de GSH (12). La concentración de esta vitamina en frutos cítricos es elevada (13).

La vitamina E o alfa-tocoferol es un antioxidante lipofílico. Es eficaz en la defensa y mantenimiento de fosfolípidos en las estructuras membranosas. El suplemento dietético con esta vitamina ha demostrado ser útil en la reducción de estrés oxidativo, prevención de fenómenos asociados como el deterioro de la función mitocondrial ha sido relacionada con la longevidad de la especie humana (14).

Los carotenoides, junto con la vitamina E son los antioxidantes más importantes de las membranas celulares (15). Alfa y beta caroteno, la luteína, el licopeno, la criptoxantina y la zeaxantina son los más importantes. Se ha descrito que tienen efectos antimutagénicos (7, 16).

El glutatión reducido es sin duda uno de los antioxidantes endógenos más eficaces que nos ofrece la naturaleza. Actúa en la detoxificación de xenobióticos a través de la GSH-transferasa, mantiene el estado reducido de muchas proteínas y es un inhibidor excelente del radical OH (5, 17, 18, 19).

La melatonina es otra de las moléculas biológicas a la que se le asignan acciones protectoras y antioxidantes (20). Un grupo numeroso de sustancias sintéticas han sido probadas con este mismo propósito entre las que se encuentran, el ebselen, la N-acetil cisteína, el probucol, la penicilamina, etc. (7).

CONSECUENCIAS BIOLÓGICAS DEL ESTRÉS OXIDATIVO

Aun a pesar de la alta tasa de antioxidantes presente en las células, el equilibrio entre estos y la formación de especies reactivas se ve alterado en múltiples situaciones tanto fisiológicas como fisiopatológicas. La transición feto-neonato, la exposición a altas concentraciones de oxígeno y diversos procesos inflamatorios o tóxicos son un ejemplo de ello.

Cuando la producción de las especies reactivas supera la capacidad de los sistemas antioxidantes, las células entran en este fenómeno conocido como estrés oxidativo, donde un grupo numeroso de moléculas ve amenazada su integridad estructural y su función biológica (21).

En la oxidación de **lípidos** por radicales libres (peroxidación lipídica) se producen secuestros de protones seguido del reordenamiento y desplazamiento de dobles enlaces, provocando finalmente la alteración de la estructura, la fluidez y la permeabilidad de las membranas celulares. Cuando este fenómeno acontece sobre los fosfolípidos de las lipoproteínas plasmáticas (LDL), el poder aterogénico de éstas se acentúa de forma significativa. La arterioesclerosis y sus consecuencias anatomopatológicas se acentúan con el estrés oxidativo. Por otra parte, la alteración de los niveles de óxido nítrico (NO) tras su interacción con radicales superóxido para formar peroxinitrito (ONOO⁻), reduce su disponibilidad y acción vasodilatadora, incrementando, así, el riesgo de hipertensión arterial. Uno de los aspectos más característicos de la peroxidación lipídica es su rápida propagación a través de las membranas plasmáticas, lo que, unido al poder mutagénico de sus productos, confiere a este mecanismo un protagonismo singular en la toxicidad por estrés oxidativo. Peróxidos e hidroperóxidos son agentes de reconocida acción cancerígena al interactuar con el ADN modificando su estructura y secuencia nucleotídica.

La modificación oxidativa de las **proteínas** por ROS se traduce en alteraciones importantes de sus múltiples funciones biológicas: activida-

des enzimáticas, transmisión de señales, regulación metabólica y genética, etc. Diversos factores transcripcionales como NfκB, AP1 o Nrf2 se activan por la presencia de especies reactivas y contribuyen, de esta forma, a la regulación de la expresión génica.

El ADN es susceptible de modificación por radicales ·OH. Esta modificación, que puede afectar a cualquiera de sus bases nucleotídicas, se produce frecuentemente en la guanina, dando lugar a la base modificada 8-oxo-2'-deoxiguanina (8-oxo-dG), cuyo potencial mutagénico es también muy conocido. Su presencia en las estructuras de ADN induce a errores en la incorporación de bases nucleotídicas durante su replicación por la enzima ADN polimerasa.

MARCADORES BIOQUÍMICO-MOLECULARES DE ESTRÉS OXIDATIVO

La modificación molecular, por oxidación no controlada metabólicamente, se estudia mediante el aislamiento y cuantificación de los distintos productos que se generan. Lípidos, proteínas y ácidos nucleicos rinden metabolitos de oxidación de fácil identificación y valoración en el laboratorio de bioquímica clínico-experimental. Puede asumirse que para cada una de las moléculas susceptibles de modificación por estrés oxidativo existe un marcador representativo que así lo identifica. Por ejemplo, la peroxidación lipídica se mide, habitualmente, por la cantidad de malondialdehído (MDA), encontrado en suero, orina o muestra de tejido. Pero existen otros metabolitos igualmente válidos, si bien, los métodos analíticos requieren tecnologías más sofisticadas, como es el caso de compuestos volátiles (pentano, etano), 8-isoprostanos, (8-Epi-PGF_{2α}), hidroxinonales (HNE), etc.

Para el estudio de la oxidación de proteínas también se han desarrollado diversos protocolos. El más utilizado es la formación de grupos carbonilos, que puede complementarse con la identificación de disulfuros proteicos, como resultado de la oxidación de grupos tiólicos reducidos. Uno de los tioles no proteicos más estudiados es el glutatión reducido o GSH. Su alta concentración y amplia distribución por la naturaleza lo convierten, junto a su forma oxidada (GSSG) en el marcador más utilizado e idóneo en este sentido. De hecho, la relación glutatión

oxidado/reducido (GSSG/GSH) es uno de los índices más representativos, reproducibles y fiables en el estudio y seguimiento de procesos degenerativos asociados al estrés oxidativo.

Especial atención se ha prestado al aislamiento y valoración de las bases nucleotídicas modificadas del ADN. Entre ellas, la oxidación de la guanina en posición 8 (8-oxo-2'-desoxiguanina) es en la actualidad un marcador de elección. Al igual que en el caso anterior, se trata de uno de los marcadores que mejor reflejan la intensidad del estrés oxidativo, ya sea *in vivo* como *in vitro*. Además, su conocido potencial mutagénico resalta su interés como indicador de la capacidad transformante celular de un proceso fisiopatológico determinado. Para su detección también existen diversas técnicas analíticas. En la actualidad la más extendida requiere la cromatografía de alta eficacia con detección electroquímica.

En la valoración del estrés oxidativo es recomendable también la cuantificación de actividades o niveles de antioxidantes. El análisis enzimático proporciona información válida sobre posibles deficiencias en la síntesis o inactivación de éstas, lo que nos orientará hacia un posible consumo de las proteínas responsables, o bien, déficits nutricionales de diversa naturaleza. El aporte de nutrientes y oligoelementos influye notablemente en el estado antioxidante orgánico, ya que éstos representan los precursores, frecuentemente limitantes, para su síntesis y función catalítica. Este es el caso de los metales de transición cobre, hierro y selenio.

Otra aproximación práctica y asequible es la valoración de la capacidad o potencial antioxidante total del plasma sanguíneo. Mediante distintas técnicas analíticas es posible cuantificar dicho potencial que da cuenta del poder reductor, es decir, del contenido total de sustancias antioxidantes presentes en la muestra biológica.

En la actualidad existen distintas presentaciones comerciales para llevar a cabo la mayor parte de los metabolitos mencionados. Esto facilita enormemente el estudio de sus niveles y aplicación no solo en la práctica experimental sino también en el diagnóstico de laboratorio. No obstante, son todavía numerosos los usuarios que argumentan en contra de su utilidad y rentabilidad.

En cualquier caso, la validez clínica de los parámetros oxidativos se encuentra en fase de estudio, y representa un aspecto de gran interés biomédico.

PROCESOS DEGENERATIVOS ASOCIADOS AL ESTRÉS OXIDATIVO

El papel que juega el estrés oxidativo en la patogenia de enfermedades degenerativas es bastante conocido y aceptado por la comunidad científica y médica.

El deterioro que sufren paulatinamente nuestras moléculas orgánicas y la pérdida de su función biológica por el estrés oxidativo, al que inexorablemente nos vemos sometidos los seres aeróbicos, es por sí mismo suficiente para explicar el inicio y la progresión de distintas enfermedades degenerativas. El propio proceso de envejecimiento cuenta con una hipótesis defendida por científicos de elite como Harman y Miquel (22). No debemos olvidar que durante el transporte electrónico, y especialmente a nivel del complejo I y III se liberan radicales superóxido (23) cuya dismutación a H_2O_2 y posterior reducción a $\cdot OH$ representa el mecanismo por el que se pueden dañar los lípidos de la membrana interna mitocondrial, ricos en ácidos grasos polidesaturados, o bien, inducir mutaciones en el ADN mitocondrial (ADNmt). El índice de lesiones que sufre esta molécula es muy alto lo que, unido a su tamaño reducido y la ausencia de exones y sistemas de reparación, eleva su incidencia mutagénica (entre 10 a 20 veces más que el ADN nuclear). Ello coincide con el acúmulo de mutaciones y/o delecciones, la reducción del número de copias del ADNmt, la disminución de la actividad de la cadena de transporte electrónico y los cambios de la morfología mitocondrial detectados en los tejidos envejecidos.

Entre los procesos degenerativos más estrechamente vinculados al estrés oxidativo distinguimos, por su importancia epidemiológica, clínica y social, las enfermedades neurodegenerativas, las alteraciones cardiovasculares y el cáncer. Se ha demostrado una correlación positiva entre la eficiencia de enzimas reparadoras del ADN y la longevidad de las especies. Por otra parte, el hecho de que la restricción calórica disminuya el estrés oxidativo, mejore los niveles de antioxidantes intracelulares y alargue la vida de los animales (24) invita a una reflexión que va más allá del ámbito científico. Gracias a recientes tecnologías, como la utilización de los microchips de ADN, los genes y factores de transcripción (NFkB, AP-1, HIF-1) identificados e implicados en este fenómeno son muy numerosos (25).

Las enfermedades neurodegenerativas y el estrés oxidativo están estrechamente relacionadas. La enfermedad de Alzheimer (EA) representa uno de los procesos más devastadores que afecta a millones de personas en el mundo (26). Varios estudios han relacionado la EA con mutaciones en el gen de la proteína precursora amiloide (PPA) localizada en el cromosoma 21q21.2, si bien la función de ésta no es del todo conocida.

Por otra parte desde 1995 el gen de la presenilina (PS1) ha sido asociado con, al menos, 60 mutaciones diferentes detectadas en unas 80 familias con EA de aparición temprana.

La enfermedad de Parkinson (EP) es la segunda enfermedad neurodegenerativa en frecuencia después de la EA. El espectro mutagénico de esta enfermedad ha sido extensamente estudiado (27, 28). La implicación del estrés oxidativo en la EP deriva, entre otras observaciones experimentales, del hecho de que el metabolismo de la dopamina puede generar radicales secundarios a la autooxidación del neurotransmisor. Estas estructuras cíclicas se oxidan espontáneamente y, a través de ciclos redox, generan el radical $\cdot\text{OH}$.

En cada uno de estos cuadros degenerativos se ha demostrado presencia de estrés oxidativo, secundario a la disminución de los sistemas antioxidantes. El GSH es un antioxidante muy potente cuya disminución, por debajo del nivel fisiológico establecido, parece ser una constante en la EP. En estos pacientes se ha observado, a nivel de la sustancia nigra, trastornos de la fosforilación oxidativa secundaria a la disminución de la actividad del complejo I de la cadena de transporte electrónico, si bien, su posible relación con los niveles de GSH es discutida.

El 58% de las neuronas nigrales en los pacientes con EP y solo un 9% del grupo control contienen aductos del producto de peroxidación 4-hidroxi-2-nonenal (HNE) con proteínas. En los leucocitos de pacientes con EP se ha observado un mayor nivel de alteraciones cromosómicas y daño oxidativo del ADN en comparación con los sujetos sanos. El estrés oxidativo también se ha visto implicado en otras neurodegeneraciones como la esclerosis lateral amiotrófica (ELA), que cursa con alteraciones en la síntesis de la enzima SOD.

La deficiencia del complejo I de la cadena de transporte electrónico en la EP fue descrita por primera vez en 1989 y, aunque no se conoce

con exactitud su causa, es posible que esta disfunción se deba a mutaciones en el ADNmt. En otros cuadros neurodegenerativos, como la enfermedad de Huntington, y la Ataxia de Friedreich se han identificado deficiencias en los complejos II y III y I y II respectivamente conjuntamente con anomalías mitocondriales secundarias a mutaciones de origen nuclear.

En el sistema nervioso central el control adecuado de la apoptosis es especialmente importante y, por lo tanto, sometido a múltiples factores reguladores, ya que debe existir un delicado equilibrio entre la proliferación y la muerte de las neuronas durante la embriogénesis y antes de alcanzar el estado postmitótico de estas células nerviosas. En la EP, EA y ELA, el número de fragmentos de ADN cuantificados por la técnica de TUNEL, detectados en las neuronas corticales del hipocampo y región frontal, en las neuronas motoras de la médula espinal y en aquellas de la sustancia nigral dopaminérgica es mayor que en los sujetos sanos de la misma edad. La expresión de la proteína reguladora del ciclo celular y apoptosis, p53, está aumentada en los lóbulos frontal y temporal de los sujetos fallecidos por EA.

PAPEL DEL ESTRÉS OXIDATIVO EN LA CARCINOGENÉISIS

Diversos estudios experimentales han tratado de dilucidar el mecanismo de acción implicado en la transformación maligna celular inducida por los radicales libres. Algunos estados deficientes en sistemas antioxidantes cursan con alteraciones neoplásicas importantes. En el síndrome de Bloom, la Anemia de Fanconi o en la Ataxia-Telangiectaxia, consideradas como enfermedades con una alta incidencia tumoral, se observan alteraciones de los mecanismos de defensa antioxidante en sangre y tejidos de los sujetos afectos (8). En relación con esto, aunque en sentido contrario, distintos estudios epidemiológicos señalan una menor incidencia tumoral en poblaciones alimentadas mayoritariamente con frutas y verduras, es decir, con alimentos ricos en antioxidantes (29).

El estrés oxidativo y el proceso tumoral se encuentran estrechamente relacionados a través de la oxidación del material genético. Kuchino, Nishimura (30) y el grupo de Grollman (31, 32) fueron pioneros en este

tipo de estudios. Ellos demostraron que la oxidación de la guanina a 8-oxo-dG inducía errores en la replicación del ADN por parte de la polimerasa ADN-dependiente. Cambios conformacionales inducidos por la guanina oxidada parecen ser los responsables del apareamiento de bases nucleotídicas no complementarias, al permitir el establecimiento de puentes de hidrógeno con adeninas (A) y timinas (T) (32).

Posiblemente, la transversión mutacional GC-TA sea la lesión más frecuente en términos oxidativos. Estos errores, que persisten a pesar de los mecanismos de reparación, se producen tanto de forma espontánea como inducidos por agentes oxidantes (33, 34, 35-39).

Las células tumorales presentan un metabolismo oxidativo diferente al de las células sanas. Entre los cambios observados, ya en tiempos de Otto Warburg, y recientemente constatados por Szatrowski y Nathan, destaca el aumento en la producción de agua oxigenada (40). En la actualidad, se sabe que las células tumorales no sólo fabrica más H_2O_2 sino que además presentan una disminución significativa de sus actividades antioxidantes (41).

En el carcinoma colorrectal humano, la concentración de 8-oxo-dG con respecto a la mucosa sana es un orden de magnitud superior. El 70% de las biopsias analizadas presentan una o más alteraciones moleculares en genes supresores de tumores, como el 5q (APC y MCC), 17p (p53), 18q (DCC) y 22q. En el 71% de los casos la alteración se localiza en el gen p53, como se sabe, mutado en la mayoría de los tumores humanos (42). Los resultados obtenidos permiten proponer un modelo de acontecimientos bioquímico-moleculares para explicar el acumulo de lesiones genéticas que caracteriza la evolución de la mayoría de los tumores y especialmente del cáncer de colon (Figura 4). Pero existen además otros tumores en los que también se ha observado un aumento de 8-oxo-dG con respecto al tejido normal, como son los carcinomas de pulmón, estómago, ovario, próstata y mama (43). En la leucemia linfocítica crónica se ha encontrado un elevado contenido de productos de peroxidación (MDA y 8-oxo-dG) junto con la disminución de actividades antioxidantes. Estas alteraciones progresan con el tiempo de la enfermedad (44). Un mismo patrón oxidativo se ha observado recientemente en el carcinoma epitelial ovárico donde los niveles de MDA en el tumor aumentan proporcionalmente con su grado de malignización tumoral (45).

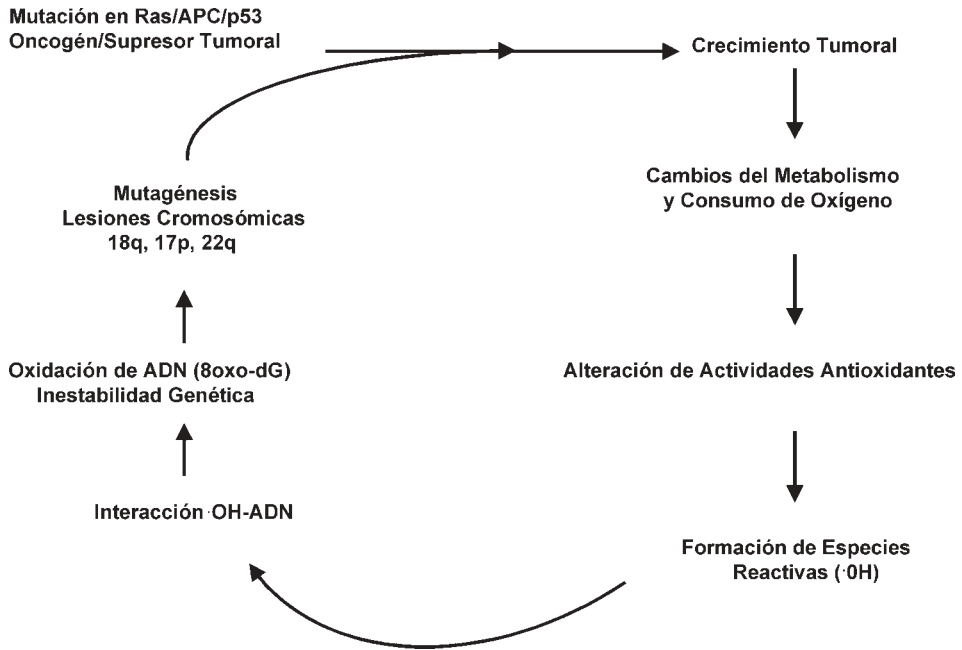


FIGURA 4. *Formación de radicales hidróxilo y alteraciones genéticas en la progresión tumoral. El estrés oxidativo tumoral conduce al fenotipo mutagénico y acúmulo de alteraciones genéticas a través de la modificación oxidativa del ADN.*

PAPEL DEL ESTRÉS OXIDATIVO EN LA ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR

Tanto a través de la inactivación del agente vasodilatador óxido nítrico (NO) por radicales $\text{O}_2^{\cdot-}$, como por la oxidación de las lipoproteínas LDL, el estrés oxidativo influye en el desarrollo y complicación de las enfermedades cardiovasculares.

En este sentido cabe destacar, una vez más, la importancia que adquieren los hábitos nutricionales, a la sazón, objetivo prioritario de la investigación tanto clínica como básica. En colaboración con el grupo de la doctora Covas y el doctor De la Torre, en el IMIM de Barcelona, hemos contribuido a esclarecer el papel de la intervención nutricional como mecanismo preventivo de alteraciones pro-aterogénicas. El consumo de aceite de oliva enriquecido con polifenoles reduce la formación de peróxidos lipídicos, aumenta la actividad GPx e inhibe la oxidación

del ADN, como demuestra la menor y significativa concentración de 8-oxo-dG en relación con el total de guaninas intactas (46, 47).

Desde los estudios pioneros con maniobras de isquemia-reperusión sobre el miocardio de caninos, el conocimiento de los mecanismos oxidativos en la patología cardiovascular ha avanzado de forma espectacular (48-49). Efectivamente, el estrés oxidativo está presente en situaciones fisiopatológicas que afectan al sistema cardiocirculatorio, tales como el consumo de tabaco, la hipercolesteronemia, la diabetes y la hipertensión arterial (50). Distintos modelos experimentales de hipertensión demuestran la existencia de fenómenos oxidativos. La hipertensión espontánea (51), la de origen renovascular (52), la inducida con acetato de desoxicorticoesterona (53), o la asociada a la obesidad (54) son algunos ejemplos de la relación existente entre el estrés oxidativo y la disfunción vascular.

El hallazgo de actividades antioxidantes disminuidas y de los productos de peroxidación lipídica aumentados en la hipertensión apunta hacia una sobreproducción de especies reactivas en estos pacientes. Estas alteraciones se han demostrado tanto en las células endoteliales (55, 56) como en las células circulantes (57). Un aumento en la producción de radicales oxigénicos e hidroperóxidos en sangre es la causa de la modificación oxidativa de lipoproteínas LDL, que son fagocitadas por el sistema retículo endotelial con mayor avidez que las LDL intactas (58).

Recientemente, hemos demostrado que las células sanguíneas de sujetos hipertensos presentan niveles significativamente más elevados de 8-oxo-dG tanto en el ADN nuclear como mitocondrial, lo que da cuenta de la intensidad del proceso oxidativo (59). La reducción de las cifras tensionales en estos pacientes normaliza también los niveles de los marcadores de estrés oxidativo, siendo este efecto independiente de la estrategia terapéutica utilizada y proporcional al tiempo de tratamiento (60). Cabe destacar la correlación significativa observada entre el marcador de oxidación (GSSG/GSH) y el grado de lesión orgánica, dada por los niveles de microalbuminuria en pacientes hipertensos (61). En otro estudio multicéntrico llevado a cabo por el grupo de trabajo AtheroGene, se ha demostrado el papel de la GPx eritrocitaria como factor independiente de riesgo cardiovascular (62). Este hecho, junto con los descritos anteriormente, acerca todavía más el papel de las modificaciones oxidativas a la patogenicidad de enfermedades degenerati-

vas y abre prometedoras expectativas en la identificación de nuevos marcadores clínicos.

ESTRÉS OXIDATIVO EN LA PATOLOGÍA DIGESTIVA

Representa este un grupo de la patología clínica donde la presencia de estrés oxidativo también es muy evidente (63). En este sentido, destacamos el papel que desempeña este fenómeno en procesos inflamatorio-degenerativos de afección digestiva, entre los que se incluyen la cirrosis biliar o alcohólica, así como la pancreatitis aguda, si bien, otras alteraciones del tracto digestivo no deben ser descartadas. La colestasis crónica en ratas está asociada a estrés oxidativo manifiesto por el aumento de peróxidos lipídicos y la disminución de enzimas antioxidantes hepáticas (64). En estos mismos animales, agentes citoprotectores, eficaces en el tratamiento de la cirrosis biliar inducida por colestasis crónica, parecen desempeñar su función terapéutica a través de un efecto antioxidante. El ácido ursodesoxicólico previene parcialmente la depleción del antioxidante GSH, tanto citosólico como intramitocondrial. Este efecto está relacionado con un aumento de la expresión del RNA mensajero de las enzimas gamma-glutamil-cisteinil sintetasa y gamma cistationinasa y cursa con la inhibición de la producción de hidroperóxidos mitocondriales y aductos del producto de peroxidación HNE con proteínas (65). De la misma forma, la cirrosis alcohólica ha sido vinculada con el estrés oxidativo mitocondrial (66). Por lo que respecta a la pancreatitis aguda, diversos estudios han puesto de manifiesto la disminución del tripéptido GSH y aumento de peróxidos lipídicos en distintos modelos animales, al mismo tiempo que la administración de antioxidantes se presenta como una terapia coadyuvante y eficaz en la reducción de la lesión acinar y el edema pancreático (67). En otro tipo de estudios se ha valorado el efecto protector de agentes como la pentoxifilina contra la inflamación edematosa de la pancreatitis inducida con ceruleína (68).

ESTRÉS OXIDATIVO EN EL SÍNDROME DE INMUNODEFICIENCIA ADQUIRIDA Y PACIENTES EN ESTADO CRÍTICO

En sujetos portadores de VIH el estrés oxidativo se hace manifiesto a medida que éstos desarrollan la enfermedad. Se han estudiado numerosos parámetros y efectuado distintas aproximaciones experimentales y terapéuticas. Sin duda, uno de los metabolitos más claramente afectados es el GSH (69). Los estudios realizados en este sentido han demostrado alteraciones en los sistemas antioxidantes en la sangre de los sujetos infectados. Estas observaciones han llevado a sugerir que los marcadores de estrés oxidativo eritrocitarios o plasmáticos pueden ser utilizados como marcadores clínicos de la enfermedad (70, 71). Más definitivo y práctico resulta la intervención terapéutica con antioxidantes demostrándose eficaz no sólo como tratamiento del cuadro clínico sino como mecanismo inhibidor de la expresión del virus patógeno (70, 72).

La mayor parte de las muertes en los pacientes con enfermedades críticas que requieren cuidados intensivos se atribuye a la sepsis y a sus secuelas: shock séptico, síndrome de respuesta inflamatoria sistémica y de distrés respiratorio agudo. Clínicamente se caracterizan por alteraciones de la regulación cardiovascular manifestadas en forma de hipotensión sistémica, vasodilatación refractaria periférica, así como hipertensión pulmonar. A través de estudios clínicos y experimentales se ha puesto de manifiesto que estos pacientes sufren un estrés oxidativo severo (73). Efectivamente, en el paciente crítico se ha encontrado una asociación estrecha entre distintos parámetros oxidativos y la evolución del cuadro clínico. Por el momento no ha sido posible seleccionar un único marcador que permita reflejar el estado antioxidante del paciente en estado crítico. Sí se sabe, sin embargo, que el aumento de estrés oxidativo va asociado a un mal pronóstico de la enfermedad y no cabe duda de que la valoración de estos metabolitos, productos de oxidación y/o antioxidantes, puede contribuir a mejorar las intervenciones terapéuticas y a conocer mejor la fisiopatología de las enfermedades degenerativas (74).

Finalmente, y a modo de conclusión, proponemos que, si bien el estrés oxidativo representa una herramienta útil para profundizar en la patogenia de los cuadros degenerativos, el potencial de sus metabolitos relacionados como marcadores clínicos, así como la eficacia terapéutica

de los antioxidantes requiere y obliga a la investigación continuada en este campo científico, abierto a múltiples aproximaciones y posibilidades experimentales.

AGRADECIMIENTOS

A las ayudas recibidas e Instituciones: INIA VIN00-027-C3-3; Instituto de Salud Carlos III, FIS 00/0621, FIS 01/0069; Red de Centro RCMN C03/08; Redes Temáticas G03/160 y C03/01. Grupos de la Consellería de Educación de la Generalitat Valenciana. Concedida a Guillermo Sáez Tormo como Director de Grupo en Estrés Oxidativo. Año 2005/05.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) FRIDOWICH, I. (1978): The biology of oxygen radicals. *Science* **201**, 875-880.
- (2) AMES, B.N.; SAUL, R.L.; SCHWIERS, E.; ADELMAN, R., and CATHCART, R. (1985): Oxidative DNA damage as related to cancer and aging: The assay of thymine glycol, thymidine glycol, and hydroxymethyluracil in human and rat urine. In: *Molecular Biology of Aging: Gene stability and gene expression* (Sohal, R.A., Birnbaum, L.S. and Cutler, R.G. eds) pp. 137-144. New York, Raven Press.
- (3) HALLIWELL, B. and GUTTERIDGE, J.M.C. (1989): *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press. New York.
- (4) CADENAS, E. (1989): Biochemistry of oxygen toxicity. *Ann. Rev. Biochem.* **58**, 79-110.
- (5) SÁEZ, G.T.; BANNISTER, W. and BANNISTER, J.V. (1990): Free radicals and thiol compounds. The role of glutathione against free radical toxicity. In: *CRC handbook of physiological functions of glutathione*. (Viña, J. ed.) CRC Press Inc. Florida. pp. 237-254.
- (6) FRENKEL, K. (1992): Carcinogen-mediated oxidant formation and oxidative DNA damage. *Pharmac. Ther.* **53**, 127-166.
- (7) BARJA, G. Radicales libres y antioxidantes. En: *Bioquímica y Fisiopatología del Estrés Oxidativo* (María Cascales Angosto, ed. Fundación José Casares Gil), *Real Academia de Farmacia*. Monografía IV, pp. 21-44.
- (8) CERUTTI, P. (1985): Prooxidant states and tumor promotion. *Science* **227**, 375-380.
- (9) PARADOWDKI, R.J. (1995): Linus Pauling. A commemoration of his life and work. In: *Health and orange*. Generalitat Valenciana and FVEA ISB 84-482-1185-5, pp. 3-12.

- (10) WEITZEL, F.; URSINI, F. and WENDEL, A. (1990): Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in various mouse organs during selenium deficiency and repletion. *Biochem. Biophys. Acta* **1036**, 89-94.
- (11) SZENT-GYORDYI, A. (1928): Observations on the function of peroxidase system and the chemistry of the adrenal cortex. *Biochem. J.* **22**, 1387-1409.
- (12) ROSE, R.C. and BODE, A.M. (1993): Biology of free radical scavenger: an evaluation of ascorbate. *FASEB J.* **7**, 1135-1142.
- (13) BLOCK, G.; PATTERSON, B. and SUBAR, A. (1992): Fruit, vegetables, and cancer prevention: A review of the epidemiological evidence. *Nutrition and Cancer* **18**, 1-29.
- (14) MECOCCHI, P.; POLIDORI, M.C.; TROYANO, L.; CHERBUNI, A.; CECCHETTI, R.; PINI, G.; STRAATMAN, M.; MONTI, D.; STAHL, W.; SIES, H.; FRANCESCHI, C., and SENIN, U. (2000): Plasma antioxidants and longevity: A study on healthy centenarians. *Free Rad. Biolo. Med.* **28**, 1243-1248.
- (15) KRINSKI, N.I. (1993): Actions of carotenoids in biological systems. *Annu. Rev. Nutr.* **13**, 561-587.
- (16) KRINSKY, N.I. (1993): Micronutrients and their influence on mutagenicity and malignant transformation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **686**, 229-235.
- (17) SÁEZ, G.T.; VALLS, V.; MUÑIZ, P.; PÉREZ-BROSETA, C.; IRADI, A.; OLIVA, M.R.; BANNISTER, J.V. and BANNISTER, W. (1993): The role of glutathione in protection against DNA damage induced by rifamycin SV and Koper(II) ions. *Free Rad. Res.* **19**, 81-92.
- (18) MUÑIZ, P.; VALLS, P.; PÉREZ-BROSETA, C.; IRADI, A.; OLIVA, M.R.; CLIMENT, J. and SÁEZ G.T. (1995): The role of 8-oH-2'-deoxyguanosine in rifamycin SV induced DNA damage *Free Rad. Biol. Med.* **18**, 747-755.
- (19) MEISTER, A. (1994): Glutathione-ascorbic acid antioxidant system in animal. *J. Biol. Chem.* **269**, 9397-9400.
- (20) REITER, R.J. (1995): Oxygen radical detoxification processes during aging: the functional importance of melatonin. *Aging Clin Exp. Res.* **7**, 340-351.
- (21) SIES, H. (1986): Biochemistry of oxidative stress. *Ang. Chem. Int.* **25**, 1058-1071.
- (22) MIQUEL, J.; ECÓNOMOS, A.C.; FLEMING, J.E. and JONSON, J.E. (1980): Mitochondrial role in cell aging. *Exp. Gerontol* **15**, 575-591.
- (23) TURNES, J.F. and BOVERIS, A. (1980): Generation of superoxide by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria. *Biochem. J.* **191**, 421-427.
- (24) LEE, C.K.; KLOPP, R.G.; WEINDRUCH, R., PROLLA, T.A. (1999): Gene expression profile of aging and its retardation by caloric restriction. *Science* **285**, 1390-1393.
- (25) KIM, H.J.; JUNG, K.J.; YU, B.P.; CHO, C.G.; CHOID, J.S. and CHUNG, H.Y. (2002): Modulation of redox-sensitive transcription factors by calorie restriction during aging. *Mech. Aging and Develp.* **123**, 1589-1595.
- (26) ROSENBERG, R.N. (2000): The molecular and genetic basis of Alzheimer's disease: the end of the beginning. *Neurology* **54**, 2045-2054.

- (27) KRUGER, R.; JUN, W.; MULLAR, T.; WOITALLA, D.; GRAEBER, M.; KOSEL, S.; PRZUNTEK, H.; EPPLEN, J.T.; SCHOLS L. and RIESS, O. (1998): Ala30 - Pro mutation in the gene encoding alpha synuclein in Parkinson disease. *Natl. Genet.* **18**, 106-108.
- (28) MIGLIORI, L. and COPPEDÈ, F. (2002): Genetic and environmental factors in cancer and neurodegenerative diseases. *Mut. Res.* **512**, 135-153.
- (29) BOSTICK, R.M.; POTTER, J.D.; MCKENZIE, R.R.; SELLERS, T.A.; KUSHI, I.H.; STEINMETZ, K.A. and BOLSOM, A.R. (1993): Reduced risk of colon cancer with high intake of vitamin E: The Iowa Women's Health Study. *Cancer Res.* **53**, 4230-4237.
- (30) KUCHINO, Y.; MORI, F.; KASAI, H.; INOUE, H.; IWAI, S.; MIURA, K.; OHTSUKA, E. and NISHIMURA, S. (1987): Misreading of DNA templates containing 8-hydroxy-doxyguanosine at the modified base and at adjacent residues. *Nature* **327**, 77-79.
- (31) SHIBUTANI, S.; TAKESHITA, M. and GROLLMAN, A.P. (1991): Insertion of specific bases during DNA synthesis past the oxidation-damaged bases 8-oxo-dG. *Nature* **349**, 431-434.
- (32) KOUCHAKDJIAN, M.; BODEPUDI, V., SHIBUTANI, S., et al. (1991): NMR structural studies of the ionizing radiation adduct 7-hydro-8-oxodeoxyguanosine (8-oxo-7H-dG) opposite deoxyadenosine in a DNA duplex, 8-oxo-7H-dG(syn)-dA(anti) alignment at lesion site. *Biochem.* **30**, 1403-1412.
- (33) KASAI, H. and NISHIMURA, S. (1986): Hydroxylation of guanine in nucleosides and DNA at the C-8 position by heated glucose and oxygen radical-forming agents. *Environ. Health Perspect.* **67**, 111-116.
- (34) GARCÍA-ESPAÑA, A.; KAHN, J.M.; SÁEZ, G. and PELLICER, A. (1996): Mutagenic effects of tumorigenic neutron radiation. *Int. J. Cancer* **65**, 677-681.
- (35) GUYTON, K.Z. and KENSLER, T.W. (1993): Oxidative mechanisms in carcinogenesis. In: *Free Radical in Medicine*. The British Council, pp. 523-543.
- (36) OLIVA, M.R.; MUÑIZ, P.; VALLS, V.; IRDADI, A.; CATALÁ, M.D.; CAÑETE-NICOLÁS, C.; DREHMER, E., y SÁEZ, G.T. (1997): En: *Bioquímica y Fisiopatología del Estrés Oxidativo* (María Cascales Angosto, ed. Fundación José Casares Gil), Real Academia de Farmacia. Monografía IV, pp. 127-156.
- (37) BREIMER, L.H. (1990): Molecular mechanisms of oxygen radical carcinogenesis and mutagenesis: The role of DNA base damage. *Molecular Carcinogen.* **3**, 188-197.
- (38) FLOYD, R.A. (1990): The role of 8-hydroxyguanine in carcinogenesis. *Carcinogenesis* **11**, 1447-1450.
- (39) SIMIC, M.G. (1994): DNA markers of oxidative processes in vivo: Relevance to carcinogenesis and anticarcinogenesis. *Cancer Res.* **54**, 1918s-1923s.
- (40) SZATROWSKI, T.P. and NATHAN, C.F. (1991): Production of large amounts of hydrogen peroxide by human tumor cells. *Cancer Res.* **51**, 794-798.
- (41) SUN, Y. (1990): Free radicals, antioxidant enzymes and carcinogenesis. *Free Rad. Biol. Med.* **8**, 583-599.

- (42) OLIVA, M.R.; RIPOLL, F.; MUÑIZ, P.; IRADI, A.; TRULLENQUE, R.; VALLS, V.; DREHMER, E. and SÁEZ, G.T. (1997): Genetic alterations and oxidative metabolism in sporadic colorectal tumors from a Spanish community. *Molecular Carcinogen.* **18**, 232-243.
- (43) FEIG, D.I.; REID, T.M. and LOEB, L.A. (1994): Reactive oxygen species in tumorigenesis. *Cancer Res.* **54**, 1890s-1894s.
- (44) OLTRA, A.M.; CARBONELL, F.; TORMOS, C.; IRADI, A., and GUILLERMO, T. SÁEZ (2001): Antioxidant enzyme activities and the production of MDA and 8-oxo-dG in chronic lymphocytic leukemia. *Free Rad. Biol. Med.* **30**, 1286-1292.
- (45) SÁNCHEZ, M.; TORRES, J.V.; TORMOS, C.; IRADI, A.; OLIVA, M.R.; MUÑIZ, P. and SÁEZ, G.T. (2005): Impairment of antioxidant enzymes, lipid peroxidation and 8-oxo.2'-deoxyguanosine in advanced epithelial ovarian carcinoma of a spanish community. *Cancer lett.* (in press).
- (46) WEINBRENNER, T.; FITO, M.; DE LA TORRE, R.; RIJEN, P.; SÁEZ, G.T.; TORMOS, C.; FARRÉ ALBADALEJO, M.; SCHRÖDER, H.; MARRUGAT, J. and COVAS, M.I. (2004): Olive oil high in phenolic compounds modulate oxidative/antioxidant status at postprandial state in men. *J. Nutr.* **134**, 2314-2321.
- (47) WEINBRENNER, T.; FITO, M.; DE LA TORRE, R.; SÁEZ, G.T.; TORMOS, M.; COOLEN, S.; FARRÉ ALBADALEJO, M.; SCHRÖDER, H.; MARRUGAT, J. and COVAS, M.I. (2004): Bioavailability of phenolic compounds from olive oil and oxidative/antioxidant status at postprandial state in healthy humans.
- (48) WU, L. and JOURLINK, B.H. (2002): Increased methylglyoxal and oxidative stress in hypertensive rat vascular smooth muscle. *Hypertension* **39**, 809-814.
- (49) LERMAN, L.O.; NATH, K.A.; RODRÍGUEZ-PORCEL, M.; KRIER, J.D.; SCHWARTZ, R.S.; NAPOLI, C. and ROMERO, J.C. (2001): Increased oxidative stress in experimental renovascular hypertension. *Hypertension* **37**, 541-546.
- (50) TROLLIET, M.R.; RUDD, M.A. and LOSCALZO, J. (2001): Oxidative stress and renal dysfunction in salt-sensitive hypertension. *Kidney Blood Press Res.* **24**, 116-123.
- (51) DOBRIAN, A.D.; DAVIES, M.J.; SCHRIVER, S.D.; LAUTERIO, T.J. and PREWITT, R.L. (2001): Oxidative stress in a rat model of obesity-induced hypertension. *Hypertension* **37**, 554-560.
- (52) NAKAZONO, K.; WATANABE, N.; MATSUNO, K.; SASAKI, J.; SATO, T. and Inoue, M. (1991): Does superoxide underly the pathogenesis of hypertension? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 10045-10048.
- (53) ROMERO, J.C. and RECKELHOFF, J.F. (1999): Role of angiotensin and oxidative stress in essential hypertension. *Hypertension* **34**, 943-949.
- (54) RAIJ, L. (1998): Nitric oxide in hipertensión: relationship with renal injury and left ventricular hypertrophy. *Hypertension* **31**, 189-193.
- (55) MCINTYRE, M.; BOHR, D.F. and DOMINIEZAK, A.F. (1999): Endotelial function in hipertensión: the role of superoxide anion. *Hypertension* **34**, 539-545.
- (56) ORIE, N.N.; SIDEC, W. and TEPEL, M. (1999): Reactive oxygen species in essential hipertensión. *Am. J.m Hypertens.* **12**, 1169-1174.

- (57) YASUMARI, K.; MAEDA, K.; NAKAMURA, M. and YOSHIKAWA, J. (2002): Oxidative stress in leukocytes is a possible link between blood pressure, blood glucose, and C-reactive protein. *Hypertension* **39**, 777-780.
- (58) STEIMBERG, D., WITZTUM, J.L. (2002): Is the oxidative modification hypothesis relevant to human atherosclerosis? *Circulation* **105**, 2107-2111.
- (59) REDÓN, J.; OLIVA, M.R.; TORMOS, C.; GINER, V.; CHAVES, J.; IRADI, A. and SÁEZ, G.T. (2003): Antioxidant activities and oxidative stress byproducts in human hypertension. *Hypertension* **41**, 1096-1101.
- (60) SÁEZ, G.T.; TORMOS, C.; GINER, V.; CHAVES, J.; LOZANO, J.V.; IRADI, A. and REDÓN, J. (2004): The impact of antihypertensive treatment in antioxidant activities and oxidative stress byproducts in human hypertension. *Am. J. Hyperten.* **17**, 809-815.
- (61) GINER V.; TROMOS, C.; LOZANO, J.V.; CHAVES, J.; IRADI, A.; SÁEZ, G.T. and REDÓN, J. (2004): Microalbuminuria and oxidative stress in essential hypertension. *J. Int. Med.* **255**: 588-594.
- (62) BLANKENBERG, S.; RUPPRECHT, H.J.; BICKEL, CH.; TORZEWSKI, M.; HAFNER, G.; TIRET, L.; SMIEJA, M.; CAMBIEN, F.; MEYER, J. and LACKNER, K.J. (2003): Glutathione peroxidase 1 activity and cardiovascular events in patients with coronary artery disease. *N. Engl. J. Med.* **349**: 1605-1613.
- (63) SOKOL, R.J.; DEVEREAUX, M.W. and KHANDWALA, R. (1998): Effect of oxypurinol, a xanthine oxidase inhibitor, on hepatic injury in the bile duct-ligated rat. *Pediatr. Res.* **44**: 397-401.
- (64) SINGH, S.; SHACKLETON, G.; AH-SING, E.; CHAKRABORTY, J. and BAILEY, M.E. (1992): Antioxidant defenses in the bile duct-ligated rat. *Gastroenterology* **103**: 1625-1629.
- (65) SERVIDDO, G.; PEREDA, J.; PALLARDO, F.V.; CARRETERO, J.; BORRAS, C.; CUTRIN, J.; VENDEMIALE, G.; POLI, G.; VIÑA, J. and SASTRE, J. (2004): Ursodeoxycholic acid protects against secondary biliary cirrhosis in rats by preventing mitochondrial oxidative stress. *Hepatology* **39**: 711-720.
- (66) MIÑANA, J.B.; GÓMEZ-CAMBRONERO, L.; LLORET, A.; PALLARDÓ, F.; DEL OLMO, J.; ESCUDERO, A.; RODRIGO, J.M.; PELLÍN, A.; VIÑA, J.R.; VIÑA, J. and SASTRE, J. (2002): Mitochondrial oxidative stress and CD95 ligand: A dual mechanism for hepatocyte apoptosis in chronic alcoholism. *Hepatology* **35**: 1205-1214.
- (67) SWEIRY, J.H. and MANN, G.E. (1996): Role of oxidative stress in the pathogenesis of acute pancreatitis. *Scand. J. Gastroenterol Suppl.* **219**: 10-15.
- (68) GÓMEZ-CAMBRONERO, L.; CAMPS, B.; GARCÍA DE LA ASUNCIÓN, J.; CERDÁ, M.; PELLÍN, A.; PALLARDÓ, F.; CALVETE, J.; SWEIRY, J.H.; MANN, G.E.; VIÑA, J. and SASTRE, J. (2000): Pentoxifylline ameliorates cerulein-induced pancreatitis in rats: Role of glutathione and nitric oxide. *J. Pharm. Exp. Ther.* **293**: 670-676.
- (69) REODERER, M.; ELA, S.W.; STAAL, F.J.; HERZENBERG, L.A. and HERZENBERG, L.A. (1992): N-acetylcysteine: a new approach to anti-HIV therapy. *AIDS Res. Hum. Retroviruses.* **8** (2): 209-217.

- (70) REPETTO, M.; REIDES, C.; GÓMEZ CARRETERO, M.L.; COSTA, M.; GRIEMBERG, G. and LLESUY, S. (1996): Oxidative stress in blood of HIV infected patients. *Clin. Chim. Acta* **255**: 107-117.
- (71) MALORNI, W.; RIVABENE, R.; LUCÍA, B.M.; FERRARA, R.; MAZZONE, A.M.; CAUDA, R. and PAGANELLI, U. (1998): The role of oxidative imbalance in progression to AIDS: effect of the thiol supplier N-actylcysteine. *AIDS Res. Human. Retroviruses*. **14** (17): 1589-1596.
- (72) FAVIER, A.; SAPPEY, C.; LECLERC, P.; FAURE, P. and MICOUD, M. (1994): Antioxidant status and lipid peroxidation in patients infected with HIV. *Chem. Biol. Interact.* **912**: 165-180.
- (73) GUTTERIDGE, J.M. and MITCHELL, J. (1999): Redox imbalance in the critically ill. *Br. Med. Bull.* **55** (1): 49-75.
- (74) ROTH, E.; MANHART, N. and WESSNER, B. (2004): Assessing the antioxidative status in critically ill patients. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* **7** (2): 161-168.