

Bioquímia

Volumen 29
Volume 29

Número 3
Number 3

Julio-Septiembre 2004
July-September 2004

Artículo:

Propuesta de un constructo para evaluar integralmente el estrés oxidativo

Derechos reservados, Copyright © 2004:
Asociación Mexicana de Bioquímica Clínica, AC

Otras secciones de este sitio:

- ☞ Índice de este número
- ☞ Más revistas
- ☞ Búsqueda

Others sections in this web site:

- ☞ *Contents of this number*
- ☞ *More journals*
- ☞ *Search*



Medigraphic.com

Propuesta de un constructo para evaluar integralmente el estrés oxidativo

Martha A. Sánchez-Rodríguez,* Edelmiro Santiago-Osorio,** Luis Alberto Vargas,***
Víctor Manuel Mendoza-Núñez*

RESUMEN

El desequilibrio bioquímico propiciado por la producción excesiva de especies oxidantes que provocan daño oxidativo a las biomoléculas y que no puede ser contrarrestado por los sistemas antioxidantes se denomina estrés oxidativo (EOx), el cual se ha relacionado con el envejecimiento y más de 100 padecimientos, sin embargo en la literatura científica no encontramos una definición operativa que contemple los biomarcadores implicados en el proceso de manera integral, generando confusiones y problemas de interpretación teórica. Por tal motivo, la finalidad del presente artículo es fundamentar de manera teórica la propuesta de un constructo integral y dinámico que considere tanto la concentración de biomoléculas oxidadas como los componentes del sistema antioxidante intracelular y extracelular. En el constructo se propone la medición integral y dinámica del EOX a través de la evaluación de la eficiencia del sistema antioxidante, estableciendo las categorías de: a) sistema antioxidante eficiente (SAE) cuando se contrarresta de manera eficaz la acción nociva de los RL; b) deficiencia antioxidante enzimática (DAEN) si se genera EOX por acción ineficaz o insuficiente de las enzimas antioxidantes; c) deficiencia antioxidante exógena (DAEX) cuando hay una acción insuficiente o ineficaz de las moléculas antioxidantes de origen exógeno con relación a la acción nociva de los RL y d) deficiencia global del sistema antioxidante (DGSA) si los componentes antioxidantes endógenos y exógenos muestran un desequilibrio con relación a los RL. Esta propuesta es una alternativa para la evaluación e interpretación integral del EOX.

Palabras clave: Estrés oxidativo, sistema antioxidante, radicales libres, constructo.

ABSTRACT

Oxidative stress (OxS) is a serious imbalance between the overproduction of free radicals (FR) and the effective action of the antioxidant system that produce oxidative damage to the biomolecules. This OxS has been associated with the aging process and more than a hundred different diseases. However, there is not an operative definition that includes all biomarkers implied in this process integrally, giving as result confusion and theoretical misinterpretations. The objective of this paper is to theoretically fundamental the proposal of an integral and dynamic construct that considers the concentration of oxidized biomolecules and the components of the antioxidant (intracellular and extracellular) systems. In this construct we propose the integral measurement of OxS through the evaluation of the efficiency the antioxidant system, and the establishment of categories for: a) the efficient antioxidant system (EAS) when it neutralize the harmful action of FR; b) antioxidant enzymatic deficiency (AEDN) if it generates OxS due to inefficient or insufficient action of antioxidant enzymes; c) antioxidant exogenous deficiency (AEXD) when the antioxidant biomolecules from exogenous source are not capable to neutralize FR; and d) antioxidant system global deficiency (ASGD) if the antioxidant endogenous and exogenous molecules show an unbalance in favor of FR. This is an alternative proposal for the evaluation and interpretation of OxS in an integral fashion.

Key words: Oxidative stress, antioxidant system, free radicals, construct.

* Unidad de Investigación en Gerontología, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Becaria CONACYT registro No. 126123 y DGAPA, UNAM.

** Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM.

*** Instituto de Investigaciones Antropológicas, UNAM.

Correspondencia:

M. en C. Martha A. Sánchez-Rodríguez. Nicolás San Juan No. 9-101, Col. Piedad Narvarte, C.P. 03000, México D.F., México. Fax: (+ 5255) 5773-6330. E-mail: masanrod@yahoo.com.mx

Recibido: 18-05-2004

Aceptado: 17-07-2004

INTRODUCCIÓN

La palabra constructo es un término ampliamente utilizado en el campo de las ciencias psicosociales, y cada vez más empleado en el campo de las ciencias de la salud, el cual se refiere a una serie de conceptos teóricos que se relacionan entre sí para conformar una entidad única que sirva como medición de un fenómeno, como es el caso de un índice que permita evaluar la severidad de una enfermedad o el grado de incapacidad funcional.^{1,2} Específicamente con relación al estrés oxidativo (EOx), en la literatura científica no encontramos una definición operativa que contemple los biomarcadores implicados en el proceso de manera integral, por lo que es necesario proponer un constructo sobre la base de sus mediciones, partiendo de que un biomarcador de efecto permite una valoración de las respuestas adversas tempranas o tardías, de un tóxico u otro factor en los sistemas fisiológicos, órganos u organismos y cuyo primer propósito es la identificación de individuos o poblaciones con riesgo de padecer efectos adversos para su salud y así tomar las medidas preventivas pertinentes.³

En la actualidad se ha relacionado el EOX con el envejecimiento y más de 100 padecimientos, ya que las especies reactivas (ER) y los radicales libres (RL) favorecen la presencia o las complicaciones de enfermedades como: ateroesclerosis, diabetes mellitus, procesos inflamatorios, el proceso isquemia/reperfusión, enfermedad de Alzheimer, y diversos tipos de cáncer, entre otros; constituyendo así uno de los mecanismos fisiopatológicos más importantes para explicar dichos procesos morbosos.⁴⁻⁸

Con relación al envejecimiento, hay evidencias científicas en el campo de la biogerontología con respecto a que el EOX se incrementa conforme aumenta la edad,⁹⁻¹¹ sin embargo, existen estudios que se contraponen a esta afirmación y en los cuales se ha observado que la actividad antioxidante se incrementa en los sujetos mayores de 70 años,¹²⁻¹⁴ así mismo se ha reportado una falta de correlación entre la acumulación del daño oxidativo y el envejecimiento;¹⁵ por lo que la validez de la hipótesis del estrés oxidativo durante el envejecimiento podría ser cuestionada, partiendo de que el análisis del proceso del EOX se realiza de manera parcial ya que no considera todos los elementos involucrados, generando confusiones y problemas de interpretación teórica.

Por otro lado, en diversas investigaciones se ha señalado que una disminución en la actividad de las enzimas antioxidantes o en la capacidad antioxidante total no siempre indica una condición no deseable

si los niveles de especies oxidantes se encuentran en valores bajos aceptables, de ahí que se puede aseverar que si los componentes que conforman el sistema antioxidante están disminuidos, no siempre se debe a la insuficiencia del sistema antioxidante sino a que pueden estar actuando de manera eficiente contra las ER para evitar que se genere un desequilibrio a favor de estos últimos (EOx) y dañen a las células, o a que no son necesarios porque no hay compuestos oxidantes que degradar, ya que el proceso es dinámico y su eficiencia debe evaluarse considerando la cantidad de RL o el daño a las biomoléculas. Así mismo, una actividad antioxidante alta no siempre garantiza un efecto benéfico contra las moléculas oxidantes a pesar de ser el resultado de una adaptación al incremento en la formación de éstas, ya que bajo ciertas circunstancias se convierten en pro-oxidantes, como en el caso del síndrome de Down.^{10,16,17}

Por ello, es necesario contemplar no sólo el efecto de daño oxidativo y/o la disminución en los componentes antioxidantes, sino la eficiencia del sistema antioxidante, de ahí que la finalidad del presente artículo es fundamentar de manera teórica la propuesta de un constructo integral, dinámico, práctico y accesible a laboratorios clínicos, que considere tanto la concentración de biomoléculas oxidadas como los componentes del sistema antioxidante intracelular y extracelular.

CONCEPTO DE ESTRÉS OXIDATIVO

El EOX se define como el desequilibrio bioquímico propiciado por la producción excesiva de ER y RL que provocan daño oxidativo a las biomoléculas y que no puede ser contrarrestado por los sistemas antioxidantes (AOx),⁴ siendo los RL especies químicas que poseen en el último orbital un electrón no apareado, por lo que son capaces de extraer un electrón de las moléculas vecinas para completar su orbital, convirtiéndose en componentes altamente reactivos y oxidantes.^{5,18,19}

El oxígeno (O_2) contenido en el aire que normalmente respiramos es fundamental para la vida, sin embargo, muchas reacciones en las que participa el O_2 originan RL, de ahí que el oxígeno sea una molécula potencialmente tóxica. La reducción univalente de O_2 genera intermediarios reactivos en una serie de reacciones que involucran cuatro electrones, produciendo tres compuestos denominados especies reactivas de oxígeno (EROs): el anión superóxido ($O_2^{-\bullet}$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo

(OH^\bullet).^{5,18-20} El H_2O_2 no es un radical libre, pero cae en la categoría de EROs por ser un compuesto intermedio e importante en la bioquímica de los RL, ya que se descompone fácilmente en presencia de metales de transición (principalmente el Fe^{2+}) para producir el OH^\bullet .^{5,19} Además del O_2 , el nitrógeno también es capaz de formar RL como dos óxidos: óxido nítrico (NO^\bullet) y dióxido nítrico (NO_2^\bullet), conformando las llamadas especies reactivas del nitrógeno (ERNs).^{6,21} A su vez, los radicales OH^\bullet son capaces de reaccionar con las biomoléculas produciendo RL orgánicos menos reactivos, como los peroxilos (ROO^\bullet) y radicales tiol (RS^\bullet) y el O_2^\bullet y NO^\bullet reaccionan entre sí para formar peroxinitrilo (ONOO^\bullet), entre otros.^{5,19,21}

Para equilibrar la respuesta oxidante, el organismo vivo dispone de una serie de sistemas antioxidantes que contrarrestan la generación de RL. Un antioxidante es una entidad química que a bajas concentraciones, en comparación con el oxidante, retarda o previene la oxidación de un sustrato incluyendo lípidos, proteínas, hidratos de carbono y ADN.^{5,22} De éstos podemos destacar a las enzimas antioxidantes intracelulares superóxido dismutasa (SOD, EC 1.15.1.1), glutatión peroxidasa (GPx, EC 1.11.1.9) y catalasa (CAT, EC 1.11.1.6); así como diversos componentes plasmáticos como: glutatión oxidado y reducido, bilirrubina, ácido úrico y albúmina, además de las vitaminas antioxidantes A, C y E, los minerales selenio y zinc, y las hormonas, melatonina, dehidroepiandrosterona y estrógenos.^{14,22-24} En condiciones fisiológicas,

estos mecanismos de defensa mantienen una baja concentración de EROs en la célula y su actividad es muy precisamente regulada;²⁵ de aquí que el equilibrio entre la producción de ER y las defensas antioxidantes determina el grado de estrés oxidativo^{26,27} (Figura 1).

MEDICIÓN PARCIAL DEL ESTRÉS OXIDATIVO

Se han propuesto una gran variedad de marcadores biológicos para evaluar el estrés oxidativo, cuyos indicadores han sido desarrollados para determinar el daño mediado por RL o la generación de RL *in vivo*, dentro de los cuales se incluyen las mediciones de lípidos, proteínas y ADN oxidados. Estas técnicas son ampliamente aplicadas en la investigación clínica y epidemiológica.^{28,29}

De todas las biomoléculas que pueden ser atacadas por RL, los lípidos son probablemente los más susceptibles, específicamente los poli-insaturados que son fácilmente oxidables. El proceso de oxidación de los lípidos es llamado lipoperoxidación o peroxidación lipídica y los productos de estas reacciones se denominan lipoperoxidos (LPO). En este sentido, las membranas celulares son ricas en ácidos grasos poli-insaturados, de ahí que este proceso daña directamente la estructura de la membrana celular e indirectamente a otros componentes celulares por la producción de aldehídos reactivos.^{21,30}

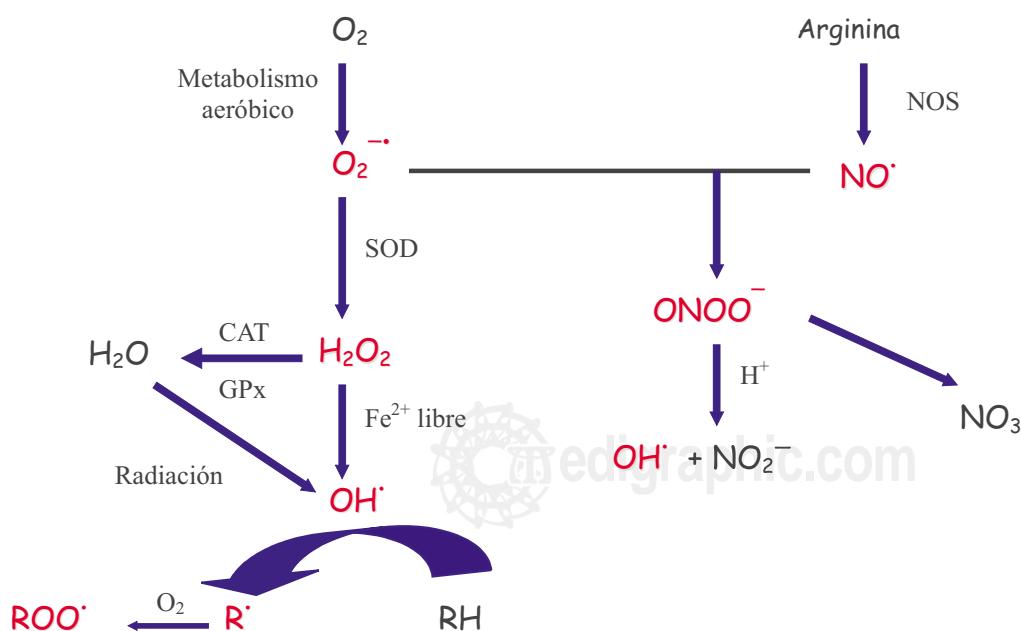


Figura 1. Formación intracelular de especies reactivas de oxígeno (EROs).

- O_2^\bullet = ión superóxido
- OH^\bullet = radical hidroxilo
- R^\bullet = radical peroxilo
- ROO^\bullet = radical peroxilo
- NO^\bullet = óxido nítrico
- ONOO^\bullet = peroxinitrilo
- SOD = superóxido dismutasa
- CAT = catalasa
- GPx = glutatión peroxidasa
- NOS = óxido nítrico sintetasa.

Modificado de: Pierrefiche G y Laborit H, 1995.¹³

La peroxidación lipídica es probablemente el proceso inducido por RL más extensamente investigado. Los LPO son compuestos inestables que tienden a degradarse rápidamente en una variedad de productos que incluyen: dienos conjugados, alcanos (etano y pentano), productos aldehídicos (malondialdehído, n-aldehídos y aldehídos α,β -insaturados) e isoprostanos; todos ellos medibles por procedimientos que van desde los espectrofotométricos hasta la cromatografía de alta resolución (HPLC) o de gases (CG).^{3,31}

El procedimiento más comúnmente utilizado en los tejidos y fluidos humanos es la medición del malondialdehído (MDA) acoplado a ácido tiobarbitúrico (TBA), cuyo resultado es un aducto cromogénico, llamado TBARS, que puede medirse espectrofotométricamente a 532 nm, por fluorescencia a 553 nm o por HPLC.^{3,29,32} Esta técnica, aunque con algunas limitaciones que han sido superadas,²⁹ es de baja complejidad y rapidez, por lo que se considera como el método de elección en estudios epidemiológicos.^{29,33}

Así mismo, el ADN no está exento del proceso oxidativo, tanto el nuclear como el mitocondrial.²¹ Al respecto Ames y cols. (1993)³⁴ estimaron que una célula humana recibe 10,000 impactos oxidativos en el ADN/día producidos por OH[·], es decir, de cada 10¹² moléculas de oxígeno que entran a la célula/día, es posible que 1 en 200 dañen al ADN.³⁵ Las EROs pueden causar entrecruzamiento de proteínas-ADN, intercambio de cromátidas hermanas, daño a la estructura de la desoxirribosa-fosfato y oxidación de las cuatro bases nitrogenadas.^{3,35,36} Las modificaciones oxidativas en las bases producen mutaciones, mientras que la oxidación de la desoxirribosa puede inducir liberación de bases y rompimiento de cadena sencilla en las hebras de ADN.^{3,37} La reactividad del OH[·] hacia la desoxirribosa varía considerablemente, siendo los carbonos 4 y 5 los más susceptibles,³⁷ la lesión predominantemente observada es el rompimiento de la hebra mediado por hierro y H₂O₂.³⁸

La medición del daño oxidativo al ADN puede ser a través de la presencia de los productos de oxidación de la guanosina: 8-hidroxiguanosina (8OHG) y su nucleótido 8-hidroxi-2-desoxiguanosina (8OHdG) por técnicas de HPLC, CG y ELISA.³⁹⁻⁴¹ Otra manera de evaluar el daño al ADN es por medio de la electroforesis unicelular alcalina en gel o ensayo cometa en linfocitos, método sensible semicuantitativo en donde se analiza el daño célula por célula.⁴²⁻⁴⁴ En los estudios epidemiológicos se utiliza con mayor frecuencia la medición de 8OHG y 8OHdG debido a que se realiza en orina, complementada con el ensayo cometa.³

El daño causado a las proteínas es un proceso irreversible, el cual puede incrementar el enrollamiento erróneo de las estructuras secundarias o la pérdida de la formación de las estructuras terciaria y cuaternaria. Esto es debido a que todos los residuos de aminoácidos son sujeto de ataque por OH[·], produciéndose una oxidación, formando las llamadas proteínas carboniladas y favoreciendo el entrecruzamiento entre proteínas o con otras biomoléculas como la glucosa (glucosilación). Estos cambios conformacionales pueden hacer a las proteínas más susceptibles de proteólisis, desnaturalización o producir pérdida de su actividad biológica.^{15,45,46}

Se han desarrollado varios métodos analíticos para la medición de proteínas carboniladas en tejidos, pero estos compuestos son muy lábiles, dificultando los procedimientos, de tal manera que se ha argumentado que otras modificaciones de las proteínas, tales como la hidroxilación aromática de fenilalanina y la conversión de tirosina a di-tirosina y nitro-tirosina, son mejores marcadores del estrés oxidativo, aunque se han utilizado principalmente en tejidos.^{3,15}

Por otro lado, se han propuesto como marcadores biológicos de EOx al sistema antioxidante a través de la medición de las enzimas SOD, GPx y CAT, además de componentes no enzimáticos como las vitaminas A, C y E, la concentración de selenio y zinc, el glutatión, la capacidad sérica antioxidante total (AT) y, recientemente el GAP o brecha antioxidant, este último definido como los antioxidantes diferentes de albúmina y ácido úrico, no medidos en las técnicas para la determinación de AT.^{15,47-50}

Para valorar los mecanismos antioxidantes intracelulares se utiliza tradicionalmente el seguimiento de la actividad de las enzimas antioxidantes SOD, GPx y CAT. Para la SOD se emplea con mayor frecuencia un método indirecto, en el cual se genera O₂^{·-} con la enzima xantina oxidasa (XO) a partir del susstrato xantina y la SOD compite con un colorante indicador (INT) por el O₂^{·-}. La acción de la GPx puede ser valorada de diferentes maneras, ya sea midiendo la liberación de glutatión oxidado (GSSG) o por acción de la enzima sobre un hidroperóxido orgánico en presencia de H₂O₂. Para la actividad de la CAT se sigue la reacción de descomposición del H₂O₂, por la pérdida de la absorción a 240 nm, o por la medición de la liberación de O₂ utilizando un electrodo de oxígeno.⁵¹

Las defensas antioxidantes extracelulares se miden a través de la denominada capacidad antioxidante total (AT), en la cual se considera la acción acumulativa de todos los antioxidantes presentes en el plasma y los fluidos corporales, siendo un parámetro

integrado, más bien que una simple suma de antioxidantes medidos.⁵² Las técnicas desarrolladas para medir la capacidad antioxidant total de las muestras biológicas valoran la habilidad de compuestos donantes de un H⁺ o un electrón para oxidar las especies introducidas en el sistema de ensayo, por lo que son clasificados como métodos de inhibición o indirectos del poder antioxidante total.^{16,53}

Otra forma de medir al sistema antioxidante es a través de la concentración de las vitaminas antioxidantes, los minerales selenio (Se) y zinc (Zn), el glutatión (GSH) y la razón glutatión reducido/oxidado (GSH/GSSG). Las vitaminas A y E pueden cuantificarse simultáneamente por HPLC empleando un detector de absorción ultravioleta-visible, permitiendo un análisis rápido.⁵⁴ Para la vitamina C se han desarrollado varios métodos, los sistemas de detección suelen basarse en una de las reacciones siguientes: oxidación del ascorbato a ácido deshidroascórbico, reducción del ácido deshidroascórbico a ascorbato o absorción ultravioleta (UV) del ascorbato o ácido deshidroascórbico; siendo el método de elección el HPLC por ser más preciso y exacto.⁵⁵ El Se y el Zn forman parte del sitio activo de las enzimas antioxidantes, Se de la GPx y Zn de la SOD;⁵¹ su cuantificación se lleva a cabo a través de absorción atómica e indica una medición indirecta de la cantidad de dichas enzimas.⁵⁶ Y en el caso del glutatión en sus dos formas el método indicado es HPLC, aunque los estudios en plasma han sido limitados por problemas técnicos asociados a las bajas concentraciones de GSH y su fácil oxidación.⁵⁷

Todas estas mediciones han sido utilizadas como biomarcadores aislados y de manera estática, interpretando el EOx como el incremento de las biomoléculas oxidadas o la disminución de los componentes antioxidantes intracelulares y/o extracelulares; sin tomar en cuenta que el EOx integra el efecto de la exposición a oxidantes acoplado con los mecanismos protectores antioxidantes *in vivo* de una manera dinámica. Dentro del dinamismo del balance oxidativo, podemos observar individuos con niveles de LPO y/o ADN oxidado elevados con una respuesta antioxidante aparentemente eficiente, así como sujetos sin altos niveles de moléculas oxidadas pero deficiente respuesta antioxidante, por lo que si se evalúan de manera independiente el sistema pro-oxidante y el antioxidante, se propician errores de interpretación teórica y limitaciones para su aplicación clínica. En este sentido, Amstad y cols. (1991)⁵⁸ demostraron, en líneas celulares transformadas de ratones, que el balance entre la actividad de SOD y CAT + GPx es más importante para determinar el efecto oxidativo que la

actividad absoluta de una sola enzima. Siguiendo esta propuesta, Remacle y cols. (1992)⁵⁹ desarrollaron un modelo teórico de interacción bioquímica entre estas tres enzimas observando que la razón SOD/GPx baja da una mejor protección contra el estrés oxidativo, debido a que la eficiencia de SOD es relativamente mayor por períodos cortos de estrés, los cuales principalmente afectan la división celular sin degeneración celular; además, que hay un nivel crítico de daño como resultado del balance entre la producción de RL y los sistemas de defensa, principalmente GPx y CAT. Es por ello que se habla de una cooperación aditiva y sinérgica entre estas tres enzimas ya que la protección entre SOD y GPx es aditiva y entre GPx y CAT es sinérgica.⁶⁰

Esta cooperación de defensas antioxidantes sigue una vía metabólica para la eliminación de las principales EROs del ambiente celular. En ésta, la SOD se encarga de dismutar al O₂⁻ abriendo un electrón para producir H₂O₂. El segundo paso es la reducción del H₂O₂ a agua por medio de GPx o CAT; pero en presencia de metales de transición, como el Fe²⁺, se cataliza la reducción del H₂O₂ a OH⁻ por medio de una reacción llamada de Fenton (*Figura 2*).^{26,27,60} Un desequilibrio entre el primer y segundo paso tiene el potencial resultado de incrementar los niveles de H₂O₂ y OH⁻ intracelular, provocando senescencia celular tanto en cultivos celulares como en eritrocitos humanos.^{10,61,62} Así mismo, la constante de velocidad de reacción de SOD es más alta que la de GPx (2 x 10⁹ y 5 x 10⁷, respectivamente), por lo que el H₂O₂ se forma rápidamente y no es eliminado en su totalidad; además, si lo que se tiene es una desproporción en la actividad entre SOD y GPx, a favor de la primera, se puede producir un incremento en la lipoperoxidación,⁶³ así como una razón SOD/GPx + CAT alterada puede afectar la expresión génica por modificación en los enlaces y/o disponibilidad en los factores de transcripción del ADN.⁶⁴ En este sentido, las razones SOD/GPx y SOD/GPx + CAT han sido propuestas como indicadores diagnósticos, pero sigue siendo una evaluación parcial al contemplar únicamente los sistemas enzimáticos,^{10,65} dejando a un lado los antioxidantes extracelulares no enzimáticos.

Con respecto a los antioxidantes extracelulares o exógenos, los principales antioxidantes (por masa y actividad) del plasma humano son la albúmina y el ácido úrico, los cuales conforman más del 50% de la actividad antioxidante total en la mayoría de las muestras. Se utiliza el término de actividad residual o brecha antioxidante (*antioxidant gap*) (GAP) como la actividad antioxidante de otros componentes plasmá-

ticos como: ácido ascórbico, α -tocoferol, bilirrubina, transferrina y otros antioxidantes no medidos, y puede ser calculada a partir de la capacidad plasmática antioxidant total, la concentración de albúmina y ácido úrico en la muestra de plasma, y el valor de los equivalentes de Trolox (TEAC) (un estándar antioxidante) para albúmina y ácido úrico, ya que está reportado que por los métodos de cuantificación de la AT no se determina la actividad antioxidant completa de ambas moléculas:⁶⁶

$$\text{GAP} = \text{AT} - (\text{[albúmina X TEAC]} + [\text{ácido úrico X TEAC}]).$$

Por lo tanto, el GAP refleja la actividad combinada de antioxidantes plasmáticos que no son albúmina y ácido úrico, proporcionando una interpretación de la capacidad antioxidant plasmática cuando no se han medido otros componentes.⁶⁶

En términos generales podemos señalar que los estudios sobre EOx miden parcialmente los marcadores biológicos involucrados en el proceso, sin embargo se establecen aseveraciones generalizadas respecto a la influencia del EOx sobre la etiología, fisiopatología y pronóstico de muchos padecimientos crónico-degenerativos, lo cual genera confusiones, resultados inconsistentes y contradictorios. Por tal motivo, es indispensable establecer propuestas que incluyan todos los parámetros existentes para medir un mecanismo bioquímico tan complejo como es el EOx y así evitar contradicciones y confusión.

PROPIUESTA PARA LA MEDICIÓN INTEGRAL DEL ESTRÉS OXIDATIVO

El constructo que se propone considera dos biomoléculas oxidadas (LPO y ADN) y los componentes de los sistemas antioxidant intracelulares y extracelulares, más fácilmente medibles en una muestra sanguínea, para poder hablar de EOx. Así mismo, contempla la eficiencia del sistema antioxidant en su totalidad junto con el efecto de las EROs en las biomoléculas, aproximándose así al establecimiento del estado oxidativo *in vivo*.

Como se mencionó anteriormente, el sistema antioxidant tiene más componentes y observándolo dinámicamente, consideramos los parámetros: razón SOD/GPx + CAT, AT y GAP para hablar del equilibrio en este sistema.

Cuando la acción entre las tres enzimas es sinérgica, la razón SOD/GPx + CAT estará baja y la tendencia de la reacción que las involucra es hacia la formación de agua, con baja generación de OH[·]; éste actúa a nivel celular y se difunde al líquido extracelular en

donde es amortiguado por altos niveles de AT y GAP. El resultado final es una baja oxidación del ADN y lipoperoxidación, tanto a nivel de membrana como extracelular. A esta condición la hemos denominado sistema antioxidant eficiente (SAE) (*Figura 2A*).

Cuando hay un desequilibrio en el sistema, puede existir una deficiencia antioxidant enzimática (DAEN) en donde la razón SOD/GPx + CAT se encuentra incrementada por baja actividad de GPx y/o CAT, generándose altos niveles de H₂O₂ y OH[·] que originan oxidación de las biomoléculas; el OH[·] en exceso pasa al líquido extracelular, y aunque AT y GAP se encuentren en niveles normales, son insuficientes para neutralizar el efecto oxidativo, dando como resultado un incremento en la lipoperoxidación (*Figura 2B*). También puede darse una deficiencia antioxidant exógena (DAEX), en cuyo caso los AT y GAP están disminuidos y la razón SOD/GPx + CAT se encuentran en rango normal con lo que se originan niveles de H₂O₂ y OH[·] normales; el OH[·] pasa al líquido extracelular, y por bajos niveles de AT y GAP se produce una acumulación de este radical, incrementando la lipoperoxidación exógena. A su vez, el OH[·] difunde nuevamente dentro de la célula originando una alta producción de LPO de la membrana y oxidación de ADN (*Figura 2C*). Finalmente, se habría de una deficiencia global del sistema antioxidant (DGSA) si los componentes de ambas partes están en desequilibrio. La razón SOD/GPx + CAT es alta, originando niveles de H₂O₂ y OH[·] elevados con la correspondiente oxidación intracelular; el OH[·] pasa al líquido extracelular, y por los bajos niveles de AT y GAP se produce una acumulación de este radical aumentando la lipoperoxidación, además de que difunde nuevamente dentro de la célula originando un incremento en la oxidación de las biomoléculas (*Figura 2D*).

Bajo este contexto, se habla de un EOx a diferentes niveles, donde la situación más severa o de mayor riesgo es tener una DGSA, ya que se propiciaría una mayor oxidación de biomoléculas.

Los puntos de corte de los marcadores bioquímicos para evaluar el EOx se obtuvieron de una población de adultos jóvenes sanos de 25–44 años sin exposición a factores pro-oxidantes ambientales y de estilo de vida, asumiendo el valor del percentil 90 (*Cuadro I*). Al respecto, es importante aclarar que de acuerdo con la teoría de los valores de referencia es indispensable obtener los puntos de corte específicos para la población en donde se aplicarán los parámetros, ya que los aspectos constitucionales, el estilo de vida y los factores ambientales influyen en ellos.^{67,68} Así mismo, se consideró el daño oxidativo al ADN medido a través de la técnica electroforesis unicelular alcalina utilizando el valor de

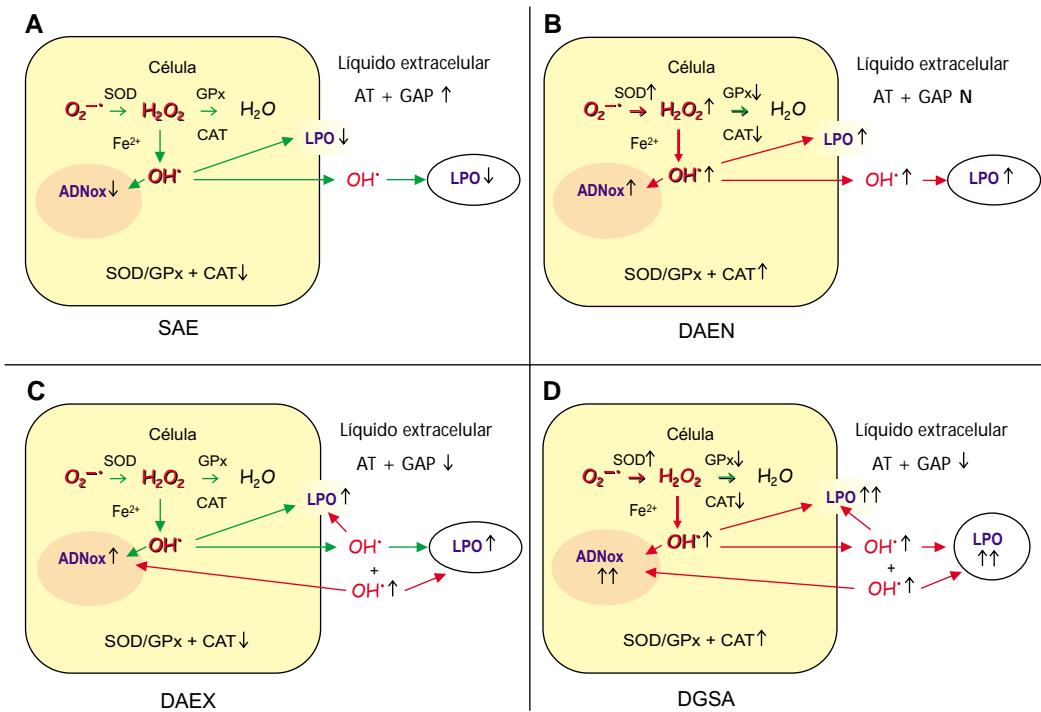


Figura 2. Dinámica del sistema antioxidante. **A.** Sistema antioxidante eficiente (SAE): la razón SOD/GPx + CAT se encuentra baja, con poca generación de OH[•]; el OH[•] pasa al líquido extracelular y es amortiguado por los altos niveles de AT y GAP, con baja producción de LPO y oxidación de ADN. **B.** Deficiencia antioxidante enzimática (DAEN): la razón SOD/GPx + CAT se encuentra incrementada, generándose altos niveles de H₂O₂ y OH[•]; el OH[•] en el líquido extracelular no es neutralizado por AT y GAP. **C.** Deficiencia antioxidante exógena (DAXE): la razón SOD/GPx + CAT se encuentra baja con niveles de H₂O₂ y OH[•] normales; los bajos niveles de AT y GAP producen acumulación de OH[•] en el líquido extracelular el cual difunde nuevamente dentro de la célula originando daño oxidativo. **D.** Deficiencia global del sistema antioxidante (DGSA): la razón SOD/GPx + CAT se encuentra alta con producción de H₂O₂ y OH[•] elevada; los bajos niveles de AT y GAP causan acumulación de OH[•] que difunde nuevamente dentro de la célula originando oxidación de biomoléculas.

O₂^{•-} = ión superóxido; OH[•] = radical hidroxilo; LPO = lipoperóxidos; ADNox = ADN oxidado; SOD = superóxido dismutasa; CAT = catalasa; GPx = glutatión peroxidasa; AT = capacidad antioxidante total; GAP = brecha antioxidante; ↓ = valores disminuidos; ↑ = valores incrementados; N = valores dentro de rango de referencia.

corte de $\geq 40\%$ de daño y/o ≥ 6 células con daño de acuerdo a los criterios de Anderson y cols. (1994).⁴²

En esta propuesta se incluyen la mayor parte de los componentes antioxidantes, tanto enzimáticos como no enzimáticos y una evaluación constituida de todos ellos, lo cual proporciona una mejor perspectiva del sistema antioxidante en los individuos, y por ende del estrés oxidativo, identificando si los parámetros mencionados se encuentran fuera de los valores de corte (*Cuadro II*). Al respecto, en un estudio exploratorio llevado a cabo por nuestro grupo de investigación se evaluó la utilidad del constructo en dos propuestas, una que incluye la razón SOD/GPx y otra en donde la razón empleada es SOD/GPx + CAT, encontrándose que esta última es más representativa del comportamiento antioxidante enzimático. Así mismo, se observó que el sistema antioxidante

mantiene su eficiencia contra la lipoperoxidación, con LPO prácticamente iguales con ambas propuestas, a excepción de aquellos casos en los que se presenta DGSA;

Cuadro I. Valores de corte para biomarcadores de estrés oxidativo obtenidos al percentil 90 de una población de adultos jóvenes de Actopan, Hgo.

Biomarcador	Valor de corte
Lipoperóxidos ($\mu\text{mol/L}$)	≥ 0.340
Superóxido dismutasa (U/L)	≤ 170
Glutatión peroxidasa (U/L)	$\leq 5,500$
SOD/GPx + CAT	≥ 0.014
Capacidad plasmática antioxidante total (mmol/L)	≤ 0.90
Brecha antioxidante ($\mu\text{mol/L}$)	≤ 190

Cuadro II. Interpretación de los marcadores de estrés oxidativo para una muestra sanguínea.

Estado oxidativo	SOD/GPx + CAT	AT (mmol/L)	GAP (μ mol/L)	LPO (μ mol/L)*	Daño ADN*
Sin estrés oxidativo	≤ 0.014	≥ 0.90	≥ 190	≤ 0.340	< 40% y/o < 6 cél.
Estrés oxidativo con DAEN	≥ 0.014	≥ 0.90	≥ 190	≥ 0.340	$\geq 40\%$ y/o ≥ 6 cél.
Estrés oxidativo con DAEX	≤ 0.014	≤ 0.90	≤ 190	≥ 0.340	$\geq 40\%$ y/o ≥ 6 cél.
Estrés oxidativo con DGSA	≥ 0.014	≤ 0.90	≤ 190	≥ 0.340	$\geq 40\%$ y/o ≥ 6 cél.

SOD = superóxido dismutasa; GPx = glutatión peroxidasa; CAT = catalasa; AT = capacidad antioxidante total; GAP = brecha antioxidante; LPO = lipoperóxidos.

* Dependiendo de la severidad del estrés oxidativo puede encontrarse sólo uno de los dos marcadores fuera de rango.

además de que si el sistema antioxidante es eficiente, los niveles de LPO se mantienen bajos,⁶⁹ demostrando que el constructo propuesto puede tener posibilidades de aplicación clínica y de investigación en el establecimiento del EOx. En este sentido, Lasheras y cols. (2002)⁷⁰ analizaron la posible interacción entre los diferentes antioxidantes liposolubles considerando la actividad enzimática antioxidante, reportando que hay un efecto sinérgico *in vivo* entre los componentes liposolubles y la actividad alta de la SOD eritrocitaria, concordante con lo observado en nuestro estudio.

Es necesario aclarar que una limitante del constructo es la falta de inclusión de las mediciones del daño oxidativo a proteínas, cuantificación de vitaminas antioxidantes A, C y E, minerales (Se, Zn), albúmina, transferrina, ácido úrico, bilirrubina y glutatión, entre otros elementos; no obstante, debemos considerar que en esta propuesta se mide el daño oxidativo a lípidos y al ADN, por lo que podemos inferir que el daño que ocurre en proteínas es proporcionalmente similar, así mismo a través de la evaluación de la actividad antioxidante total (AT) aunada al GAP medimos indirectamente la actividad antioxidante de las vitaminas, minerales, proteínas y demás elementos antioxidantes plasmáticos, por lo que se asume que el constructo se aproxima a la evaluación integral del EOx.

Finalmente es importante resaltar que los mecanismos moduladores del EOx en el ser humano son complejos e interactúan entre sí, es por ello que nuestro grupo de investigación pone a consideración de la comunidad científica esta propuesta para su análisis, discusión, y posible aplicación con el fin de disponer de un constructo práctico y accesible para la evaluación integral y dinámica del EOx.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por la Dirección General de Apoyo al Personal Académico proyecto PAPIIT IN-308302, Universidad Nacional Autónoma de México.

Al Dr. Mariano Zacarías Flores por la traducción del resumen al inglés.

REFERENCIAS

1. Feinstein AR. *Clinimetrics*. New Haven: Yale University Press; 1987. p. 49, 197.
2. Jenicek M. *Epidemiología. La lógica de la medicina moderna*. Barcelona: Masson; 1996. p. 106.
3. de Zwart LL, Merman JHN, Commandeur JNM, Vermeulen NPE. Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and in humans. *Free Radic Biol Med* 1999; 26: 202-226.
4. Harman D. Free radical theory of aging. *Mutat Res* 1992; 275: 257-266.
5. Halliwell B, Gutteridge JMC, Cross CE. Free radicals, antioxidants, and human disease: Where are we now? *J Lab Clin Med* 1992; 119: 598-620.
6. Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 2002; 82: 48-95.
7. Forsberg L, de Faire U, Morgenstern R. Oxidative stress, human genetic variation, and disease. *Arch Biochem Biophys* 2001; 389: 84-93.
8. Matés JM, Pérez-Gómez C, de Castro IN. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin Biochem* 1999; 32: 595-603.
9. Mecocci P, Fanò G, Fulie S, MacGarvey U, Shinobu L, Polidori MC, et al. Age-dependent increases in oxidative damage to DNA, lipids, and proteins in human skeletal muscle. *Free Radic Biol Med* 1999; 26: 303-308.
10. Muchová J, Sustrová M, Garajová I, Liptáková A, Blazícek P, Kvasnicka P, et al. Influence of age on activities of antioxidant enzymes and lipid peroxidation products in erythrocytes and neutrophils of Down syndrome patients. *Free Radic Biol Med* 2001; 31: 499-508.
11. Gil P, Fariñas F, Casado A, López-Fernández E. Malondialdehyde: a possible marker of ageing. *Gerontology* 2002; 48: 209-214.
12. King CM, Bristow-Craig HE, Gillespie ES, Barnett YA. *In vivo* antioxidant status, DNA damage, mutation and DNA repair capacity in cultured lymphocytes from healthy 75-to 80 years-old humans. *Mutat Res* 1997; 377: 137-147.
13. Paolisso G, Tagliamonte MR, Rizzo MR, Manzella D, Gambarella A, Varricchio M. Oxidative stress and advancing age: results in healthy centenarians. *J Am Geriatr Soc* 1998; 46: 833-838.
14. Mecocci P, Polidori MC, Troiano L, Cherubini A, Cecchetti R, Pini G, et al. Plasma antioxidants and longevity: a study on healthy centenarians. *Free Radic Biol Med* 2000; 28: 1243-1248.
15. Stadtman ER. Importance of individuality in oxidative stress and aging. *Free Radic Biol Med* 2002; 33: 597-604.

16. Niki E. Action of antioxidants against oxidative stress. In: Dizdaroglu M, Karataya AE [Eds]. *Advances in DNA damage and repair*. New York: Kluwer Academic/ Plenum Publishers; 1999. p. 313-318.
17. Prior RL, Cao G. *In vivo* total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods. *Free Radic Biol Med* 1999; 27: 1173-1181.
18. Halliwell B. Reactive oxygen species in living systems: source biochemistry, and role in human. *Am J Med* 1991; 91 (Suppl 3C): 14S-22S.
19. Chesseman KH, Slater TF. An introduction to free radical biochemistry. *Br Med Bull* 1993; 49: 481-493.
20. Gutteridge J. Free radicals and aging. *Rev Clin Gerontol* 1994; 4: 279-288.
21. Knight JA. Free radicals: their presence in biological systems. In: *Free radicals, antioxidants, aging, and disease*. Washington: AACC Press; 1999. p. 21-43.
22. Halliwell B. The definition and measurement of antioxidants in biological systems. [Letter] *Free Radic Biol Med* 1995; 18: 125-126.
23. Liehr JC, Roy D. Pro-oxidant and antioxidant effects of estrogens. In: Armstrong D [Ed]. *Free radical and antioxidant protocols*. New Jersey: Humana Press; 1998. p. 425-435.
24. Noguchi N, Niki E. Chemistry of active oxygen species and antioxidants. In: Papas AM. *Antioxidant status, diet, nutrition, and health*. New York: CRC Press; 1999. p. 3-20.
25. Harris ED. Regulation of antioxidant enzymes. *FASEB J* 1992; 6: 2675-2683.
26. Pierrefiche G, Laborit H. Oxygen free radicals, melatonin, and aging. *Exp Gerontol* 1995; 30: 213-227.
27. Finkel T, Holbrook NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 2000; 408: 239-247.
28. Mayne ST. Antioxidant nutrients and chronic disease: use of biomarkers of exposure and oxidative stress status in epidemiologic research. *J Nutr* 2003; 133: 933S-940S.
29. Meagher EA, Fitzgerald GA. Indices of lipid peroxidation *in vivo*: strengths and limitations. *Free Radic Biol Med* 2000; 28: 1745-1750.
30. Gutteridge JMC. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem* 1995; 41: 1819-1828.
31. Morrow JD, Roberts LJ. The isoprostanes: unique bioreactive products of lipid peroxidation. *Prog Lipid Res* 1997; 36: 1-21.
32. Moore K, Roberts II J. Measurement of lipid peroxidation. *Free Radic Res* 1998; 28: 659-671.
33. Block G, Dietrich M, Norkus EP, Morrow JD, Hudes M, Caan B, et al. Factors associated with oxidative stress in human populations. *Am J Epidemiol* 2002; 156: 274-285.
34. Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM. Oxidants, antioxidants, and degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 7915-7922.
35. Aust AE, Eveleigh JF. Mechanisms of DNA oxidation. *Proc Soc Exp Biol Med* 1999; 222: 246-252.
36. Sohal RS, Weindruch R. Oxidative stress, caloric restriction, and aging. *Science* 1996; 273: 59-63.
37. González-Torres MC, Betancourt-Rule M, Ortíz-Muñiz R. Daño oxidativo y antioxidantes. *Bioquímia* 2000; 25: 3-9.
38. Floyd RA, Carney JM. Free radical damage to protein and DNA: mechanisms involved and relevant observations on brain undergoing oxidative stress. *Ann Neurol* 1992; 32: S22-S27.
39. Podmore ID, Cooper D, Evans MD, Wood M, Lunec J. Simultaneous measurement of 8-oxo-2'-deoxyguanosine and 8-oxo-2'-deoxyadenosine by HPLC-MS/MS. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 277: 764-770.
40. Dizdaroglu M, Jaruga P, Birincioglu M, Rodriguez H. Free radical-induced damage to DNA: mechanisms and measurement. *Free Radic Biol Med* 2002; 32: 1102-1115.
41. European Standards Committee on Oxidative DNA Damage (ESCODD). Measurement of DNA oxidation in human cells by chromatographic and enzymic methods. *Free Radic Biol Med* 2003; 34: 1089-1099.
42. Anderson D, Yu T-W, Phillips BJ, Schmezer P. The effect of various antioxidants and other modifying agents on oxygen-radical-generated DNA damage in human lymphocytes in the COMET assay. *Mutat Res* 1994; 307: 261-271.
43. Valverde M, Ostrosky-Wegman P, Rojas E, Fortoul T, Meneses F, Ramírez M, et al. The application of single cell gel electrophoresis or comet assay to human monitoring studies. *Salud Pública Mex* 1999; 41 (Suppl): S109-S113.
44. Bowden RD, Buckwalter MR, McBride JF, Johnson DA, Murray BK, O'Neill KL. Tail profile: a more accurate system for analyzing DNA damage using the Comet assay. *Mutat Res* 2003; 537: 1-9.
45. Stadtman ER. Protein oxidation and aging. *Science* 1992; 257: 1220-1224.
46. Vilar-Rojas C, Guzmán-Grenfell AM, Hicks JJ. Participation of oxygen-free radicals in the oxide-reduction of proteins. *Arch Med Res* 1996; 27: 1-6.
47. Bhagwat VR. Relationship of erythrocyte superoxide dismutase, serum lipid peroxides and age. *Indian J Med Sci* 1997; 51: 45-51.
48. Ji LL, Dillon D, Wu E. Alteration of antioxidant enzymes with aging in rat skeletal muscle and liver. *Am J Physiol* 1990; 258(4 Pt 2): R918-23.
49. Mc Call MR, Frei B. Can antioxidant vitamins materially reduce oxidative damage in humans? *Free Radic Biol Med* 1999; 26: 1034-1053.
50. Miller NJ. Nonvitamins plasma antioxidant. In: Armstrong D [Ed]. *Methods in molecular biology*. New Jersey: Humana Press; 1998; 108: 285-297.
51. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free radicals in biology and medicine*. 2nd Ed. London: Oxford University Press; 1995. p. 86-276.
52. Ghiselli A, Serafini M, Natella F, Scaccini C. Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: critical view and experimental data. *Free Radic Biol Med* 2000; 29: 1106-1114.
53. Duthie GG. Determination of activity of antioxidants in human subjects. *Proc Nutr Soc* 1999; 58: 1015-1024.
54. Browne RW, Armstrong D. Simultaneous determination of serum retinol, tocopherols, and carotenoids by HPLC. In: Armstrong D [Ed]. *Free radical and antioxidant protocols*. New Jersey: Humana Press; 1998. p. 269-284.
55. Levine M, Rumsey S, Wang Y, Park J, Kwon O, Xu W, et al. Vitamina C. En Ziegler EE, Filer LJ. *Conocimientos actuales sobre nutrición*. 7^a Ed. Washington: OPS Publicación científica 565; 1997. p. 155-169.
56. Handelman GJ, Pryor WA. Evaluation of antioxidant status in humans. In: Papas AM. *Antioxidant status, diet, nutrition, and health*. Washington: CRC Press; 1999. p. 42-43.
57. Jones DP, Carlson JL, Mody VC, Cai J, Lynn MJ, Sternberg P. Redox state of glutathione in human plasma. *Free Radic Biol Med* 2000; 28: 625-635.
58. Amstad P, Peskin A, Shah G, Mirault ME, Moret R, Zbinden I, et al. The balance between Cu, Zn-superoxide dismutase and catalase affects the sensitivity of mouse epidermal cells to oxidative stress. *Biochemistry* 1991; 30: 9305-9313.
59. Remacle J, Lambert D, Raes M, Pigelet E, Michiels C, Toussaint O. Importance of various antioxidant enzymes for cell stability. *Biochem J* 1992; 286: 41-46.

60. Michiels C, Raes M, Toussaint O, Remacle J. Importance of Se-glutathione peroxidase, catalase, and Cu/Zn-SOD for cell survival against oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 1994; 17: 235-248.
61. Amstad P, Moret R, Cerutti P. Glutathione peroxidase compensates for the hypersensitivity of Cu, Zn-superoxide dismutase over-producers to oxidant stress. *J Biol Chem* 1994; 269: 1606-1609.
62. de Haan JB, Cristiano F, Iannello R, Bladier C, Keiner MJ, Kola I. Elevation in the ratio of Cu/Zn-superoxide dismutase to glutathione peroxidase activity induces features of cellular senescence and this effect is mediated by hydrogen peroxide. *Hum Mol Gen* 1996; 5: 283-292.
63. Cristiano F, de Haan JB, Iannello RC, Kola I. Changes in the levels of enzymes which modulate the antioxidant balance occur during aging and correlate with cellular damage. *Mech Ageing Dev* 1995; 80: 93-105.
64. de Haan JB, Cristiano F, Iannello RC, Kola I. Cu/Zn-superoxide dismutase and glutathione peroxidase during aging. *Biochem Mol Biol Int* 1995; 35: 1281-1297.
65. Gaeta LM, Tozzi G, Pastore A, Federici G, Bertini E, Piemonte F. Determination of superoxide dismutase and glutathione peroxidase activities in blood of healthy pediatric subjects. *Clin Chem Acta* 2002; 322: 117-120.
66. Miller NJ. Nonvitamin plasma antioxidants. In: Armstrong D. *Free radical and antioxidant protocols*. New Jersey: Humana Press; 1998. p. 285-297.
67. Castillo de Sánchez ML, Fonseca-Yerena ME [Editoras]. Fase postanalítica. En: *Mejoría continua de la calidad. Guía para los laboratorios clínicos de América Latina*. México: Médica Panamericana. 1995. p. 90-93.
68. Dybkar R, Solberg HE. Parte 6. Presentación de valores observados relacionados con los valores de referencia. *Acta Bioq Clin Latinoam* 1988; 22: 613-621.
69. Beristain-Pérez AS, Sánchez-Rodríguez MA, Ruiz-Ramos M, Mendoza-Núñez VM. ¿Cómo evaluar la eficiencia del sistema antioxidante en el estrés oxidativo? Propuesta de un constructo. *Archivo Geriátrico* 2003; 6: 100-104.
70. Lasheras C, Huerta JM, González S, Braña AF, Patterson AM, Fernández S. Independent and interactive association of blood antioxidants and oxidative damage in elderly people. *Free Radic Res* 2002; 36: 875-882.

