

LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE TOTAL. BASES Y APLICACIONES*

Martha Angélica Quintanar Escorza¹ y José Víctor Calderón Salinas²

RESUMEN

Los organismos han desarrollado sistemas de defensa antioxidante para hacer frente a la atmósfera oxidativa del planeta y al metabolismo oxidativo que permitió la evolución de la vida. Lo que permitió alcanzar eficientes sistemas amortiguadores antioxidantes que mantienen la capacidad de reducir a los radicales libres, las especies reactivas y los oxidantes endógenos y exógenos. Estos sistemas amortiguadores antioxidantes desembocan, se regeneran y se cargan de hidrógenos y electrones a través del sistema de glutatión-NADPH y de la reducción de NADP^+ a partir del metabolismo. De tal forma las enzimas antioxidantes, los cosustratos antioxidantes y los antioxidantes endógenos y exógenos generan barreras para conducir la reducción de los oxidantes y disminuir así su potencia oxidativa, con lo que se hace frente a la variedad de diversas especies y formas oxidativas capaces de agredir al organismo. Los sistemas antioxidantes se pueden medir de diferentes formas específicas y el sistema amortiguador antioxidante global se puede evaluar con las pruebas de capacidad antioxidante total. La mejora tecnológica e interpretativa de estos métodos ha permitido profundizar en el conocimiento básico de las formas de defensa de la célula, ha multiplicado los estudios de capacidad antioxidante desde sustancias puras hasta organismos complejos, sirviendo incluso para métodos diagnósticos y de evaluación de la efectividad de los tratamientos.

PALABRAS CLAVE: Radical libre, daño oxidativo, antioxidantes, oxidación, redox, estrés oxidativo.

ABSTRACT

Organisms have developed systems antioxidant defense systems to deal with the planet oxidative atmosphere and with the oxidative metabolism. These systems allowed evolution of life in this antioxidant defense to confront to the atmosphere oxidative of the planet and to the oxidative metabolism that allowed evolution of life in that atmosphere, reaching efficient buffer antioxidant systems that conserve capacity to reduce free radicals, reactive species and endogenous and exogenous oxidants. These buffer antioxidant systems lead into the system of glutatión-NADPH and with NADP^+ reduction from the metabolism, where regenerate and load hydrogens and electrons. Of such a form antioxidant enzymes, antioxidant cosubstrates and antioxidant endogenous and exogenous generate barriers to take the reduction of the oxidants and to diminish this way their oxidative power, with what there are confront the varieties of diverse species and oxidative forms capable of attacking to the organism. The antioxidant systems can measure up of different specific forms and the global buffer antioxidant system can measure up to the tests of total antioxidant capacity; the technical and interpretive improvement of these technologies allowed to profounder into the basic knowledge of the forms of defense of the cell, it has multiplied the studies of antioxidant capacity from pure substances up to complex organisms, serving even for diagnostic methods and evaluation of the efficiency of treatments.

KEY WORDS: Free radical, oxidative damage, antioxidants, oxidation, redox, oxidative stress.

La oxidación y los agentes oxidantes de hidrógenos o la ganancia de oxígeno en una molécula. La reducción de un compuesto es exactamente lo contrario; es decir, la ganancia de electrones, de hidrógenos o la pérdida de oxígeno. En tal sentido, un agente

Químicamente la oxidación de un compuesto es la pérdida de electrones,

*Recibido: 22 de enero de 2009 Aceptado: 11 de agosto de 2009

¹Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Juárez del Estado de Durango, Av. Universidad y Fanny Anitua S/N, Durango, Dgo. Mex. C.P. 34000. ²Departamento de Bioquímica, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados. Av. IPN 2508, Zacatenco, Delegación Gustavo A. Madero, AP 14-740 México 07000 D.F. Tel (01-55) 5747-3955. Correo E: aquintanar69@hotmail.com, jcalder@cinvestav.mx

oxidante es una molécula que se reduce al reaccionar con la molécula a la cual oxida. Este par oxido-reductor es necesario químicamente y esencial para entender la biología de las óxido-reducciones en el organismo.

Las macromoléculas de importancia biológica (proteínas, ácidos nucleicos, carbohidratos y lípidos) son moléculas nucleofílicas que tienen electrones susceptibles de compartir, es decir, tienen electrones en orbitales superficiales que pueden ser capturados (oxidación) o compartidos en una reacción nucleofílica para formar compuestos o aductos.

Los oxidantes son compuestos electrofílicos especies que tienen avidez por los electrones y que tienen afinidad para reaccionar con macromoléculas nucleofílicas, muchas de ellas de la mayor importancia biológica (1).

Las especies reactivas de oxígeno (ERO) y nitrógeno (ERN), son un subgrupo de moléculas oxidantes, que como su nombre lo indica son altamente reactivas. Otro subgrupo son los radicales libres que no solo tienen alta reactividad y capacidad oxidativa, sino que adicionalmente pueden generar reacciones oxidativas en cadena. Los radicales libres en particular y las especies reactivas en general, participan en algunas funciones biológicas (proliferación celular, diferenciación celular, fagocitosis, metabolismo, reacciones inflamatorias) y se encuentran involucradas en diversas patologías (2).

El ambiente oxidativo

La mayoría de las células y organismos de nuestro planeta se enfrentan a ambientes con agresores oxidativos. Todo inicia con el empleo del oxígeno como la molécula oxidante final del metabolismo aeróbico y oxidativo, el cual realizan la mayoría de los organismos del planeta. Ello hace que las células mantengan una alta concentra-

ción de productos oxidantes del metabolismo, especies reactivas de oxígeno y en muchas ocasiones radicales libres. Numerosas reacciones en las células implican oxidaciones, en principio todas las degradaciones para obtener energía y muchas reacciones del metabolismo intermedio (3).

De igual forma, múltiples xenobióticos ejercen sus efectos, generalmente tóxicos, sobre la célula por procesos oxidativos inducidos por la propia molécula xenobiótica o por el metabolismo para su biotransformación.

Este tipo de ambiente hace necesario que las células mantengan sistemas de amortiguamiento reductor, para poder aprovechar los beneficios del metabolismo oxidativo y a su vez limitar al máximo los daños severos (4).

Los radicales libres

La mayor parte de los compuestos químicos de importancia biológica están formados por átomos unidos por enlaces covalentes, en estos enlaces dos átomos comparten un par de electrones en un orbital molecular y cada electrón muestra una rotación o giro opuesto a su par. En las células se llevan a cabo reacciones químicas que rompen estos enlaces de manera heterolítica, haciendo que una de las partes conserve dos electrones y la otra tenga deficiencia de dos electrones, lo cual genera compuestos estables nucleofílicos o electrofílicos, respectivamente, que son los conocidos aniones y cationes.

Sin embargo, algunas reacciones químicas, las radiaciones electromagnéticas y otros factores, pueden romper estos enlaces de la forma llamada homolítica, proceso después del cual cada parte conserva un solo electrón que estará desapareado, generándose así las especies químicas llamadas radicales libres.

En forma general, un radical libre es un átomo o molécula que tiene uno o más electrones desapareados en sus

orbitales externos y es capaz de tener una existencia independiente; sin embargo, es muy reactivo ya que tiende a reducirse, es decir, sustrae un electrón de átomos o moléculas estables, a las cuales oxida, con el fin de alcanzar su propia estabilidad. Una vez que el radical libre ha conseguido el electrón que necesita para aparear a su electrón libre, la molécula estable que pierde el electrón se oxida y deja a otro electrón desapareado, lo que la convierte a su vez en un radical libre, iniciándose y después propagándose de la misma manera, generando así una reacción en cadena (5).

Tipos de radicales libres

Los radicales libres de importancia biológica pueden clasificarse como:

1.- Especies reactivas de oxígeno (ERO). Las principales son el oxígeno molecular (O_2), el ozono (O_3) y el oxígeno en singulete (O_2^1), así como las especies de oxígeno que están parcialmente reducidas; esto es, el anión superóxido (O_2^-) el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), hidroperóxido (HO_2^*) y el radical hidroxilo ($\cdot OH$). Estas especies son producto de la ruptura o de la excitación del O_2 y son más reactivos que el O_2 en su estado basal. El peróxido de hidrógeno, no es un radical libre pero está estrechamente relacionado con la producción de radicales porque es el principal precursor del radical hidroxilo. Estas ERO son moléculas altamente reactivas que atacan constantemente al organismo mediante reacciones bioquímicas de oxido-reducción, que ocurren como parte normal del metabolismo celular o por factores patológicos.

2.- Metales de transición. Los elementos del primer periodo de la serie "d" de la tabla periódica (Fe, Mn, Co, Ni y Cu) pertenecen a los llamados metales de transición, tienen la característica de llegar a ser estables por sí mismos sin necesidad de reaccionar

con otro elemento, esto es, cuando a su último nivel de energía le faltan electrones para estar completo los utiliza de los niveles o subniveles internos, con lo cual logra su estabilidad, la falta de electrones en el nivel de donde los transfirió se compensa con otros electrones de otro nivel o subnivel, y así sucesivamente: a este fenómeno se le llama transición electrónica. La mayoría de los metales de transición tienen electrones desapareados y precisamente gracias a esta transición pueden existir en forma de radical libre.

3.- Otros radicales libres. Entre los que se encuentran los radicales libres de nitrógeno; tales como, el óxido nítrico ($\text{NO}^\bullet$) y el dióxido nítrico ($\text{NO}_2^\bullet$). El $\text{NO}^\bullet$ es un radical muy reactivo y de importancia fisiológica puede oxidar y dañar, pero es esencial en funciones biológicas complejas como son la neurotransmisión y neuroregulación del sistema nervioso, así como en procesos de agregación plaquetaria y coagulación sanguínea, con el O_2 genera $\text{NO}_2^\bullet$ y con el $\text{O}_2^\bullet$ forma peroxinitrito ($\text{ONOO}^\bullet$). Este tipo de ERN son capaces de generar daño oxidativo y muerte celular. Existen otros radicales libres que tienen diferente naturaleza como el ión hipoclorito ($\text{ClO}^\bullet$) y el radical triclorometilo ($\text{CCl}_3^\bullet$) este último producido durante el metabolismo del CCl_4 por el citocromo P450.

La reactividad química de los diferentes tipos de radicales libres es variable pero siempre elevada y de baja especificidad. La vida media biológica del radical libre es de no más de microsegundos, ya que puede reaccionar rápidamente con todo lo que esté a su alrededor, pudiendo provocar un gran daño a macromoléculas y a estructuras supramoleculares como las membranas (6). Diferentes radicales y especies reactivas tienen diferentes vidas medias, siempre muy bajas, pero algunas de ellas suficientes para per-

mitir que algunas moléculas puedan difundir y actuar en orgánulos o células vecinas, tal es el caso del H_2O_2 y del $\text{NO}^\bullet$.

Daño inducido por radicales libres

Los radicales libres producidos en cantidades moderadas en los organismos pueden ser neutralizados por el propio sistema. Ante un determinado insulto oxidativo, los organismos suelen adaptarse rápidamente. En general, una agresión oxidante de baja intensidad hace que una célula pueda resistir posteriormente condiciones más oxidantes.

Sin embargo, las ERO que se producen y escapan a los sistemas de defensa, producen continuamente irremediables daños a los carbohidratos, al ADN, a las proteínas y a los lípidos que alcanzan. Las consecuencias de las reacciones de los radicales libres con los diferentes compuestos celulares pueden ser muy variadas, pero siempre de importancia biológica y con consecuencias irremediables a corto, mediano o largo plazo.

a) Daño al ADN. Los radicales libres pueden causar entrecruzamiento de proteínas-ADN, intercambio de cromátidas hermanas, daño a la estructura de la desoxirribosa-fosfato, oxidación de las bases nitrogenadas, conversión de bases (la desaminación de la citosina en uracilo y de la 5-metilcitosina en timidina), aperturas de anillos, liberación de bases, rompimiento de cadenas (una o dos hebras). El $\text{OH}^\bullet$ puede atacar tanto las purinas como las pirimidinas; el $\text{O}_2^\bullet$ es más selectivo y generalmente produce sólo aductos de guanina, sobre todo 8-hidroxiguanina (7). Debido al mayor ambiente oxidativo de la mitocondria, el ADN mitocondrial generalmente presenta un mayor número de modificaciones que el ADN nuclear. Los radicales libres y en general las agresiones oxidativas modi-

fican las bases nitrogenadas, lo que induce mutaciones y carcinogénesis, ya sea por la pérdida de expresión o por la síntesis de una proteína alterada.

b) Daño a las proteínas. Las ERO pueden inducir en el extremo la fragmentación de proteínas, pero además existen una serie de alteraciones que pueden modificar notablemente su función, modificando con ello el metabolismo, la estructura, el transporte, los receptores, las proteínas reguladoras y los inmunorreguladores, entre otros. Los radicales libres de oxígeno, pueden reaccionar directamente con el ligando metálico de muchas metaloproteínas. Debido a la reactividad de las ERO con las moléculas insaturadas o residuos de proteínas que contienen azufre, además de aminoácidos tales como, triptofano, tirosina, fenilalanina, histidina, metionina sufren oxidaciones que provocan entrecruzamientos y fenómenos de agregación; en el caso de los residuos de cisteína estos fenómenos se ven favorecidos por la formación de puentes disulfuro intra e intermoleculares. Mientras que en los aminoácidos prolina, arginina y lisina, las especies reactivas de oxígeno pueden generar derivados de tipo carbonilo. El $\text{OH}^\bullet$ convierte a la fenilalanina en o-tirosina y el $\text{NO}^\bullet$ transforma la tirosina en nitrotirosina. El H_2O_2 modifica los grupos sulfhidrilos de algunas cisteínas, de manera que se pueden formar ácidos sulfénicos, sulfínicos y sulfónicos.

c) Daño a los lípidos. La oxidación de los lípidos membranales provoca pérdida de la permeabilidad, la fluidez y la integridad de las membranas (la plasmática y de los orgánulos celulares). Los ácidos grasos polinsaturados de las membranas celulares y las lipoproteínas son particularmente susceptibles al ataque del radical hidroxilo $\text{OH}^\bullet$, del oxígeno singulete ($\text{O}_2^\bullet$) y del hidroperoxilo ($\text{HO}_2^\bullet$). Con

esta reacción se forma un radical lipídico que después de un rearrreglo molecular (dieno conjugado), puede reaccionar con el oxígeno para originar el radical peroxilo ($R-OO\cdot$). Este a su vez puede reaccionar con otros ácidos grasos de la membrana, formando otros radicales lipídicos, transformándose el mismo en hidroperóxido ($R-OOH$). El hidroperóxido, en presencia de varios complejos metálicos, se puede descomponer en más radicales, incluyendo entre ellos al $\cdot OH$, lo que provoca un fenómeno de expansión del daño y propagación de la peroxidación.

En ausencia de iones metálicos los hidroperóxidos se pueden acumular en la membrana y con esto alterar su función. También se pueden transformar en hidrocarburos volátiles, alcoholes o aldehídos (malondialdehído, entre otros), los cuales pueden difundir lejos del lugar donde se originaron, ocasionando daños a otras macromoléculas. A este fenómeno se le llama lipoperoxidación y, en ausencia de algún proceso que la inhiba, puede provocar la rápida destrucción de la estructura lipídica de las membranas. Dentro del proceso de la lipoperoxidación, los radicales que se forman pueden causar también daños a las proteínas membranales, inactivando receptores o enzimas unidas a las membranas.

d) Daño a los carbohidratos. Los carbohidratos son dañados por los radicales libres en menor proporción que otras moléculas. Azúcares tales como glucosa, manitol o ciertos desoxiazúcares pueden reaccionar con el radical hidroxilo para producir sustancias reactivas. Así mismo, los polisacáridos pueden sufrir el ataque de los radicales libres, en este caso, fragmentándose en unidades más sencillas como en el caso de la despolimerización del ácido hialurónico (1, 5).

Mecanismos de defensa antioxidante

Para evitar que se desborde el insulto oxidativo, las células y los organismos aeróbicos requieren generar y mantener defensas antioxidantes de manera óptima e incrementarlas acorde al tamaño de la agresión.

Los mecanismos homeostáticos antioxidantes con los que el organismo enfrenta el daño oxidativo son específicos, afines, numerosos y diversos; reflejando la necesidad de hacer frente a la multiplicidad de formas de radicales libres y especies reactivas; también son numerosos los compartimientos donde actúan en el organismo y en las células.

Los mecanismos antioxidantes se pueden clasificar de diversas formas, la siguiente se basa en las líneas de defensa en el organismo:

a) Macromoléculas que acomplejan especies reactivas y evitan su acción. Por ejemplo, proteínas que acumulan o transportan metales de transición, como la transferrina y la ceruloplasmina o como el oxígeno, la hemoglobina y la mioglobina.

b) Enzimas antioxidantes con gran afinidad para catalizar con altas velocidades la reacción de reducción parcial de una especie reactiva. Por ejemplo: la superóxido dismutasa (SOD) cataliza la dismutación del $O_2^{\cdot -}$ a H_2O_2 ; la glutatión peroxidasa (GPx) que es una enzima dependiente de selenio y cataliza la reducción del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) o lipoperóxidos ($L-OOH$); la glutatión sulfhidril transferasa (GST) que cataliza el ataque nucleofílico del cosustrato GSH sobre el centro electrófilo de un gran número de oxidantes y la catalasa (CAT) que reduce el H_2O_2 a H_2O (8).

c) Cosustratos antioxidantes, son empleados por las enzimas para poder reducir parcialmente a los radicales libres y las especies reactivas. Por

ejemplo; el glutatión y el NADPH. El glutatión es un tripéptido (γ -glutamil-cisteinil-glicina) con gran facilidad para ceder electrones (muy nucleofílico) debido a su grupo sulfhidrilo ($-SH$) y su potencial redox; una vez que queda oxidado se puede regenerar gracias a la enzima glutatión reductasa (GR) que lo reduce con la oxidación de NADPH. El NADPH tiene un potencial redox muy negativo y por ende es un importante donador de electrones e hidrógenos, con lo que puede pasar a $NADP^+$ que en su forma oxidada diversas enzimas lo emplean como cosustrato (9).

d) Enzimas que regeneran sustratos o cosustratos antioxidantes. Por ejemplo, las enzimas que regeneran al glutatión reducido, la vitamina E y el NADPH. El glutatión se mantiene casi todo en forma reducida principalmente a través de glutatión reductasa (GR), una flavoenzima que gracias a la oxidación del NADPH cataliza la reducción del glutatión oxidado (GSSG) a glutatión reducido (GSH). La vitamina E al actuar como antioxidante se oxida a tocoferilquinona, para continuar su trabajo antioxidante se requiere que se reduzca nuevamente a vitamina E, tal reducción la pueden llevar a cabo el ascorbato (vitamina C) o el glutatión con la catálisis de las enzimas tocoferilquinona reductasa o una GPx, respectivamente. El ascorbato se oxida a deshidroascorbato y se puede reducir a ascorbato con NADPH o con GSH por enzimas tales como las deshidroascorbato reductasa (DAR) o por la glutatión peroxidasa (GPx). El NADPH se regenera principalmente a través de la vía de las pentosas a partir del $NADP^+$ por acción de la deshidrogenasa de la glucosa-6-P y la deshidrogenasa de gluconato-6-P; sin embargo, en algunas células la enzima málica/NADP⁺ (MDP) que oxida malato a piruvato puede contribuir a la formación de

NADPH o bien obtenerse a partir de la isocitrato deshidrogenasa citosólica (IDPC) dependiente de NADP^+ que cataliza la reacción de isocitrato a α -cetoglutarato.

e) Antioxidantes endógenos. Los antioxidantes son moléculas nucleofílicas con gran afinidad y que se comportan como compuestos muy susceptibles para que los oxiden las especies reactivas (electrofílicas); es decir, ofrecen electrones a las especies reactivas para evitar que estas ataquen a las macromoléculas nucleofílicas necesarias para la función y estructura celular (proteínas, lípidos, carbohidratos y ácidos nucleicos). Una vez que los radicales libres reaccionan con los antioxidantes se reducen parcialmente o se unen en forma de aductos, reduciendo su reactividad y oxidando al antioxidante. Ejemplos de estos antioxidantes en los organismos son: el glutatión, el NADPH, la albúmina, el ácido úrico, la coenzima Q, la bilirrubina y la melatonina (9).

f) Antioxidantes exógenos. Son antioxidantes que provienen de la dieta, tales como la vitamina E (α -tocoferol), la vitamina C (ácido ascórbico), el β -caroteno (provitamina A), el cobre, el selenio, el zinc, el manganeso, los polifenoles, los licopenos, los ácidos egálicos, los flavonoides, la quercitina, la hespiridina, las catequinas y los taninos (10, 11).

g) Sistemas de reparación. Son sistemas que tratan de recuperar la función de las macromoléculas dañadas, reparar el daño establecido o destruir la macromolécula que pudiera causar daño a la economía celular. Hay mecanismos de reparación específicos que sustituyen las bases mal apareadas, oxidadas, desaminadas o que añaden la base faltante y otros que

degradan un tramo de nucleótidos en una hebra alrededor de la región alterada, posteriormente una polimerasa de ADN y una ligasa de ADN reparan el tramo.

Los enlaces tiol (sulfhidrilo) de las proteínas pueden ser nuevamente reducidos por la enzima tioredutasa (TR) empleando glutatión como donador de electrones y regulando sistemas efectores y de balances oxidorreductores como señales intracelulares y como moléculas efectoras. La enzima metionina sulfóxido reductasa, reduce los sulfóxidos de metionina de las proteínas dañadas, en una reacción dependiente del NADPH.

Los daños producidos por radicales libres en términos generales marcan las proteínas para su degradación. El reconocimiento de los sitios oxidados o halogenados o bien la exposición de regiones hidrofóbicas determinan la ubiquitinación de las proteínas y su degradación en el proteosoma. En el caso de los lipoperóxidos se pueden reducir mediante GPx de fosfolípidos o son eliminados a través de las fosfolipasas como la fosfolipasa A2, que aumenta su actividad durante la agresión oxidativa.

El uso extensivo de sistemas de reparación o el intenso daño al ADN puede inducir el proceso de apoptosis, que visto de esta manera sería la muerte por suicidio cuando la reparación es imposible o el daño fue extensivo, protegiendo al órgano y al organismo de daños locales y sistémicos, incluyendo el desarrollo de células cancerosas (12).

Sistema conjunto de protección antioxidante

En la figura 1 se presenta, con fines didácticos, una propuesta de acción conjunta de la función de los sistemas antioxidantes antes enumerados. En general, el diseño celular antioxidante coloca a las moléculas que secuestran

a moléculas oxidantes para evitar su acción en los sitios incorrectos o con altas concentraciones y que solo ejerzan su acción oxidante en el sitio y reacción necesaria. El sistema de enzimas antioxidantes, se encuentra en los sitios donde se producen los oxidantes (orgánulos o estructuras supramoleculares), con la finalidad de reducirlos parcialmente y con ello disminuir o anular la capacidad electrofílica de los oxidantes. Para poder realizar la reducción de los oxidantes se requiere tener un par reductor que se oxide, estos son los cosustratos antioxidantes, tales como el glutatión y el NADPH. Otro juego de enzimas se encarga de la regeneración los cosustratos de las enzimas antioxidantes y de algunos antioxidantes, lo que permite mantener la capacidad de acción de las enzimas y el poder reductor antioxidante de la célula. La otra línea de defensa son los antioxidantes endógenos y los exógenos, los cuales ofrecen electrones con gran afinidad para los oxidantes y que estos reaccionen con el antioxidante en lugar de que reaccionen y oxiden a las macromoléculas. Finalmente, cuando los anteriores sistemas no fueron suficientes y hay daño a macromoléculas se inicia un complejo sistema de reparación, que puede limitar y eventualmente reparar parcialmente el daño o enviar la macromolécula a destrucción y de ser muy abundante el daño, someter la célula a apoptosis; tratando de evitar la carcinogénesis y un mayor daño al órgano o al organismo (12, 13). Todos estos mecanismos y respuestas condicionan el estrés oxidativo inducido por el insulto oxidativo y la calidad y cantidad de ambos determina el daño oxidativo resultante (Fig. 1).

Sistema amortiguador antioxidante

Todos los sistemas antioxidantes se encuentran enlazados en un sistema amortiguador celular, donde se suman

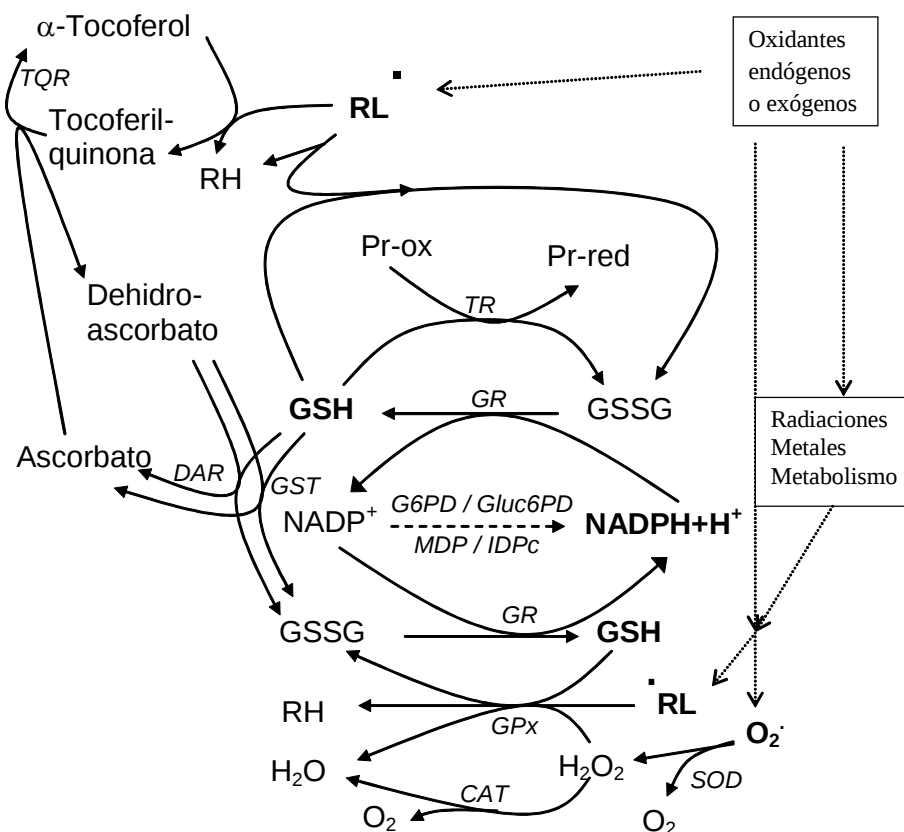


Figura 2. Sistema amortiguador global de antioxidantes. Radicales libres (RL), radical reducido (RH), glutatión reducido (GSH), glutatión oxidado (GSSG), proteínas oxidadas (Pr-Ox), proteínas reducidas (Pr-red), radical superóxido O₂^{•-}, protón (H⁺), fosfato de nicotinamida-adenina dinucleotido reducido (NADPH), fosfato de nicotinamida-adenina dinucleotido oxidado (NADP⁺). Las enzimas: glutatión peroxidasa (GPx), tocoferilquinona reductasa (TQR), deshidroascorbato reductasa (DAR), tiolreductasa (TR), glutatión transferasa (GST), catalasa (CAT), glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD); gluconato 6 fosfato deshidrogenasa (Gluc6PD), glutatión reductasa (GR), superóxido dismutasa (SOD), isocitrato deshidrogenasa citosólica dependiente de NADP⁺ (IDPc) y malato deshidrogenasa dependiente de NADP⁺ (MDP).

ce la eficiencia total del sistema amortiguador antioxidante, evitando así gastos energéticos excesivos y una condición reductora muy elevada en la célula que comprometa las acciones oxidantes de importancia para el funcionamiento celular.

La respuesta de la célula o el organismo a la agresión oxidativa implica no sólo cambios cinéticos y moleculares de enzimas, cosustratos, cofactores y moléculas antioxidantes, sino también el encendido de genes y los cambios de la expresión de proteínas, todo este fenómeno se conoce como estrés oxidativo.

El estrés oxidativo al que se somete una célula o el organismo puede ser eficiente y limitar el daño o ser ineficiente y no poder evitar el incremento del daño, lo cual puede depender de la intensidad del insulto o de la falta de elementos de respuesta en los sistemas antioxidantes (1).

La capacidad antioxidante total

El sistema amortiguador antioxidante puede ser evaluado indirectamente como una capacidad antioxidante total. Este parámetro puede ofrecer una idea de cómo se encuentra el conjunto de la respuesta antioxidante ante

cada agresor oxidativo en cada sistema.

La evaluación depende del fluido, tejido o célula que se pretenda estudiar, ya que cada uno de los ambientes tiene diferentes sistemas antioxidantes y una conjunción o integración diferente. Así mismo, el tipo de sistema antioxidante predominante es heterogéneo y se debe de considerar para saber efectivamente que se está evaluando.

Las técnicas desarrolladas para medir la capacidad antioxidante total de las muestras biológicas valoran la habilidad de los compuestos antioxidantes (donantes de un hidrógeno o un electrón) presentes en el fluido o célula, para reducir las especies oxidantes introducidas (iniciador) en el sistema de ensayo, por lo que son, en general, clasificados como métodos de inhibición directos o indirectos del poder oxidante de una molécula estándar determinada que es el iniciador.

En el plasma, la capacidad plasmática antioxidante total depende preferentemente de la capacidad y cantidad de albúmina y de ácido úrico. Cuando se realiza en sangre total, la capacidad sanguínea antioxidante total, evalúa adicionalmente enzimas antioxidantes, glutatión y NADPH. La capacidad antioxidante total del eritrocito evalúa los sistemas eritrocitarios y no los plasmáticos.

En las células se evalúa predominantemente los mecanismos antioxidantes enzimáticos, glutatión, NADPH y moléculas antioxidantes endógenas y exógenas; pero dependiendo de la célula y los orgánulos predominantes se podrá tener una participación mayoritaria de cierta actividad enzimática o de antioxidantes intracelulares.

En orina, la capacidad urinaria antioxidante total se evalúa midiendo la distribución y excreción de antioxidantes hidrosolubles endógenos y

exógenos y pueden dar un reflejo del consumo o exceso de tales antioxidantes.

Es posible medir la capacidad antioxidante total en cualquier célula o fluido (líquido cefalorraquídeo, articular, saliva, etc.) y cada vez hay más datos comparativos para entender sus significados y los elementos que reflejan estos resultados.

Con las consideraciones descritas se puede indicar que la evaluación de la capacidad antioxidante total es un parámetro que puede ser útil desde el punto de vista diagnóstico. Sin embargo, otras consideraciones deben de realizarse para poder aclarar su posible valor en este sentido.

Evaluación de los procesos de oxidación y de los sistemas antioxidantes

El daño oxidativo. La oxidación de ácidos nucleicos se puede evaluar con ensayos cometa (electroforesis unicelular alcalina) para ver el daño a ADN, el daño a las cadenas y la ruptura con técnicas de dicroísmo circular y electroforesis. El daño oxidativo a las proteínas se puede medir con la presencia de aductos de agentes oxidantes por métodos de HPLC e inmunohistoquímica; la carbonilación oxidativa de residuos de proteínas y la generación de enlaces sulfhidrilo anómalos, además de la ruptura del enlace peptídico por electroforesis, calorimetría, dicroísmo circular y espectrofotometría. La oxidación de lípidos puede determinarse midiendo las especies reactivas al ácido tiobarbitúrico y dienos conjugados por métodos espectrofotométricos y HPLC. El daño a carbohidratos se puede estudiar con la determinación con inmunohistoquímica o con reacciones específicas de oxidación de grupos particulares.

La evaluación de la oxidación se basa en el daño a macromoléculas en condiciones estacionarias, estables y

estáticas, por lo que indica un estado en una ventana de tiempo particular y no da una imagen de la respuesta celular, el estrés oxidativo o una condición dinámica del proceso de daño o defensa de la célula o el organismo.

Los antioxidantes. Los sistemas antioxidantes se pueden valorar independientemente a través de medir la actividad, la expresión y la concentración de las enzimas antioxidantes, también se pueden medir las concentraciones de antioxidantes endógenos y por supuesto de cosustratos antioxidantes. Es posible evaluar la capacidad de los sistemas de reparación y eventualmente se pueden medir las concentraciones de antioxidantes exógenos. Las evaluaciones pueden ser directas por diferentes métodos por ejemplo, la concentración de una proteína de transporte, la enzima antioxidante o de reparación, la actividad de una enzima antioxidante, la concentración neta de un antioxidante o de un cosustrato antioxidante, necesario para la actividad de enzimas antioxidantes.

Las evaluaciones antioxidantes frecuentemente son indirectas y por inhibición, donde un agente oxidante llamado inductor generalmente un radical libre, oxida a una molécula monitor (sonda) que sufre un cambio de color, emite luz (quimioluminiscencia), fluorescencia o electricidad o se puede detectar por sus productos (inmunoquímica o espectro de masas); la capacidad antioxidante se mide cuando al colocar la muestra a evaluar, la oxidación de la molécula sonda se oxida y con ello el parámetro modificado. Una vez comparada la intensidad de la inhibición de la modificación en las mismas condiciones con un antioxidante de potencia conocida por ejemplo, trolox, se pueden obtener los equivalentes de la capacidad antioxidante. Con discretas variantes todas las mediciones antioxidantes se basan en un princi-

pio similar al descrito y mostrado en la figura 3.

La actividad de la SOD se puede estudiar generando el radical $O_2^{\bullet}$ por el sistema xantina-xantina oxidasa en presencia de oxígeno, el radical induce la oxidación del azul de nitrotetrazolio y da origen a un compuesto colorido que se detecta a una longitud de onda de 560 nm. La actividad de SOD presente en la muestra reduce al radical $O_2^{\bullet}$ obteniéndose con ello una reacción colorida, por lo que la actividad de SOD es proporcional a la menor cantidad de color en unidad de tiempo.

Para evaluar la actividad de la CAT se sigue la reacción de descomposición del H_2O_2 , por la pérdida de la absorción a 240 nm o se mide la liberación de O_2 utilizando un electrodo específico.

La acción de la GPx puede ser valorada indirectamente por la reacción acoplada con la GR. El GSSG producido por la reacción con los hidroperóxidos catalizada por la GPx es reciclado a su estado reducido por la GR usando como coenzima el NADPH. La oxidación de NADPH a $NADP^+$ se acompaña de la disminución de su absorbancia a 340 nm, la tasa de disminución de la absorbancia a 340 nm es directamente proporcional a la actividad GPx de la muestra. La actividad de la enzima GST puede ser determinada utilizando como sustratos al 1-cloro-2,4-dinitrobenzono (CDNB) y glutatión reducido (GSH), en donde la GST cataliza la conjugación del grupo tiol del glutatión al CDBN. La absorbancia del producto GS-DNB a 340 nm, es directamente proporcional a la actividad de la GST.

La GR se puede evaluar espectrofotométricamente por la pérdida de absorbancia a 340 nm generada por la oxidación de NADPH o por el incremento en la absorbancia a 412 nm generado por la reducción del ácido

5,5'-ditiobis 2-nitrobenzoico (DTNB).

La actividad de la enzima TQR (tocoferilquinonoreductasa) y la DAR se pueden evaluar determinando la transformación de tocoferilquinona a tocoferol o de deshidroascorbato a ascorbato, respectivamente, con respecto al tiempo y cuantificando por HPLC la concentración de tocoferol o de ascorbato, empleando un detector de absorción ultravioleta-visible, a 295 nm o 254 nm, respectivamente.

La actividad de la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa se puede evaluar iniciando la reacción con glucosa-6-fosfato y detectando la reducción del NADP⁺ a 340 nm.

La actividad de la TR, puede determinarse por la formación de proteínas reducidas con respecto al tiempo determinando los grupos tiol detectando su absorbancia a 415 nm al hacerlos reaccionar con el reactivo DTNB que interacciona con el grupo tiol para dar ácido tionitrobenzoico en una reacción equimolar para cada residuo de cisteína.

Las vitaminas C y E pueden cuantificarse por HPLC empleando un detector de absorción ultravioleta-visible, permitiendo un análisis rápido y específico de los picos a una longitud de onda de 254 y 295 nm, respectivamente.

En el caso del glutatión en sus dos formas oxidado y reducido se pueden medir por HPLC; también se puede estudiar con el cambio de color desarrollado por la reducción del DTNB a 412 nm reducido por GSH; el empleo de la enzima GR, transforma el GSSG en GSH por lo que se obtiene el glutatión total, la diferencia permite obtener el GSSG y con un sencillo calculo la relación GSH/GSSG.

El NADPH se puede medir aprovechando la reducción del colorante azul de tetrazolio (MTT) inducido por el NADPH y en presencia de metasulfato de fenazina (PMS), la disminución en la intensidad del co-

lor se mide a 565 nm y es proporcional a la concentración de NADPH de la muestra; mientras que el NADP⁺ de la muestra se transforma a NADPH empleando a la glucosa-6-P deshidrogenasa.

El ensayo del cometa y el ensayo de inhibición de la poliADP-ribosa polimerasa (PARP) son las técnicas empleadas para la evaluación de la reparación del ADN, los metabolitos 8-oxoguanosina (8-oxodG) y glicol timina (GT) pueden ser utilizados como marcadores de ataque al ADN y las pruebas de inhibición, indican los mecanismos de defensa y su eficiencia.

La reparación de las bases escindidas es ejecutada por un sistema denominado (BER, por sus siglas en inglés) y las vías de reparación de la escisión de nucleótidos (NER, por sus siglas en inglés). Para el análisis de los sistemas de reparación BER y NER se puede emplear un ADN circular con 8-oxoG como sustrato en células de mamíferos, donde al exponer al sistema a estudiar se determina la cantidad de bases reparadas.

También se pueden estudiar la cantidad de aductos o la inhibición de producción de aductos en pruebas *in vivo* o *in vitro*. Para determinar la reparación de proteínas se pueden determinar entrecruzamiento y biotinilización en pruebas de inhibición. Otras pruebas que pueden emplearse son espectrometría de masas, calorimetría, dicroísmo circular, resonancia magnética nuclear, entre otras pruebas acopladas con ensayos de inhibición, para determinar indirectamente los sistemas de reparación.

Todas estas determinaciones específicas son utilizadas como biomarcadores aislados y de manera estática, interpretando el estado oxidativo como el incremento de las biomoléculas oxidadas o la disminución de los componentes antioxidantes intracelulares o extracelulares, sin to-

mar en cuenta que el estado oxidativo integra el efecto de la exposición a oxidantes acoplado con los mecanismos protectores antioxidantes de una manera dinámica y no como una constante estática independiente.

Evaluaciones globales

Dentro del dinamismo del balance oxidativo, se pueden observar sistemas que al analizarlos presenten niveles elevados de oxidación, lipoperoxidación y ADN, asociados con una respuesta antioxidante aparentemente eficiente, indicando que el insulto es superior a la respuesta; Por otro lado, se pueden tener sistemas que al analizarlos se presenten con alto nivel de daño y deficiente respuesta antioxidante, indicando que aun con un insulto menor se puede tener mucho daño al no tener una respuesta eficiente; por lo que la evaluación única e independiente del insulto prooxidante o del fenómeno antioxidante, puede propiciar errores de interpretación y limitaciones para su aplicación clínica.

Con respecto a los antioxidantes extracelulares y endógenos, los principales antioxidantes del plasma humano son la albúmina y el ácido úrico, los cuales conforman más del 50% de la actividad antioxidante total.

En términos generales se puede señalar que la mayoría de los estudios sobre el estado oxidativo miden parcialmente los marcadores biológicos involucrados en el proceso y establecen aseveraciones generalizadas respecto la etiología, la fisiopatología y el pronóstico de muchos de los padecimientos crónico-degenerativos, lo cual genera confusión, resultados inconsistentes y contradictorios con respecto a la evaluación de la agresión oxidativa y la respuesta antioxidante del sistema. Por tal motivo, es indispensable establecer propuestas que incluyan todos los parámetros existentes para medir un mecanismo

bioquímico tan complejo como es el estado oxidativo y así evitar contradicciones y confusión.

Técnicas para determinar la capacidad antioxidante total

Los métodos de determinación de la actividad antioxidante total se basan en comprobar cómo un agente oxidante induce daño oxidativo a un sustrato oxidable, daño que es inhibido o reducido en presencia de un antioxidante. Esta inhibición es proporcional a la actividad antioxidante del compuesto o de la muestra. Por otra parte, hay ensayos que se basan en la cuantificación de los productos formados tras el proceso oxidativo. Los distintos métodos difieren en el agente oxidante, en el sustrato empleado, en el tiempo de evaluación, en la técnica instrumental utilizada, la sensibilidad y en las interacciones de la muestra con el medio de reacción (Tabla I y Fig. 3). La mayoría de los métodos de medida de la actividad antioxidante no emplean especies radicales de significado biológico, sino radicales que son oxidantes iniciadores ajenos al organismo; por ejemplo, el 2',2'-azobis-2-methylpropionamida (AAPH.) o el 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH·).

Algunos ensayos usan sistemas complejos para poder generar radicales libres y medir la capacidad antioxidante (Fig. 3), tal es el caso del ensayo llamado habilidad del plasma para reducir las sales férricas (FRAP, por sus siglas en inglés) donde el Fe^{2+} y el H_2O_2 en la reacción redox produce el radical $\cdot\text{OH}$. El empleo de los radicales peroxilo o hidroxilo en los ensayos les añade un mayor significado biológico, ya que estas especies reactivas son las más importantes a nivel fisiológico tales pruebas son por ejemplo las llamadas capacidad total de retiro de oxirradicales, capacidad de absorción de radicales de oxígeno y potencial total antioxidante de

atrapamiento de radicales (TOSC, ORAC y TRAP, por sus siglas en inglés, respectivamente) (Tabla I). Sin embargo, estas pruebas suelen ser más complicadas y de difícil estandarización.

La selección de la técnica a usar debe de tener en cuenta que los iniciadores pueden ser oxidantes que capturan electrones o hidrógenos, lo cual esta valorando al antioxidante que existe en la muestra y con ello puede afectar y ser más o menos eficiente; por ejemplo, si es un prooxidante que genera al radical superóxido y el

antioxidante es efectivo para el radical hidroxilo, la prueba mostrará como si no existiera o fuera muy pobre la actividad antioxidante, lo cual es muy frecuente que ocurra cuando se prueba capacidad antioxidante de sustancias puras o de muestras poco complejas y con pocos grupos antioxidantes. Este problema es menor cuando se quiere conocer la capacidad antioxidante de muestras complejas, células o tejidos, ya que en este caso el sistema amortiguador de la muestra compensa e integra cualquier oxidante iniciador de la prueba y se

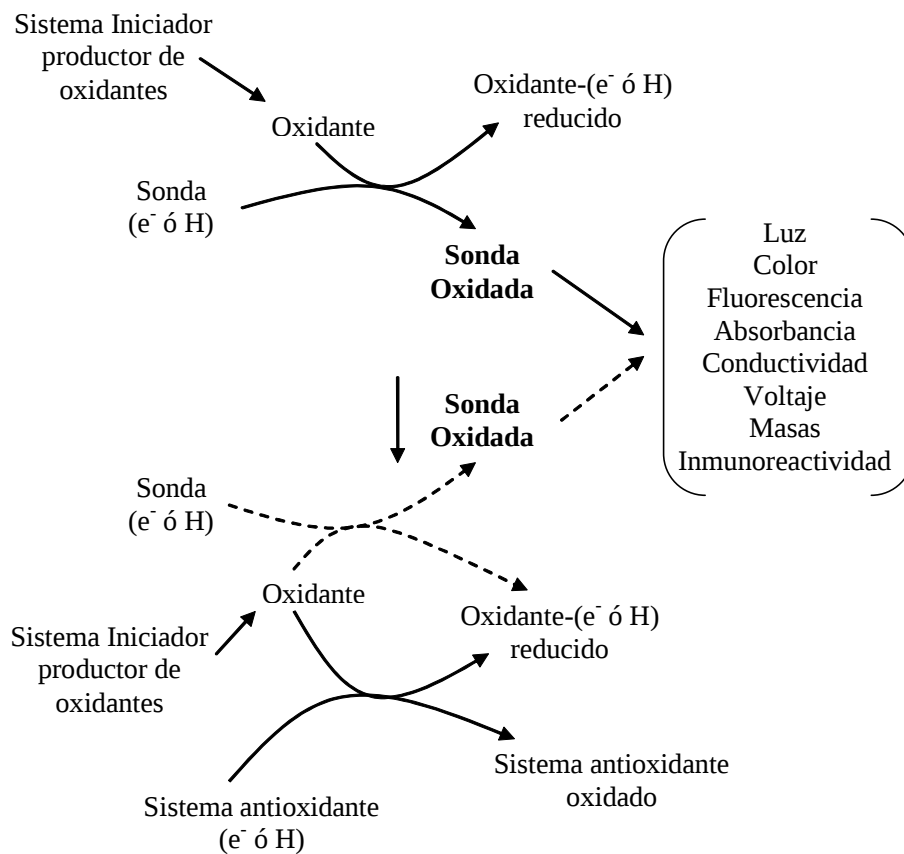


Figura 3. Esquema que muestra el mecanismo general para la evaluación de los sistemas antioxidantes. Un agente iniciador productor de oxidantes inicia el proceso, el oxidante producido oxida a la sonda. La sonda oxidada (negritas) tiene cambios susceptibles de cuantificarse por alguna propiedad que confiere la oxidación (paréntesis rectangular). En la parte inferior del esquema se muestra la competencia que se establece entre el antioxidante al que se enfrenta el oxidante en el proceso de evaluación y que compite con la sonda por el oxidante que generó el iniciador, lo que lleva a que la oxidación de la sonda sea menor (negritas y flecha) y con ello un menor cambio cuantificable (paréntesis rectangular). La menor oxidación de la sonda dependerá de la concentración y de la capacidad antioxidante del sistema correspondiente (como se indica con las flechas punteadas).

TABLA 1
Características generales de algunas pruebas para la evaluación de la capacidad antioxidante total

Prueba	DCFH-DA	Crocina	DPPH	ABTS	FRAP	ORAC	Luminol	TRAP	VC	TOSC
Técnica	Espectro-fotometría	Espectro-fotometría	Espectro-fotometría	Espectro-fotometría	Espectro-fotometría	Fluorometría	Quimio luminiscencia	Consumo de oxígeno	Voltametría cíclica	Cromatografía de gas
Iniciador (oxidante)	APPH	ABAP	DPPH	Hidroxilo	Hidroxilo	APPH	APPH	APPH	Corriente electrones	ABAP
Monitor (sonda)	DCFH-DA	Crocina	DPPH	ABTS	TPTZ-Fe	Ficoeritrina	Luminol	Oxígeno	Voltaje	a-ceto-m butírico
Condición de cuantificación	504 nm	433 nm	515 nm	414 nm	595 nm	Exc 504 nm Em 565 nm	490 nm	Unidades arbitrarias	mV	Integración
Forma de expresión de resultados	Equivalentes de trolox	Equivalentes de trolox	I-50	Equivalente s de trolox	uM Fe/I	Equivalentes de trolox	Equivalentes de trolox	Equivalentes de trolox	Potencial redox	Equivalentes trolox

2',2',7'-diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA), 2,2-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH·), 2,2'-azinobis-(ácido -3 etilbenzotiazolino-6-sulfónico) (ABTS), 2',2'-azobis-2-metilpropionamida (APPH.), 2,4,6-tri(2-piridil)-s-triazina (TPTZ), 2,2'-azobis(2-amidinopropano) (ABAP), potencia antioxidante reductora férrica (FRAP), capacidad de absorción de radicales libres de oxígeno (ORAC), potencial total de atrapamiento de radicales peróxido (TRAP), capacidad total de atrapamiento de oxi-radicales (TOSC), voltametría cíclica (VC).

integran los diferentes antioxidantes para compensan las especies iniciadoras y las que se forman por efectos de las oxido reducciones de los antioxidantes involucrados.

Los monitores de la oxidación (sondas) son las moléculas oxidadas que reportan la intensidad del daño que produce el iniciador (oxidante); al inicio se empleó el daño oxidativo avanzado a una molécula (ácidos grasos, carotenos, proteínas, ADN), las pruebas eran poco sensibles, muy inespecíficas y sin poder tener evaluaciones dinámicas. Posteriormente, se han desarrollado diversos métodos que usan sondas desarrolladas específicamente para estas pruebas (Tabla I), las cuales permiten evaluar pasos iniciales de oxidación en tiempos muy cortos, en ventanas de tiempo inicial, con mayor sensibilidad y especificidad; el 2,2'-azinobis-(ácido -3 etilbenzotiazolino-6-sulfononico) diamonio (ABTS+) y el 2',2',7'-diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA) son moléculas sonda mas frecuentemente empleadas (Tabla I).

Para evitar las interferencias se emplea una alta relación molar entre la sonda y el iniciador a favor de la son-

da y de ambos con respecto a la concentración esperada de antioxidante en la muestra, lo que permite manejar las concentraciones de la muestra para diseñar curvas de inhibición con un mínimo de interferencia, en tiempos muy cortos y con alta intensidad de respuesta.

En caso de muestras pequeñas o con bajas concentraciones de antioxidantes, las técnicas pueden adaptarse para hacer evaluaciones en función de tiempo e integrar las áreas bajo la curva lo que permite aumentar la sensibilidad, aún cuando se debe de tener en cuenta el aumento de interferencia y la posibilidad de oxidación espontánea de las propias sondas, afectando la evaluación global y generando falsos negativos.

La mayoría de los métodos para medir la capacidad antioxidante están diseñados para evaluar muestras hidrosolubles; sin embargo, es posible emplearlos con detergentes, solventes e incluso con fracciones particuladas, una vez que se hacen las matrices, los controles y los blancos correspondientes y asegurarse que no hay precipitación de la muestra en los tiempos de evaluación (13, 14, 15).

El valor diagnóstico

Los procesos celulares y las enfermedades asociadas directa o indirectamente con daño oxidativo y con estrés oxidativo se han incrementado vertiginosamente con cascadas de información. Sin embargo, para que se califique la participación de procesos oxidativos en una enfermedad es necesario que se cumplan algunos criterios tales como: Daños compatibles con oxidación; identificación del agente oxidante en el sitio de lesión; reproducción del daño con otro agente oxidante; que el daño se retire al retirar el agente oxidante y que la enfermedad responda al tratamiento antioxidante.

La mayor parte de las veces se asocia la enfermedad con la oxidación solo por un criterio, sin importar si se cumplen o no con los otros criterios. Lo anterior genera solo una pequeña proporción de enfermedades que se puede tener la certeza de estar asociadas con oxidación, aunque la investigación clínica cada vez con más herramientas diagnosticas incrementa cada vez más las posibilidades de estudiar esta asociación y con ello la cantidad de enfermedades que tienen a la oxidación

como etiología, patogénia o complicación de las mismas.

Muchos esfuerzos se han realizado para que las enfermedades asociadas con las oxidaciones puedan ser diagnosticadas y tratadas con antioxidantes, nuevamente se ha rebasado el diagnóstico y la evaluación correcta de resultados con una serie de pruebas parciales que muestran resultados favorables con el tratamiento antioxidante, pero que no permiten establecer bases sólidas para la adecuada evaluación de la participación oxidante y antioxidante en el curso de las enfermedades.

Enfermedades como la diabetes, la artritis, los infartos, las infecciones, las intoxicaciones, el empleo de algunos fármacos, entre muchas otras, cursan con fases oxidativas que son susceptibles de ser tratadas con antioxidantes y mejorar la evolución y evitar algunas complicaciones (16).

Para poder realizar el diagnóstico y la intervención correcta es necesario aplicar pruebas más rápidas y específicas e interpretarlas correctamente. En tal sentido, la evaluación de la oxidación de los antioxidantes y la capacidad antioxidante adquieren un papel sobresaliente, adicional al empleado en el estudio básico y el estudio clínico de las enfermedades nuevas (2, 4, 12).

Dada la facilidad y rapidez de las pruebas de capacidad antioxidante, au-

nado a que integran de manera global la evaluación de los sistemas amortiguadores antioxidantes y su *estatus* temporal, las hace muy adecuadas como guía diagnóstica.

Ante una evidencia clínica o de laboratorio de daño, un incremento de la capacidad antioxidante total puede indicar un estrés oxidativo y una respuesta antioxidante del organismo, lo que implica un sobregasto de antioxidantes y la necesidad de una intervención terapéutica. Una reducción de la capacidad antioxidante total ante evidencia de daño puede indicar una falta de respuesta, disminución de antioxidantes o un insulto oxidativo que supera la capacidad antioxidante y con ello la indicación de una intervención terapéutica antioxidante.

La capacidad antioxidante total también puede ser empleada para valorar, individualizar y dar seguimiento a la efectividad de un tratamiento antioxidante y no sobremedicar o dar tratamientos insuficientes al paciente.

El gran reto de estas pruebas es estandarizar los valores normales para poblaciones específicas ya que al momento los resultados solo pueden ser comparativos y relativos y aunque muy útiles, aún no pueden ofrecer valores normales poblacionales. Sin embargo, la evaluación masiva, su introducción cada vez más frecuente en pruebas diagnósticas, los métodos comerciales que facilitan la aplicación a

nivel de campo y de consultorio resultarán en muy corto plazo en valores límite más confiables y en interpretaciones más concretas y adecuadas.

Conclusiones

El conocimiento cada vez más profundo de los procesos oxidativos y las defensas antioxidantes, permite poco a poco y de mejor manera su integración a la etiología o fisiopatología y con ello a elementos diagnósticos en la clínica de múltiples enfermedades asociadas a la oxidación. El desarrollo del conocimiento de los sistemas amortiguadores antioxidantes, su forma de funcionar y la posibilidad técnica de medirlos eficientemente, abre una carretera de conocimientos que permiten entender la respuesta antioxidante en la génesis, protección y forma de evolución de las enfermedades. En tal contexto, la capacidad antioxidante total se ofrece como una gran alternativa para estudiar sustancias puras, fluidos células, tejidos, no sólo para entender la biología de los fenómenos, sino incluso para tener un lugar en las pruebas diagnósticas; su desarrollo técnico y su interpretación dará una plataforma para entender mejor la respuesta oxidativa de los organismos que han aprendido a defenderse de la oxidación en una atmósfera oxidante y con un metabolismo oxidativo.

REFERENCIAS

- Halliwell B, Gutteridge JMC (2007) Free Radicals in Biology and Medicine. Clarendon Press, Oxford, UK, p 704.
- Konigsberg M (2008) Radicales libres y estrés oxidativo, Aplicaciones Médicas. Ed. Manual Moderno, p 368.
- Winterbourn CC (2008) Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species. Nat Chem Biol 4: 278-86.
- Calderón JV, Maldonado M (2008) Contaminación e intoxicación por plomo. Ed. Trillas, p 194.
- Hansberg W (2002) Biología de las especies de oxígeno reactivas. Mensaje bioquímico 26: 19-54.
- Rendón A (2005) El daño oxidativo y la respuesta antioxidante durante la intoxicación con plomo en una población expuesta y los efectos del tratamiento con antioxidantes. Tesis de doctorado. Departamento de Bioquímica CINVESTAV.

7. Cervantes MP, Calderón JV, Albores A, Muñoz JL (2005) Copper increases the damage to DNA and proteins caused by reactive oxygen species. *Biol Trace Elem Res.* 103: 229-248.
8. Blokhina O, Virolainen E, Fagerstedt KV (2003) Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Ann Bot (Lond)* 91: 179-194.
9. Forman HJ, Zhang H, Rinna A (2009) Glutathione: Overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis glutation. *Mol Aspects Med* 30(1-2): 1-12.
10. Rendón A, Cerbón J, Maldonado M, Quintanar MA, Calderón Salinas JV (2007) Vitamin-E reduces the oxidative damage on delta-aminolevulinic dehydratase induced by lead intoxication in rat erythrocytes. *Toxicol In Vitro* 21: 1121-1126.
11. Dragsted LO (2008) Biomarkers of exposure to vitamins A, C, and E and their relation to lipid and protein oxidation markers. *Eur J Nutr* 47: 3-18.
12. Monaghan P, Metcalfe NB, Torres R (2009) Oxidative stress as a mediator of life history trade-offs: mechanisms, measurements and interpretation. *Ecol Lett* 12: 75-92.
13. Limón-Pacheco J, Gensebatt ME. Limón J, Gensebatt ME (2009) The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. *Mutat Res* 674(1-2): 137-147.
14. Lim KS, Jenner A and Halliwell B (2006) Quantitative gas chromatography mass spectrometric analysis of 2'-deoxyinosine in tissue DNA. *Nature Protocols* 1: 1995-2002.
15. Magalhães LM, Segundo MA, Reis S, Lima JL (2008) Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. *Anal Chim Acta* 613: 1-19.
16. Srivatsan R, Das S, Gadde R, Manoj-Kumar K, Taduri S, Rao N, Ramesh B, Baharani A, Shah K, Kamireddy SC, Priyatham G, Balakumaran TA, Balakumaran SS, Kamath A, Rao A (2009) Antioxidants and Lipid Peroxidation Status in Diabetic Patients with and without Complications. *Arch Iran Med.* 12: 121-7.