

# Los radicales libres. Beneficios y Problemas

Enrique Piña-Garza\*

## I. Introducción

Pocos casos en la historia de la medicina han tenido un impacto tan profundo con respuestas tan polifacéticas como el ocurrido a consecuencia del conocimiento de los radicales libres y de su influencia en los seres vivos. Los trabajos de este simposio ofrecen un panorama de su repercusión en la medicina.

Un radical libre es una entidad química con un electrón desapareado. La tendencia espontánea de los electrones localizados en los átomos y moléculas es a la formación de parejas, por lo tanto, la existencia de un electrón sin pareja, tal como aparece en los radicales libres, hace a dicha entidad química muy inestable, extraordinariamente reactiva y de vida efímera. Consecuencia de la inestabilidad y reactividad de los radicales libres es su enorme capacidad para combinarse, inespecíficamente en la inmensa mayoría de los casos, con la diversidad de moléculas integrantes de la estructura celular: carbohidratos, lípidos, proteínas, ácidos nucleicos y derivados de cada uno de ellos. A su vez, la combinación de la molécula funcional con el radical libre da lugar a una molécula disfuncional, lo que puede repercutir en la vida celular. Tal vez el ejemplo más conocido y repetido sea el de la lipoperoxidación, en el cual los radicales libres reaccionan con los lípidos insaturados (con dobles ligaduras) de las membranas celulares: la reacción de un radical libre en el sitio de un doble enlace de un ácido graso da lugar a la

formación de dos fragmentos de ácido graso, cada uno de los cuales, a su vez es un radical libre con capacidad de atacar el doble enlace de otro ácido graso, para formar dos nuevos radicales libres, y así, sucesivamente, en una típica reacción en cadena, deteriorar funcionalmente la membrana celular.

En un principio, las reacciones en las que participan los radicales libres estuvieron fuera del ámbito de la biología y la medicina, pero fueron bien conocidos por profesionistas interesados en los siguientes campos: destrucción por radiaciones, preservación de alimentos, combustión, industria del hule y de la pintura. Más adelante se reconoció la presencia de los radicales libres en las células, así como la importancia de las reacciones de los radicales libres en la bioquímica normal y en algunos casos patológicos. La evidencia de que algunos compuestos tóxicos, el tetracloruro de carbono y el paraquat, producen sus efectos tóxicos al ser convertidos en radicales libres por las células, difundió la idea de que los radicales libres eran agentes nocivos para el organismo. En la actualidad se dispone de una visión más equilibrada y realista. Los radicales libres son: 1) producidos continuamente como un producto del metabolismo normal de cada célula; 2) inactivados continuamente por un conjunto de mecanismos, unos enzimáticos y otros de atrapamiento; 3) componentes normales de células y tejidos, por lo que

\*Académico *numerario*, Facultad de Medicina, UNAM.

Correspondencia y solicitud de **sobres**: Secretaría General, Facultad de Medicina, UNAM, Circuito Interior, Edif. B Piso 2, C.U. 04510 México, D.F.

existe una poza de radicales libres, misma que parece ser particular en cada estirpe celular; 4) desempeñan en ciertas estirpes celulares una función para la mejor adaptación del organismo a su habitat; 5) elevan su concentración "fisiológica", y pueden producir importantes alteraciones, como consecuencia de la administración de algunos agentes químicos, entre los que se incluyen cambios bruscos en la disponibilidad de la presión parcial de oxígeno tisular; 6) disminuyen su concentración "fisiológica" en algunos tejidos, lo cual también puede acarrear importantes alteraciones funcionales. En los dos últimos incisos, el aumento o la disminución en la poza de radicales libres, podrá ocurrir por alteraciones en su formación, en su eliminación o una combinación de ambas.

Para finalizar la introducción, y no obstante que lo hace Frenk en la parte IV de este trabajo, una nota de cautela sobre el uso de atrapadores libres

para mejorar la salud. La aterosclerosis, algunos cánceres y el envejecimiento son una tercia de una enorme lista de problemas fisiológicos y padecimientos que de alguna manera se han asociado a una elevada poza tisular de radicales libres (véase la lista y los comentarios a la lista en el trabajo de S. Frenk). No han faltado los charlatanes que recomiendan el consumo de atrapadores de radicales libres para alargar la vida y prolongar el estado de salud. Baste recordar que en el síndrome de Down ocurre una sobreexpresión de la enzima superóxido dismutasa, responsable de la desaparición del radical libre superóxido; se ignora si la baja en la poza de radicales libres celulares tiene relación con la sintomatología presente en la enfermedad anotada. Requerimos de más información y estudio antes de proponer recomendaciones no probadas y eventualmente contraproducentes.

## II. La importancia médica de los radicales libres de oxígeno

Alberto Huberman\*

### Introducción

La frecuencia de la utilización del oxígeno en la medicina clínica no debe impedirnos estar alertas ante el hecho de que, paradójicamente, tiene propiedades tóxicas. Los efectos tóxicos del oxígeno se conocen desde hace varias décadas, sobre todo por los estudios bioquímicos. Más recientemente, los fisiólogos y los clínicos han apreciado su importancia en todos los sistemas biológicos y las investigaciones en este terreno han revelado que, prácticamente, todas las subespecialidades médicas tienen que ver con los efectos del oxígeno y sus derivados activos (radicales libres).

La formación del sistema solar, incluyendo la Tierra, tuvo lugar hace unos 4600 millones de años (m.a.). La atmósfera primitiva de la tierra era de tipo reductor, pues estaba compuesta por CO, CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>, N<sub>2</sub> con menores cantidades de H<sub>2</sub>, NH<sub>3</sub> y CH<sub>4</sub>. Se considera que la vida surgió espontáneamente hace unos 3500 m.a. con organismos simples que no tenían necesidad de utilizar el oxígeno molecular para sus funciones metabólicas (anaerobiosis). La aparición de células capaces de efectuar el proceso de la fotosíntesis (algas cianofíceas monocelulares) hace unos 2600 m.a. permitió la acumulación lenta de oxígeno molecular (O<sub>2</sub>) en la atmósfera. Sólo después, hace unos 1300 m.a., comenzaron a desarrollarse los orga-

\*Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de la Nutrición "Salvador Zubirán"  
Correspondencia y solicitud de sobreiros: Vasco de Quiroga 15, Tlalpan; 14000 Mexico, D.F., México, Apoyado por un donativo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

nismos aeróbicos, capaces de utilizar el oxígeno molecular para extraer una mayor cantidad de energía de los nutrientes que son oxidados en el ciclo de Krebs después de haber sido transformados en acetilcoenzima A. Los electrones y los hidrogeniones productos de dichas oxidaciones, terminan por ser captados por el oxígeno molecular que es el último aceptor de la cadena respiratoria mitocondrial. La reducción del oxígeno molecular da lugar a la formación de dos moléculas de agua, totalmente inocuas, mientras que parte de la energía derivada de la oxidación de los nutrientes es captada en forma de ATP (figura 1).

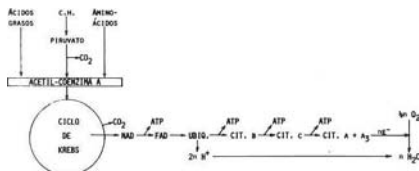


Figura 1. Esquema de la oxidación de los nutrientes por la vía final común del ciclo de Krebs y la cadena respiratoria mitocondrial. Consumo de O<sub>2</sub>, liberación de CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O, y producción de ATP.

Los procesos metabólicos de la respiración y de la fosforilación oxidativa constituyeron una gran ventaja evolutiva que facilitó la multiplicación y la diversificación de los eucariotes monocelulares y pluricelulares. Por esta razón, se hace difícil aceptar que ese mismo oxígeno sea una molécula tóxica con efectos deletéreos sobre diversos sistemas biológicos.

### Evidencias de la toxicidad del oxígeno

Algunas de las evidencias de la toxicidad del oxígeno son las siguientes: 1) el respirar 100% de oxígeno es letal para la rata y para el conejo en menos de 72 horas; 2) los humanos recién nacidos sometidos a oxigenoterapia prolongada sufren lesiones retinianas (fibroplasia retrolental) y pulmonares; 3) la rata sometida a 100% de oxígeno y 5 atmósferas de presión (oxígeno hiperbárico), sufre convulsiones, lo que indica toxicidad a nivel del sistema nervioso central; 4) en humanos, la

exposición a 100% de oxígeno a presión normal produce al cabo de seis horas dolor en el pecho, tos e irritación de la garganta; si se prolonga esta exposición, aparece daño alveolar manifestado por edema, atelectasias, esputo sanguinolento y cianosis; más adelante hay muerte del epitelio alveolar y fibrosis irreversible; 5) en los síndromes de isquemia-reperusión (infarto del miocardio, choque circulatorio, trasplante de órgano), el daño tisular se extiende y agrava precisamente durante la reperusión, es decir, con el regreso del oxígeno al tejido afectado; 6) las células humanas en cultivo son más susceptibles a las radiaciones ionizantes en presencia del oxígeno que en su ausencia.

Todos estos datos han llevado a la conclusión de que la toxicidad del oxígeno y la de sus derivados, juega un papel primordial en las lesiones celulares y tisulares producidas en una gran variedad de procesos patofisiológicos.

### ¿Qué causa el efecto tóxico del oxígeno?

En 1954, Rebecca Gersham y Daniel L. Gilbert propusieron que la mayor parte de los efectos dañinos del oxígeno podían ser atribuidos a la formación de radicales libres de oxígeno, ya que la velocidad de inactivación de las enzimas por el oxígeno en los organismos aeróbicos es demasiado lenta y limitada para explicar la velocidad de aparición de los efectos tóxicos, además de que muchas enzimas no son afectadas por el oxígeno.

### Naturaleza de los radicales libres

Los electrones de los átomos y de las moléculas ocupan regiones del espacio denominadas orbitales. Cada orbital sólo puede contener dos electrones como máximo. Cuando en un orbital externo hay un solo electrón, se dice que este último no está apareado. Se llama radical a cualquier especie atómica o molecular que tenga uno o más electrones no apareados, es decir, un número total impar de electrones. Por ejemplo, el átomo de hidrógeno (H) y los iones de los metales de transición hierro, cobre y manganeso.

Los pares de electrones de cada orbital tienen un giro o rotación sobre su eje opuesto entre sí

(antiparalelo). El giro electrónico (spin) es un vector que representa el campo magnético inducido por la rotación, de tal manera que un par de electrones con giro opuesto anula recíprocamente su campo magnético. Un aporte de energía química, luminosa o térmica puede romper este acoplamiento electrónico dando lugar a la formación de un radical que tendrá un momento magnético neto igual al del electrón no apareado remanente (figura 2).



Figura 2. A: en cada orbital atómico sólo puede haber un par de electrones con giro opuesto y vectores magnéticos antiparalelos. B: un electrón no apareado

Los radicales son generalmente muy reactivos y buscan con avidez completar su par electrónico. Esto puede lograrse mediante una reacción entre dos radicales, con lo cual ambos dejan de serlo (terminación), o bien, sustrayendo un electrón de otra molécula, misma que se convierte entonces en un radical (propagación). Este último mecanismo puede dar lugar a reacciones en cadena, es decir, a la extensión del daño inicial.

#### Naturaleza radical del oxígeno molecular

El oxígeno molecular ( $O_2$ ) es fundamentalmente un birradical, ya que tiene dos electrones no apareados en su orbital externo, ambos con el mismo giro (paralelo). Esto impide que capte dos electrones simultáneamente en las reacciones en las cuales interviene, puesto que un donador de un par de electrones cede necesariamente un par antiparalelo (figura 3). Por esta razón, el oxígeno sólo puede intervenir en reacciones univalentes y aceptar los electrones de uno en uno. Por lo mismo, muchas enzimas del tipo de las oxidasas y de las oxigenasas contienen metales de transición en su sitio activo, puesto que éstos son capaces de aceptar y de donar electrones únicos.

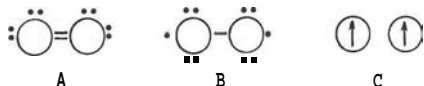
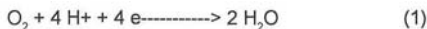
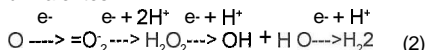


Figura 3. Estructura electrónica del oxígeno molecular ( $O_2$ ): A: representación convencional. B: representación real en la que aparece un electrón no apareado por cada átomo de oxígeno (birradical). C: representación de los vectores magnéticos de los electrones no apareados del oxígeno. Nótese que son paralelos.

La mayor parte del oxígeno utilizado por el organismo humano es reducido a agua por la acción del complejo citocromo-oxidasa (citocromo a + a<sub>3</sub>) de la cadena respiratoria mitocondrial, según la siguiente reacción global:



En realidad y por las razones expuestas anteriormente, esta reducción se hace en cuatro pasos univalentes:



(En la fórmula anterior,  $e^-$  = electrón,  $H^+$  = hidrogenión,  $\cdot O_2^-$  = radical anión superóxido o radical superóxido,  $H_2O_2$  = peróxido de hidrógeno,  $OH \cdot$  = radical hidroxilo,  $H_2O$  = agua).

Estos intermediarios quedan unidos al sitio activo de la citocromo-oxidasa y no se difunden al resto de la célula, en condiciones normales.

#### Radicales libres derivados del oxígeno

Cuando la molécula de oxígeno acepta un electrón, se convierte en un radical con carga negativa, el anión superóxido. Este se representa con el signo negativo de la carga aniónica y un punto que indica que se trata de un radical y que, por lo tanto, contiene un electrón no apareado (en la literatura puede representarse sin el punto):  $\cdot O_2^-$ , mientras que la estructura electrónica del orbital externo del anión superóxido se representa así (figura 4):



Figura 4. A: estructura electrónica del radical anión superóxido ( $O_2^-$ ). Nótese que el oxígeno ha sufrido una reducción univalente por captación de un electrón, pero sigue siendo un radical pues tiene un electrón no apareado. B: peróxido. En la siguiente reducción univalente se obtiene peróxido de hidrógeno, que ya no es un radical, pues en cada orbital hay dos electrones de giro antiparalelo.

El segundo producto de la reacción (2),  $H_2O_2$ , no es realmente un radical, pero su importancia estriba en que por captación de un electrón y de un protón puede dar lugar a la formación de una molécula de agua y a un radical hidroxilo, OH, cuya estructura electrónica se representa en la figura 5.

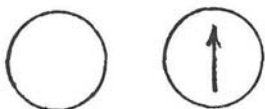


Figura 5. Estructura electrónica del radical hidroxilo que se produce en la siguiente reducción univalente a partir del Peróxido.

Por otro lado, el oxígeno molecular puede absorber energía (22 kcal/mol) y convertirse en una molécula sumamente reactiva, el singlete de  $O_2$ , representado gráficamente como  $^1O_2$  y cuya estructura electrónica se representa en la figura 6.

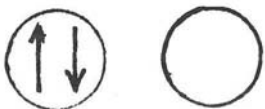


Figura 6. El singlete  $^1O_2$  (llamado así porque su espectro se caracteriza por dar una sola señal), no es realmente un radical ya que los dos electrones no apareados se han unido formando un par antiparalelo. Es sumamente inestable y muy reactivo.

Por absorción de otras 15 kcal/mol, este singlete puede convertirse en otro, representado gráficamente como  $^1O_2^{**}$  cuya vida es efímera y se convierte rápidamente en el singlete  $^1O_2$ . Su estructura electrónica se presenta en la figura 7.

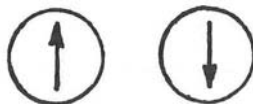


Figura 7. El singlete  $^1O_2^{**}$  tampoco es un verdadero radical, puesto que uno de sus electrones ha invertido su giro y ahora el par es antiparalelo. También es sumamente inestable y muy reactivo.

Debe notarse que en la formación de los singletes no hay adición de electrones sino que se trata realmente de redistribución de los mismos en el último orbital.

En la figura 8 se resumen las diferentes modificaciones que puede sufrir el oxígeno molecular para dar especies moleculares que son verdaderos radicales o que en el curso de su metabolismo dan origen a radicales.

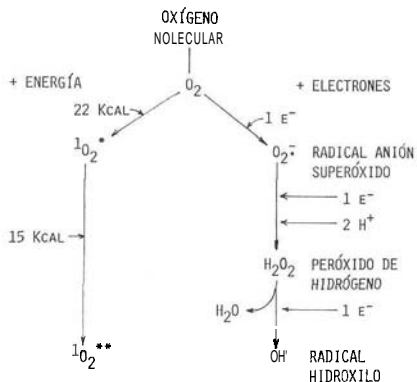
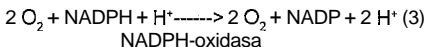


Figura 8. Resumen de los cambios que puede sufrir el oxígeno molecular estable por reducciones univalentes sucesivas o por captación de energía.

Producción biológica de radicales libres de oxígeno

Anión *superóxido*. Una pequeña proporción del Q utilizado en la respiración mitocondrial escapa como superóxido (1-2% del Q total consumido). Quizás la fuente más importante de producción de radicales superóxido *in vivo* sea la descarga respiratoria (aumento súbito del consumo de oxígeno) de las células fagocitarias activadas por contacto con sustancias o partículas extrañas al organismo. En las membranas citoplásmicas de estas células se encuentra un complejo enzimático denominado NADPH-oxidasa que cataliza la reacción Núm. 1 de la figura 9, con la siguiente estequiometría:



La presencia en el citoplasma del fagocito de la enzima superóxido dismutasa, produce la siguiente reacción

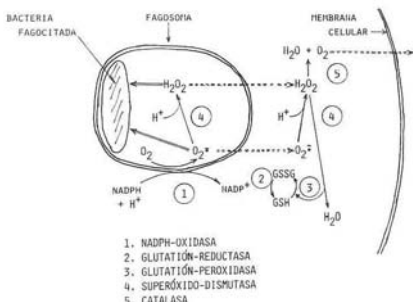
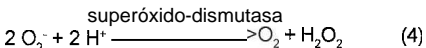
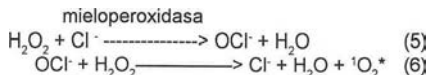


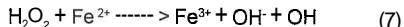
Figura 9 Formación de radicales de oxígeno bactericidas en el interior de una célula fagocitaria y mecanismos de rotación citoplásmicos. -----> reacción; ataque; =====> difusión

Los fagocitos contienen también una mieloperoxidasa, que utiliza el poder oxidativo del peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) para transformar los halógenuros en hipohalógenuros, según las siguientes reacciones:



Como se puede visualizar en las reacciones (3) a (6), el aumento del consumo de oxígeno en la descarga respiratoria de los fagocitos está destinado a producir una gran cantidad de metabolitos de oxígeno, como el radical anión superóxido, el peróxido de hidrógeno y el singulete de oxígeno, que tienen alto poder bactericida, aun cuando no todos sean estrictamente radicales libres.

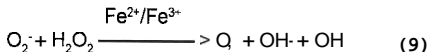
Radical hidroxilo. El peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) formado en la reacción (4), a pesar de no ser en sí mismo un radical, tiene importancia vital, ya que en presencia de los metales de transición Cu<sup>+</sup> o Fe<sup>2+</sup> da lugar a la reacción de Fenton (descrita en 1894):



con la producción del radical hidroxilo (OH<sup>-</sup>). Por otro lado, el radical anión superóxido alimenta la producción de Fe<sup>2+</sup> y por lo tanto, la reacción de Fenton, según el siguiente esquema:



El conjunto de las reacciones descritas, o sea, la dismutación del radical anión superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) que produce peróxido de hidrógeno (4), el cual, a su vez, se descompone en el radical hidroxilo (OH) con intervención del Fe<sup>2+</sup> y la regeneración de este último por medio del radical anión superóxido, constituye el ciclo de Haber-Weiss:



La coexistencia del radical anión superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) y de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) en un medio biológico que inevitablemente contiene hierro, es peligrosísima, ya que el radical hidroxilo (OH) formado, es un oxidante extremadamente reactivo que interacciona con casi todas las moléculas que se encuentran en los organismos vivos, a velocidades sólo limitadas por la velocidad de difusión.

*Singulete* de oxígeno. Como el singulete de oxígeno (O<sub>2</sub><sup>\*</sup>) no tiene electrones no apareados,

no es realmente un radical de oxígeno, pero por su gran reactividad e intervención en muchas reacciones en las que participa el oxígeno molecular, es incluido aquí. Se forma sobre todo cuando algunos pigmentos biológicos son iluminados en presencia de oxígeno, por ejemplo, la clorofila, el retinal, las flavinas y las porfirinas. Tiene una gran capacidad oxidante frente a muchas moléculas biológicas, sobre todo los lípidos de las membranas. Además, tiende a formarse en grandes cantidades en los tejidos y órganos sometidos a las radiaciones ionizantes terapéuticas.

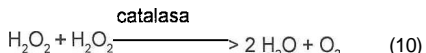
### Defensas biológicas contra los radicales libres de oxígeno

La vida en presencia del oxígeno molecular exige contar con una batería múltiple de defensas contra los diversos radicales libres de oxígeno que por un lado tienden a impedir su formación y por otro, los neutralicen una vez formados. Estas defensas se efectúan en cinco niveles:

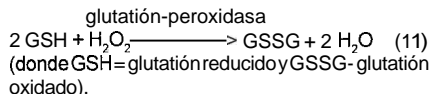
El primer nivel consiste en evitar la reducción univalente del oxígeno mediante sistemas enzimáticos capaces de efectuar la reducción tetraivalente consecutiva sin liberarlos intermedios parcialmente reducidos. Esto lo logra con gran eficiencia el sistema citocromo-oxidasa de la cadena respiratoria mitocondrial, responsable de más del 90% de la reducción del oxígeno en el organismo humano (figura 1 y ecuación núm. 2).

El segundo nivel lo constituye la presencia de enzimas especializadas en captar el radical anión superóxido  $O_2^-$ . Estas son las superóxido-dismutasas (SOD), metaloenzimas que catalizan la dismutación del radical anión superóxido para dar oxígeno molecular y peróxido de hidrógeno (Ecuación núm. 4), con una eficiencia tan grande que se acerca al límite teórico de la difusión. En las células de los organismos eucarióticos existen dos. Una es citoplásmica y contiene un átomo de  $Cu^{2+}$  y uno de  $Zn^{2+}$  en su sitio activo. El átomo de cobre es reducido a  $Cu^+$  y reoxidado a  $Cu^{2+}$  durante el ciclo catalítico. La otra SOD es mitocondrial y contiene  $Mn^{3+}$  en su sitio activo. Es interesante notar que las bacterias también tienen una SOD que contiene  $Mn^{3+}$  en su sitio activo, lo que refuerza la teoría del origen simbiótico de la mitocondria.

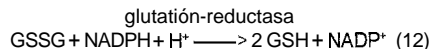
El tercer nivel de defensa está dado por un grupo de enzimas especializadas en neutralizar al peróxido de hidrógeno. Entre ellas está la catalasa, que se encuentra en los peroxisomas y que cataliza la siguiente reacción de dismutación:



y las peroxidasa, que catalizan la reducción del peróxido de hidrógeno por diversos donadores de electrones. En los mamíferos, la glutatión-peroxidasa (una enzima citoplásmica que contiene selenio, Se) es la más importante, ya que cataliza la siguiente reacción:



Por otro lado, la glutatión-reductasa convierte al glutatión oxidado (GSSG) en glutatión reducido (GSH) con intervención del NADPH, impidiendo así que se agoten las reservas de GSH, según la siguiente reacción:



En el cuarto nivel, el radical hidroxilo producido en el ciclo de Haber-Weiss (ecuación núm. 9) puede ser neutralizado por la vitamina E o  $\alpha$ -tocoferol, que es un antioxidante efectivo y que por su hidrofobicidad se encuentra en las membranas biológicas donde su protección es particularmente importante. También la vitamina C o ácido ascórbico es un agente reductor o donador de electrones y reacciona rápidamente con el radical anión superóxido y con el radical hidroxilo. También es un captor del singulete de oxígeno y del ácido hipocloroso, poderoso oxidante generado en el sitio de inflamación. El ácido ascórbico es utilizado in vivo como cofactor de las enzimas prolina-hidroxilasa y lisina-hidroxilasa, involucradas en la biosíntesis de colágena y de la enzima dopamina-p-hidroxilasa que convierte la dopamina en noradrenalina. Sin embargo, el ácido ascórbico puede reducir el  $Fe^{3+}$  a  $Fe^{2+}$ , el cual, en presencia de peróxido de hidrógeno puede estimular la

formación del radical hidroxilo por la reacción de Fenton (ecuación núm. 7). Por este motivo, la administración de ácido ascórbico a pacientes con sobrecarga de hierro puede producir reacciones graves. El glutatión (GSH), además de ser un captor de peróxido de hidrógeno, como sustrato de la enzima glutatión-peroxidasa (ecuación núm. 11), también es un captor del radical hidroxilo y del singulete de oxígeno. Los metales de transición hierro y cobre intervienen en muchas reacciones de generación de radicales libres de oxígeno. Quizá por esta razón, a lo largo de la evolución se han creado proteínas destinadas a transportarlos y almacenarlos como la ferritina y la transferrina para el hierro y la ceruloplasmina y la albúmina para el cobre. Muchas proteínas, pero sobre todo la albúmina, pueden ser captoras de radicales libres de oxígeno; en este proceso la proteína se transforma en una proteína anormal. Las proteínas modificadas por los radicales libres de oxígeno son degradadas a una velocidad mayor que las proteínas normales por enzimas proteolíticas, por lo que esta actividad es considerada "suicida".

Una vez producido el daño molecular, existe un quinto nivel de defensa que consiste en la reparación. La mayor parte de las moléculas del organismo sufren un recambio constante, por lo cual son periódicamente reemplazadas con lo que puede desaparecer el daño. En el caso del material genético, los radicales libres de oxígeno son capaces de provocar rupturas en la cadena del DNA y aun de inducir mutagénesis, pero existen mecanismos enzimáticos de reparación que permiten restablecer la información genética. Se ha calculado que, en promedio, pueden ocurrir 1000 casos de ataques oxidantes al DNA por célula por día en el organismo humano. La importancia de los mecanismos de reparación del DNA es evidente en algunos errores congénitos del metabolismo. Por ejemplo, en el síndrome de Bloom, en el que existe una deficiencia congénita de la enzima DNA-ligasa I, no se reparan las cadenas rotas y esto resulta en inestabilidad genética y aumento del riesgo de cáncer. En el xeroderma pigmentoso, la deficiencia genética estriba en la enzima que elimina las bases de timina modificadas en el DNA, con el resultado de una hipersensibilidad a la luz solar y una mayor incidencia del cáncer de piel.

Papel de los radicales libres de oxígeno en patofisiología

**Fagocitosis.** La descarga respiratoria de los fagocitos activados no llena una necesidad energética, sino que está dirigida a la producción de metabolitos de oxígeno, algunos de ellos verdaderos radicales, destinados a destruir a las bacterias invasoras fagocitadas, gracias a su poderosa actividad oxidante (ecuaciones núms. 3 a 9, figura 9). Una defensa tan eficiente debe tener un precio, ya que las mismas moléculas bactericidas  $O_2^-$ ,  $H_2O_2$ ,  $OH$ ,  $OCl$  y  $^1O_2^*$  pueden producir daño en el mismo ambiente en que los fagocitos actúan. En efecto, la infección está comúnmente asociada a la inflamación y este último tipo de daño puede estar relacionado no sólo con las fuerzas atacantes sino también con la actividad de las células defensoras. La descarga respiratoria y la producción primaria del radical anión superóxido está catalizada por una enzima de la membrana de los fagocitos, la NADPH-oxidasa, que se activa con la fagocitosis. La importancia biológica de la NADPH-oxidasa se pone de manifiesto en la enfermedad congénita granulomatosis crónica, cuyas víctimas sufren de infecciones graves y recurrentes debido a que esta enzima es funcionalmente defectuosa.

**Inflamación.** Los fagocitos activados liberan también ácidos grasos insaturados a partir de los fosfolípidos, probablemente por activación de una fosfolipasa latente. La liberación de ácido araquidónico en particular, determina su utilización en las vías de la ciclooxigenasa y de la lipooxigenasa que dan lugar a la formación de prostaglandinas, tromboxanos, leucotrienos y otros derivados, todos los cuales son promotores de la formación de radicales libres de oxígeno. En conjunto promueven la vasodilatación, la agregación plaquetaria y la leucotaxis, con lo que el proceso se vuelve autosostenido. Como hay ataque a las membranas celulares, se produce necrosis y liberación al medio de los radicales libres de oxígeno que pueden despolimerizar rápidamente el ácido hialurónico y la colágena del espacio intercelular. Además, los fagocitos liberan enzimas proteolíticas que contribuyen al ataque de las estructuras intercelulares. El efecto benéfico de la aplicación experimental de la superóxido-dismutasa bovina

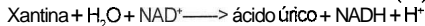




oxígeno en la patofisiología de este proceso. La isquemia de por sí, si es prolongada, producirá daño tisular y muerte celular. Pero en muchas situaciones clínicas una parte importante del daño ocurre cuando hay reperusión del órgano o del tejido, es decir, cuando el oxígeno molecular regresa con la restitución parcial o total de la circulación sanguínea. Este tipo de daño debe denominarse, por lo tanto, postisquémico o de reperusión (quizás más acertadamente, de reoxigenación).

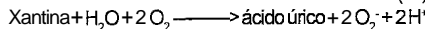
La fuente de los radicales libres de oxígeno en estos casos es la enzima xantina-oxidasa. Esta es sintetizada y existe en prácticamente todos los tejidos como una xantina-deshidrogenasa que cataliza la siguiente reacción:

(13)



Cuando el aporte de oxígeno a un tejido disminuye por interrupción parcial o total del flujo sanguíneo, la producción de ATP disminuye y se elevan los iones de  $\text{Ca}^{2+}$  en el citoplasma. Estos activan una proteasa que convierte, en forma irreversible, a la xantina-deshidrogenasa en xantina-oxidasa. Es posible que en este proceso intervenga también la oxidación de grupos tioles (-SH) esenciales para la actividad de la deshidrogenasa. Al mismo tiempo, la degradación del ATP resulta en una acumulación tisular de hipoxantina. Si en este momento aumenta el flujo de oxígeno al tejido dañado, la xantina-oxidasa cataliza la siguiente reacción:

(14)



En consecuencia, en un tejido isquémico ocurriendo cambios importantes: aparece una actividad enzimática nueva (la xantina-oxidasa) y se acumula uno de sus sustratos (xantina). El otro sustrato, el oxígeno molecular, sólo aparece durante la reperusión. De aquí que el daño producido por la formación excesiva del radical anión superóxido y, como corolario, del peróxido de hidrógeno y del radical hidroxilo, tiene lugar precisamente después del restablecimiento de la circulación sanguínea (figura 12).

En animales experimentales, gran parte del daño postisquémico puede ser evitado por medio de la administración intravenosa de la enzima

superóxido-dismutasa o con el tratamiento previo del animal con allopurinol, un inhibidor de la xantina-oxidasa, o también con el tratamiento con dimetil-sulfóxido, un captor de radicales hidroxilos, todo lo cual apoyó la secuencia descrita anteriormente.

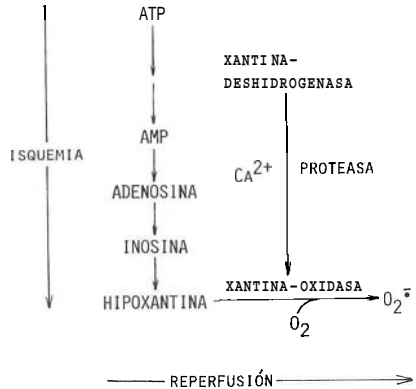


Figura 12. Mecanismo propuesto para la producción del anión superóxido en tejidos u órganos sometidos a isquemia y reperusión. La misma xantina-oxidasa convierte la hipoxantina en xantina (véase la reacción Núm. 14).

### Implicaciones médicas

**Oxigenoterapia.** La superficie alveolar del pulmón humano, calculada en  $120 \text{ m}^2$ , y su gran volumen capilar, hacen de este órgano el más "aeróbico" del organismo. En los animales experimentales como la rata y el conejo, la exposición a una atmósfera de 100% de oxígeno es mortal en menos de 72 horas, pero si se expone al animal primero a una atmósfera de 85% de  $\text{O}_2$  durante siete días, la mayoría resiste la exposición subsiguiente a una atmósfera de 100% de  $\text{O}_2$ . En los animales adaptados a la hiperoxia, se encontró que la actividad específica de la superóxido-dismutasa había aumentado. El examen de los tejidos pulmonares indica que las células del endotelio capilar son las más dañadas, presentándose además edema intersticial, necrosis de células endoteliales y epiteliales, e infiltrado inflamato-

rio. Gran parte del daño puede adjudicarse a la formación excesiva de radicales de Q en la hiperoxia, con la consecuente invasión de células fagocitarias y amplificación del daño por la liberación de radicales y de intermediarios del proceso inflamatorio.

Durante la gestación, las actividades de la superóxido-dismutasa, de la glutatión-peroxidasa, de la catalasa y de la glucosa-6-fosfatodeshidrogenasa van aumentando progresivamente en el pulmón fetal, en preparación para la hiperoxia del nacimiento. Los prematuros sometidos a oxigenoterapia por padecer de membranas hialinas, sufren de insuficiencia respiratoria crónica que va mejorando con el tiempo y que es debida, probablemente, al ataque tisular por los radicales libres de oxígeno.

Las insuficiencias respiratorias y otros padecimientos que requieren oxígeno a presiones superiores a la normal (oxígeno hiperbárico), representan una paradoja terapéutica, ya que la hiperoxia provocará más daño pulmonar. Por esto debe sugerirse el aumento gradual de la concentración de oxígeno y el uso de enzimas como la superóxido-dismutasa y la catalasa o de captadores de radicales de oxígeno como el dimetilsulfóxido y el manitol, para contrarrestar los efectos de los radicales libres de oxígeno.

Trasplante de órganos. Un órgano tomado de un cadáver, puede ser conservado en frío durante horas en un estado de isquemia hasta el momento en que es implantado y reperfundido en el receptor. Este órgano sufrirá invariablemente el ataque descrito en el párrafo de isquemia-reperusión, con la consecuente liberación de radicales libres de oxígeno y pérdida transitoria o definitiva de su capacidad funcional. En trasplantes experimentales, se ha visto que el administrar alopurinol al donador de un trasplante renal, mejora su función y sobrevive en el receptor. Como la técnica de trasplante se irá incrementando en el futuro, la investigación en el área del bloqueo de la formación de radicales libres de oxígeno durante la reperusión rendirá frutos apreciables.

Infarto del miocardio. En la oclusión espontánea aguda de una arteria coronaria, se produce una zona de isquemia y de infarto del miocardio. Cuando se trata quirúrgicamente el estrechamiento progresivo de estas arterias, es necesario indu-

cir una cardioplejía, durante la cual se produce una isquemia global. Experimentalmente se ha visto que la presencia de superóxido-dismutasa y de catalasa en el líquido de perfusión aumenta las posibilidades de recuperación funcional del ventrículo izquierdo. En el infarto experimental por ligadura de la arteria coronaria izquierda (rama descendente anterior) del perro durante una hora, seguida de la reperusión *in vivo* durante cuatro horas, la zona de infarto fue 2.5 veces menor en los animales tratados previamente con alopurinol. Si se inyectaba superóxido-dismutasa intravenosamente antes de la reperusión, la zona de infarto era casi cinco veces menor que en los animales no tratados. Al mismo tiempo, los controles mostraban un aumento de 300% en el contenido de xantina-oxidasa en el miocardio.

El hecho de que el daño tisular se extienda durante el periodo de reperusión, es decir cuando el oxígeno regresa a los tejidos, se conoce como la "paradoja del oxígeno". Todos los datos experimentales y clínicos indican que esta paradoja se debe a la formación de radicales libres de oxígeno y que la terapéutica debe estar dirigida a evitar su formación o a acelerar su desaparición.

**Carcinogénesis.** Es conocida la habilidad de las radiaciones ionizantes de estimular el desarrollo del cáncer. Parte del daño puede radicar en la absorción directa de energía por el DNA con la consecuente alteración de su estructura. Sin embargo, la mayor parte de la radiación absorbida por el agua que, por representar el 70% de un organismo, resulta ser su principal blanco y conduce a la formación de radicales libres de oxígeno. El ataque de estos radicales y sus derivados al DNA y a otras partes de la célula puede ser la base del cáncer inducido por las radiaciones.

La teoría de la carcinogénesis en dos etapas, la iniciación y la promoción, explica algunas observaciones que implican a los radicales libres de oxígeno en este proceso. Así, por ejemplo, algunos promotores tumorales como los ésteres del forbol son activadores muy efectivos de la descarga oxidativa de los fagocitos. Esta activación de los fagocitos también resulta en la liberación de una mezcla compleja de citocinas entre las que se encuentra un factor clastogénico (fracción del DNA) difusible. El daño al DNA producido por los radicales libres de oxígeno, por el factor

clastogénico o por otros mediadores de la inflamación puede activar oncogenes o inactivar genes supresores de tumores (p53). Experimentalmente se ha visto que la acción de los promotores puede ser contrarrestada por la administración simultánea de antioxidantes como la superóxido-dismutasa, la vitamina E, el  $\beta$ -caroteno y otros.

Como evidencia indirecta adicional del papel de los radicales libres de oxígeno en la carcinogénesis se tiene la asociación conocida entre el cáncer y diversos padecimientos genéticos e inflamatorios crónicos. por ejemplo, la colitis ulcerativa y el mayor riesgo de desarrollar adenocarcinoma del colon, la cirrosis hepática y el carcinoma hepatocelular, la ataxia telangiectasia, la anemia de Fanconi y el síndrome de Bloom (todos los cuales presentan un metabolismo anormal del oxígeno) y una mayor incidencia del cáncer. Sin embargo, no hay evidencias concluyentes directas de que los radicales libres de oxígeno sean los factores principales en la iniciación o en la promoción del cáncer.

Sistema nervioso. El oxígeno hiperbárico, utilizado en la gangrena, la esclerosis múltiple y en combinación con la radioterapia, provoca toxicidad aguda en el sistema nervioso central humano y en consecuencia, convulsiones. Se ha mencionado que la oxigenoterapia de los prematuros puede provocar fibroplasia retrolental y hemorragias intraventriculares. Uno de los mecanismos de defensa del sistema nervioso es la alta concentración de ácido ascórbico, obtenida por mecanismos específicos de transporte en el plexo coroideo y en las neuronas, lo que concentra el ácido ascórbico en el líquido cefalorraquídeo y en el tejido nervioso más de diez veces por encima de las concentraciones plasmáticas. Cuando por efecto de un trauma o de un accidente vascular, el tejido nervioso se pone en contacto con sangre, hay liberación de hierro y estimulación de la producción de radicales hidroxilos (OH $\cdot$ ), y esto puede sobrepasar la capacidad antioxidante del ácido ascórbico. La isquemia cerebral seguida de la reperfusión estimula la lipoperoxidación, probablemente por liberación de iones metálicos intracelulares, y los productos de la lipoperoxidación probablemente dañan a las células circundantes. Como la vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol) es liposoluble y se concentra en el interior hidrofóbico de las membranas celulares, también actúa como un antioxidante en el proceso

de la lipoperoxidación. Los prematuros tienen bajos niveles plasmáticos de vitamina E y se ha visto que su suplementación disminuye la severidad de la fibroplasia retrolenticular producida por la oxigenoterapia.

En la variedad familiar de la esclerosis lateral amiotrófica (enfermedad de Lou Gehrig) se ha encontrado una mutación en el gen que codifica la síntesis de la superóxido-dismutasa citosólica (Cu $^{2+}$ /Zn $^{2+}$ ). Esto sugiere que el flujo de metabolitos reactivos del oxígeno, generados a partir de los neurotransmisores, debe ser detoxificado localmente por antioxidantes generados en el propio sistema nervioso, tales como la superóxido-dismutasa.

El gen de la superóxido-dismutasa citosólica reside en el cromosoma 21, de ahí que en el síndrome de Down o trisomía 21, se encuentre elevada la producción de esta enzima. Paradójicamente, lejos de ser una mayor protección contra los radicales libres de oxígeno, esta sobre dosis genética de la enzima produce daño cerebral, quizás debido a su capacidad de generar peróxido de hidrógeno (H $_2$ O $_2$ ) que a su vez da origen al radical hidroxilo (OH $\cdot$ ), sumamente reactivo. Esta mayor actividad enzimática puede originar alteraciones de elementos estructurales y funcionales responsables de la neurotrasmisión y por lo tanto contribuir a la aparición de las anomalías neurobiológicas propias de esta enfermedad.

Oxido nítrico (NO). Se ha comprobado que la actividad vasodilatadora del factor reiajante derivado del endotelio se debe en realidad a la producción de óxido nítrico a partir de la L-arginina por la enzima óxido nítrico-sintasa. El óxido nítrico es un radical libre gaseoso y ha resultado ser un importante mediador en la reactividad del músculo liso de los vasos sanguíneos, en la regulación de la respuesta inmune y como neurotransmisor en el cerebro y en el sistema nervioso periférico. La óxido nítrico-sintasa es una enzima inducible en los neutrófilos, que al ser, activados producen radicales libres de oxígeno capaces de combinarse con el NO para dar sustancias mucho más tóxicas que el propio NO tales como el peroxinitrito (OONO) que se descompone en el radical hidroxilo y el radical NO $_2$ -. De este modo, la producción excesiva de óxido nítrico puede causar daño a nivel celular y tisular.

## Referencias

- **Aruoma OI**, ed. Free radicals in tropical diseases. Harwood Academic Publishers. Chur, Suiza, 1993.
- **Bulkley GB**. Free radicals and other reactive oxygen metabolites: clinical relevance and therapeutic efficacy of antioxidant therapy. *Surgery*. 1993;113:479-483.
- **Chen H, Pellett LJ, Andersen HJ, Tappel, AL**. Protection by vitamin E, selenium and  $\beta$ -carotene against oxidative damage in rat liver slices and homogenate. *Free Rad Biol Med* 1993;14:473-482.
- **Cooper DN, Hall C**. Down's syndrome and the molecular biology of chromosome 21. *Prog Neurobiol* 1988;30:507-521.
- **Dreosti IE**, ed. Trace elements, micronutrients, and free radicals. The Humana Press. Totowa, NJ, EUA 1991.
- **Fridovich I**. Biological effects of the superoxide radical. *Arch Biochem. Biophys*. 1986;247: 1-11.
- **Gotz ME, Durr A, Gsell W, Burger R, Freyberger A, Rieder P**. Some reflections on iron dependent free radical damage in the central nervous system. En: **Rieder P, Youdin MBH**, eds. Springer. Viena. 1993:45-54.
- **Halliwell B**. Albumin—an important extracellular antioxidant? *Biochem. Pharmacol.* 1988;569-571.
- **Halliwell B**. Reactive oxygen species and the central nervous system. *J Neurochem.* 1992;59:1609-1623.
- **Halliwell B, Gutteridge JMC**. Free radicals in biology and medicine. 2nd ed. Oxford. Clarendon Press. 1989.
- **Jamieson D, Chance B, Cadenas E, Boveris A**. The relation of free radical production to hyperoxia. *Ann Rev Physiol* 1986;48:703-719.
- **Kawasaki S, Sugiyama S, Ishiguro N, Ogawa T, Miura T**. Implications of superoxide radicals on ischemia-reperfusion-induced skeletal muscle injury in rats. *Eur Surg Res*. 1993;25:129-136.
- **Kehrer JP**. Free radicals as mediators of tissue injury and disease. *Critical Rev Toxicol.* 1993;23:21-48.
- **Kirschner RE, Fantini GA**. Role of iron and oxygen-derived free radicals in ischemia-reperfusion injury. *J Amer Coll Surg*. 1994;179:103-117.
- **Lowenstein ChJ, Snyder SH**. Nitric oxide, a novel biological messenger. *Cell*. 1992;70:705-707.
- **McCord JM**. Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N Eng J Med*. 1985;312:159-163.
- **Moncada S, Palmer RM, Higgs EA**. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* 1991;43:109-142.
- **Reilly PM, Schiller HJ, Bulkley GB**. Pharmacological approach to tissue injury mediated by free radicals and other reactive oxygen metabolites. *Am J Surg*. 1991;161:488-503.
- **Scandalios JG**, ed. Molecular biology of free radical scavenging systems. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, NY, EUANo. 5 of Current communications in cell and molecular biology. *Inglis J. Witkowski JA*, ed. 1992.
- **Seis H**. Strategies of anti-oxidant defense. *Eur. J. Biochem.* 1993;215:213-219.
- **Taylor AE, Matalon S, Ward PA**. Physiology of oxygen radicals. American Physiological Society. Bethesda, MD. 1986
- **Uhlinger DJ, Tyagi ShR, Inge KL, Lambeth JD**. The respiratory burst oxidase of human neutrophils. *J Biol Chem* 1993;268:8624-8631

## III. Beneficios de los radicales libres del oxígeno

R. Chávez, Ricardo Lascrain,\*\* Edgar Zenteno,\*\* Enrique Piña\*

### Resumen

Entre las respuestas inespecíficas de los organismos para la destrucción de los agentes patógenos se han identificado diversos procesos enzimáticos, unos responsables de la hidrólisis de macromoléculas y otros que permiten la producción de radicales libres, y por ende, una secuencia

de procesos oxidativos que favorecen la actividad de las células fagocíticas.

En este trabajo se analizan algunos mecanismos de síntesis de los radicales libres, sus efectos benéficos y algunos mecanismos de regulación. En particular, se revisa la participación fisiológica del radical libre, óxido nítrico, en los sistemas cardiovascular, nervioso e inmune.

\* Académico numerario. Facultad de Medicina, UNAM

\*\* Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM

Correspondencia y solicitud de sobretiros: Facultad de Medicina, UNAM, Circuito Interior C.U. 04510 México, D.F.

## Introducción

Esta breve revisión se refiere a la otra cara de la moneda. A las ventajas que resultan de la presencia de radicales libres en determinadas células y sitios del organismo, lo que redundan en una mejor adaptación y una mayor defensa de un organismo como el humano a su hábitat natural.

Los radicales libres y los procesos oxidativos hacen su aparición con los primeros organismos anaerobios. Algunos efectos biológicos de los radicales libres se han identificado como benéficos al coadyuvar en la defensa del organismo, de todos ellos quizá el más conocido es la destrucción de microorganismos patógenos como resultado de la fagocitosis.

Existen en general dos formas por las cuales son destruidos tales agentes: las oxidativas y las no oxidativas, siendo estos últimos los procesos que se identificaron inicialmente. Ambos mecanismos entran en juego a partir de la unión de organelos llamados lisosomas a las vacuolas celulares, lugar en donde se encuentran los microorganismos previamente fagocitados, formando así el fagolisosoma.

El fagolisosoma tiene en su interior diversas enzimas lisosomales que al activarse degradan macromoléculas. El pH óptimo para la acción de estas enzimas es ácido; el medio ácido a su vez es el resultado del bombeo de iones de hidrógeno al interior del fagolisosoma.

Los mecanismos oxidativos participan en la destrucción de agentes patógenos por la fagocitosis son acompañados del incremento en el consumo de glucosa y oxígeno, lo que en conjunto se identifica como "estallido respiratorio". Hay que recordar que el fagocito en reposo por lo general utiliza la glucólisis anaerobia como principal vía para el metabolismo de los carbohidratos y como fuente de energía; sin embargo, durante la actividad fagocítica, el fagocito utiliza de manera preponderante la ruta de la hexamonofosfato (también conocida como vía de las pentosas o del fosfogluconato, o vía oxidativa directa de la glucosa), como fuente de energía; esto causa un incremento de hasta cien veces el consumo de oxígeno, en comparación con el estado en reposo de dicha célula. Cuando el fagocito utiliza la ruta de la hexamonofosfato, juega un papel clave la enzima

NADPH-oxidasa (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato deshidrogenasa), que al asociarse a receptores de superficie celular, se activa durante el proceso de la fagocitosis. Esta enzima reduce al oxígeno normal, para formar un radical libre, el anión superóxido, por la incorporación de un electrón; así, el anión superóxido tiene un electrón no apareado o impar y es altamente reactivo.

### NADPH-OXIDASA



El anión superóxido rápidamente es convertido a peróxido de hidrógeno, debido a la acción de la enzima superóxido dismutasa (SOD). Desde hace tiempo se le asignó al peróxido de hidrógeno, la principal actividad bactericida; sin embargo, hasta el momento, las evidencias aportadas no son del todo convincentes, pues algunas bacterias anaerobias y facultativas lo descomponen con rapidez mediante la acción de catalasas y peroxidasas; dichas enzimas también están presentes en las células fagocíticas, protegiéndolas de la actividad tóxica del peróxido de hidrógeno.

### S O D



El peróxido de hidrógeno a su vez es convertido en ión hipoclorito ( $OCl^-$ ), compuesto que exhibe una poderosa acción microbicida. Dicho paso está catalizado por la enzima mieloperoxidasa (MPO), contenida en los gránulos primarios o acidofílicos de los fagocitos, los cuales representan aproximadamente el 5% del peso celular.

### M P O



Otra forma tóxica del oxígeno es el radical hidroxilo ( $\cdot OH$ ), producto de la reacción del peróxido de hidrógeno con el ión superóxido.

### Fe 2+ / Fe 3+



## Efectos biológicos

Esta situación paradójica, al disponer de especies tóxicas del oxígeno, debe haber representado un importante paso durante las etapas iniciales de la evolución de los organismos aeróbicos, al mismo tiempo que se sacaba partido al aprovechar al oxígeno molecular como el gran aceptor terminal de electrones durante la cadena respiratoria. Es de suponerse lógico que tales formas de vida temprana desarrollaran simultáneamente un efectivo sistema defensivo para hacer frente a aumentos en la poza de radicales libres tóxicos, derivados del oxígeno. Esto llevó a generar todo un arsenal de antioxidantes, cuyos principales mecanismos de acción son: a) la eliminación directa de los radicales libres, o las moléculas generadoras de radicales libres, tales como: la superóxido dismutasa, la catalasa, la glutatión-peroxidasa y la tioredoxina; b) el bloqueo de los radicales libres por una combinación directa con ellos: como el tocoferol, los carotenoides y el ácido ascórbico; c) el secuestro de metales mediante un proceso de quelación, metales que pueden servir como importante efecto, lo logran algunas proteínas como la lactoferrina, la ceruloplasmina y la transferrina. Consecuentemente la vida aeróbica está acompañada de un verdadero cerco, ocasionado por un estado oxidativo persistente, en donde la supervivencia de la célula está determinada por un estado de equilibrio entre los estados reactivos del oxígeno y los antioxidantes.<sup>2</sup>

Merece mención especial otro agente oxidante que en la actualidad está cobrando un gran interés: el óxido nítrico, que al poseer un electrón no apareado, se le considera como un radical libre. El óxido nítrico es sintetizado a partir del aminoácido L-arginina, por un grupo de enzimas pertenecientes a la familia de las óxido sintetetas. En los neutrófilos, el interferón gamma es un activador de esta vía, la cual entonces puede ser puesta en acción por el factor de necrosis tumoral alfa, el proceso requiere de la tetrahidrobiopterina como cofactor. Paradójicamente, en los macrófagos humanos no se ha demostrado la existencia de la tetrahidrobiopterina, por lo que se supone que estas células no producen óxido nítrico, sin embargo hay evidencia de su formación en monocitos, macrófagos alveolares, neutrófilos y células aje-

nasal sistema retículo endotelial, tal como hepatocitos, musculatura y endotelios vasculares, entre otras.<sup>3</sup>

El óxido nítrico no sólo es un importante componente de la inmunidad no específica, se trata en realidad de un potente mediador con efectos pleiotrópicos, de tal suerte mencionaremos algunas de sus acciones en diferentes sistemas del organismo.

### Sistema cardiovascular

La síntesis de óxido nítrico por el endotelio vascular, es responsable de una respuesta vasodilatadora, esencial para la regulación de la presión y flujo sanguíneo. El descubrimiento de la existencia de un sistema endógeno vasodilatador permite comprender como compuestos como la nitroglicerina y el nitroprusiato de sodio, fármacos extensamente reconocidos por su eficacia clínica, actúan después de su conversión a óxido nítrico.<sup>4</sup>

El óxido nítrico también tiene efecto inhibitorio sobre la agregación plaquetaria, por un mecanismo dependiente de GMP-cíclico, en sinergia con la prostaciclina. Además, el óxido nítrico producido por las plaquetas actúa por sí mismo como un mecanismo de regulación que inhibe la agregación plaquetaria.<sup>4,5E</sup>

### Sistema nervioso

Quizá lo más interesante es la evidencia de que el óxido nítrico juega un papel importante en los procesos que dan lugar a la memoria: se ha demostrado, que la inhibición de la síntesis del óxido nítrico *in vivo*, impide los procesos de aprendizaje.<sup>5</sup> Al óxido nítrico se le ha asociado con otras funciones fisiológicas como la visión, la olfacción, la conducta. En el sistema nervioso periférico el óxido nítrico también puede contribuir en la transmisión sensorial.<sup>4</sup>

En experimentos hechos en tubo digestivo, usando ratas como modelo, el óxido nítrico es mediador de algunas formas de relajación de la musculatura, incluyendo la dilatación del estómago y la adaptación a incrementos de la presión intragástrica. Es por eso, que tanto en tubo diges-

tivo como en el sistema cardiovascular, el efecto dilatador es crucial para la función correcta en estos órganos.<sup>4,5,6</sup>

Otro ejemplo del papel del óxido nítrico como vasodilatador y neurotransmisor lo constituye el mecanismo de erección penénea, en el cual una baja en las concentraciones del óxido nítrico podría causar impotencia, en tanto que un exceso podría llevar a un estado de priapismo.<sup>4</sup>

## Sistema inmune

El papel del óxido nítrico inicialmente se definió mejor en modelos animales, sin embargo en fechas recientes se ha empezado a acumular experiencia en humanos. La participación del óxido nítrico en el sistema inmune, es único, porque es inespecífico, y produce daño a cualquier célula o patógeno, a diferencia de los anticuerpos o linfocitos T citotóxicos, que para actuar, primero requieren de un reconocimiento específico del agente extraño para poder destruirlo.

En contraste a la síntesis del óxido nítrico en células del endotelio vascular o sistema nervioso, la síntesis del óxido nítrico inducible en los fagocitos se produce en grandes concentraciones, las necesarias para matar o inhibir el crecimiento de muchos patógenos, incluyendo bacterias, hongos y parásitos

Particularmente es efectivo contra agentes de vida intracelular obligada (micobacterias, leishmanias)<sup>4</sup> y recientemente se ha descrito un efecto bloqueador sobre la replicación viral.

Hace más de un siglo, Fehleisen mostró que se podía inducir cierto grado de resistencia al desarrollo de algunas neoplasias, mediante el uso de productos bacterianos. Este fenómeno se asoció a la activación de macrófagos, y actualmente hay

evidencia de que se estarían empleando mecanismos relacionados con la producción del óxido nítrico.

## Perspectivas

Cada vez es más clara la participación del óxido nítrico y diversos radicales libres en los mecanismos de la inflamación, lo cual es importante, si consideramos a ésta, como la reacción del organismo ante la invasión de agentes patógenos, la presencia de sustancias antigénicas, o el daño físico; dando por resultado un incremento del flujo sanguíneo, una elevación en las concentraciones de oxígeno y glucosa, así como la presencia de células inmunocompetentes en el sitio de la agresión.<sup>4,5,6,7</sup> De igual manera es evidente la creciente importancia de estos compuestos en el mantenimiento de la homeostasis.<sup>4,5</sup>

## Referencias

1. Barret JT. *Inmunología Médica*. Capítulo 5. Quinta edición, 1990. Edit. Interamericana. Mexico, D.F.
2. Butke T, Sandstrom P. *Immunol Today*. 1994;15(1):7-10.
3. Roitt I, Brostoff J, Male D. *Immunology*. Pages 15.13-15.16. Third Ed. 1993. Edit. Mosby. London.
4. Lowenstein CJ, Dinerman JL, Snyder SH. Nitric Oxide: A Physiologic Messenger. *Ann Intern Med*. 1994;120:227-237.
5. Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *NEJM* 1993;329(27):2002-2012.
6. Green SJ, Nacy CA, Meltzer MS. Cytokine-Induced Synthesis of Nitrogen Oxides in Macrophages: A Protective Host Response To Leishmania and Other Intracellular Pathogens. *J Leukocyte Biol*. 1991;50:93-103.
7. Kolb H, Kolb BV. Nitric oxide A pathogenic factor in autoimmunity. *Immunol. Today*. 1991;13(5):157-159.



# IV. Enfermedades relacionadas con la acción de los radicales libres

Silvestre Frenk\*

Relacionadas, todas. Inducidas o intermedias por ellos, demostrativamente sólo unas cuantas. Discutir acerca de sus posibles papeles patogénicos, fácil, y además académicamente muy gratificante. Asirlos, incorporarlos al razonar y actuar médico cotidiano, cuestión aún harta enredosa.

Esto último, transcurridos casi 95 años desde que Gomberg reconociera a los radicales libres orgánicos como entidades fisico-químicas claramente definidas; de más tarde haber difundido Michaelis el concepto de la participación de radicales libres como intermediarios en ciertas reacciones bioquímicas; y al cabo de casi 30 años de la proposición, entonces revolucionaria, de que la hepatotoxicidad del tetracloruro de carbono obedecía a una reacción mediada por estos radicales,<sup>1</sup> la que desde entonces dió pie a las nociones en que se sustenta la sesión de hoy.

En efecto, los radicales libres son especies químicas de extrema reactividad, producidas continuamente en el interior de las células, ya sea como mecanismos fisiológicos, o como subproductos accidentales de variados procesos metabólicos, y que difunden al través de las membranas celulares. Cuando las tasas de formación de estos radicales rebasan a los mecanismos antioxidantes normales, ocurre oxidación molecular desmedida, de consecuencias potencialmente letales para las células o a la larga, del organismo entero.<sup>2</sup>

Esto, en teoría. Establecer con seguridad la magnitud de la participación de los radicales libres en la patogenia de enfermedades todavía resulta extremadamente difícil, en virtud de su cortísima vida media y su naturaleza porfugaz casi intangible. Resulta pues casi imposible medirlos directamente *in vivo*, particularmente para fines clínicos. Recurrese por ahora a procedimientos indirectos, centrados principalmente en la medición de los productos terminales de las reacciones de los radicales libres con lípidos, proteínas y el ácido desoxirribonu-

cléico, y limitada aquélla a la sangre, la orina y el aire expirado. Brevemente reseñados, algunos de estos procedimientos son los siguientes.<sup>3</sup>

**Espectrometría** de la resonancia de la rotación (espín) de electrones. De hecho, es ésta la única técnica analítica que mide directamente a los radicales libres, y comienza a ser aplicada a muestras de tejidos humanos obtenidos *ex vivo*, como por ejemplo para la detección de una señal atribuida a un radical peróxido generado en lípidos del cérvix uterino. *In vivo*, si bien aún no factibles en seres humanos, se aplican diversas técnicas catalogadas como de atrapamiento, ya sea generando aductos con mayor estabilidad y vida media, o bien, midiendo productos no radicales formados, sin intervención de algún sistema enzimático, por células, organelos y órganos perfundidos, ante el ataque de radicales hidroxilo sobre ciertos compuestos aromáticos. Sólo información semicuantitativa puede esperarse de estos indicadores de la producción de radicales.

**Medición de productos de peroxidación lipídica.** Como aquí lo ha mostrado ya el doctor Huberman, la peroxidación de lípidos es un complejo proceso, en el cual los ácidos grasos no saturados en los fosfolípidos de las membranas celulares reaccionan con oxígeno para producir hidroperóxidos lipídicos. La reacción comienza con la abstracción de un átomo de hidrógeno de un ácido graso por parte de un radical, y continúa con un proceso en cadena.<sup>2</sup>

A pesar de que su rápida degradación hace difícil la medición precisa de los hidroperóxidos, la lipoperoxidación constituye el patrón de oro cuando se trata de probar el papel de los radicales libres en algún tipo de daño celular. Explicable el vasto conjunto de técnicas analíticas para apreciarla, algunas de ellas actual o potencialmente aplicables a la clínica. Entre ellas destacan las siguientes:

\* Académico honorario Instituto Nacional de Pediatría.

Correspondencia y solicitud de sobretiros: Dirección INP, Insurgentes Sur No. 3700 C. Insurgentes Cuicuilco, 04530 México, DF.

- Precisamente la medición directa de *hidroperóxidos* totales o de sus clases específicas;
- El análisis de compuestos que reaccionan con ácido *tiobarbitúrico*. Representa por ahora el método más sencillo y popular, cuando es usado como indicador de lipoperoxidación y de la actividad de radicales libres en muestras biológicas. Se basa en la reacción del tiobarbiturato con malonil dialdehído, producto éste entre otros, del desdoblamiento de los hidroperóxidos, formándose así un aducto colorido susceptible de ser medido directamente, aunque por su mayor sensibilidad son preferibles procedimientos fluorométricos o cromatográficos. A menos que el malonil dialdehído se encuentre en gran concentración, no es un indicador muy útil.
- Más promisorio resulta la determinación de otros *aldehídos* procedentes de la *lipoperoxidación*, particularmente el **4** - hidroxinonal, compuesto que por sí mismo es citotóxico, susceptible de ser medido con cromatografía líquida a elevada presión con detección ultravioleta.
- Medición de hidrocarburos volátiles en el aire expirado, principalmente etano y pentano, respectivamente derivados de los hidroperóxidos de los ácidos grasos no saturados de las series omega-3 y omega-6. Aunque no invasivo, por complicado este análisis resulta bastante molesto para los pacientes.
- Determinación de compuestos fluorescentes de la lipoperoxidación. Estos incluyen moléculas fluorescentes producidos por enlaces cruzados entre malonil-dialdehído y grupos amino primarios, que dan lugar a aminoiminopropen, bases Schiff, y la lipofuscina, o sea, el producto final de la destrucción oxidativa de lípidos y su enlace cruzado con proteínas y otros compuestos que llevan grupos amino. Se trata de métodos muy sensibles para medir la peroxidación, si bien en etapas tardías de este proceso.

En resumen, aun queda mucho por aprender acerca del procedimiento ideal para valorar lipoperoxidación. Por ahora, se recomienda para tal efecto combinar varios de estos métodos, si

bien es de dudar que de la confrontación de muchos malos surja uno bueno.

Otra serie de indicadores miden los productos de daño oxidativo a proteínas y al desoxirribonucleico. Como en el caso de los hidroperóxidos de lípidos, en el mejor de los casos proveen datos semicuantitativos acerca de su presencia en algunos fluidos orgánicos. En tanto se encuentren métodos para medir la actividad de los radicales en el seno de los tejidos en que tiene lugar, ha de tenerse cuidado en seleccionar aquellos que informen acerca de los supuestos mecanismos de daño. Sólo en esta forma puede aspirarse a establecer correlación entre los índices de producción de los radicales y las manifestaciones clínicas, y así entender su posible asociación.

Exámenes como los aquí bosquejados han venido dando lugar a una creciente lista de entidades patológicas o hasta fisiológicas como el envejecimiento, efectiva o potencialmente debidas a la acción de variados radicales libres. La relación comprende desde aterosclerosis, los estados de isquemia-reperusión, diabetes mellitus y su componente microangiopático, las lesiones inflamatorias, articulares, renales o neurológicas de orden autoinmunitológico o toxicológico, hasta la carcinogénesis, pasando por la displasia bronco-pulmonar o la fibroplasia retrorenal del recién nacido prematuro, la desnutrición proteínico-energética tipo cuasi-coryla enfermedad por radiación ionizante<sup>4</sup> (cuadro I). A fuer de modelos hipotético-reales para facilitar la comprensión de los mecanismos patogénicos básicos, se hace breve mención de dos de estas entidades.

**Cuadro I. Entidades clínicas supuestamente asociadas a radicales de oxígeno (Tomado de Referencia 4)**

**Aparato cardiovascular**  
Aterosclerosis  
Cardiomiopatía alcohólica  
Id. por adriamicina

**Estados de isquemia - reperusión**  
Accidente cerebrovascular  
Infarto miocárdico, arritmias

Trasplante de vísceras  
Artritis  
Congelación

Lesiones inflamatorias de orden inmunológico  
Glomerulonefritis idiopáticas o  
membranosas  
Vasculitis por virus de hepatitis B o por  
medicamentos  
Artritis reumatoide

Sobrecarga de hierro  
Hemocromatosis idiopática  
Dietaria (en Bantús)  
Talasemias y otras anemias crónicas  
hipertransfundidas  
Alcoholismo

Otras hemopatías  
Drepanocitosis  
Anemia de Fanconi  
Saturismo  
Favismo  
Malaria  
Farmacológicas

Carcinogénesis  
Radiaciones ionizantes  
Accidentales  
Radioterapia

Syndromes diabéticos  
Deficiencias **nutricias**  
Cuasiorcórn  
Alcoholismo  
Enfermedad de Keshan (selenio)

Envejecimiento  
Aparato respiratorio  
Contaminantes oxidantes (O<sub>3</sub>, NO  
otros (SO, )  
Humo de tabaco  
Hiperoxia  
Displasia broncopulmanar  
Enfisema  
Neumoconiosis  
Asbestosis  
Bleomucinosi  
Intoxicación por paracuat

Aparato digestivo  
Hepatopatía endotóxica  
Id. por hidrocarburos halogenados  
(CC<sub>4</sub>, halotano)  
Pancreatitis aguda  
Gastritis por antiinflamatorios  
no esteroideos

Sistema nervioso  
Enfermedades de Parkinson y Alzheimer  
Lipofuscinosi, ceroidosis  
Neurotoxinas  
Esclerosis múltiple  
Lesión cerebro-vascular hipertensiva

Riñón  
Nefrotoxicidad por aminonucleósido  
Síndrome nefrótico autoinmune  
Intoxicación por metales pesados

Ojo  
Fibropiasia retrolental  
Catarata  
Hemorragia intraocular  
Retinopatía fótica

Piel  
Radiación actínica  
Lesión térmica  
Algunas porfirias  
Dermatitis por contacto

Músculo  
Algunas miodistrofias

## Aterosclerosis

Contrario a las nociones mas en boga y más asequibles al vulgo, en la cascada de fenómenos que a la larga resulta en lesión de la íntima vascular, no intervienen principalmente las lipoproteínas naturales de baja densidad, sino formas químicas modificadas por oxidación de la molécula que normalmente es reconocida por los receptores de aquellas, o sea la apolipoproteína B, por radicales peroxilo y alcoxilo, a su vez generados por el desdoblamiento de hidroperóxidos de ácidos grasos poliinsaturados las membranas celulares. Oxidada así su apolipoproteína, las lipoproteínas de bajas densidad evaden al estricto control ejercido por los receptores fisiológicos, para en vez de por éstos, ser reconocidas y atrapadas por macrófagos. Cargados éstos entonces con colesterol y ésteres de colesterol, se tornan en "células espumosas", que migran al espacio subendotelial.<sup>5</sup>

Pero a su vez, las lipoproteínas oxidadas de baja densidad contienen otros productos de la peroxidación lipídica, particularmente los aldehídos conocidos como hidroalquales, antes mencionados, capaces de difundirse desde el sitio original del ataque por radicales, y al actuar como citotoxinas, de irritar la capa de células endoteliales y así contribuir también al desarrollo de las lesiones ateroscleróticas. Entre otros efectos, se inhibe la relajación de las células musculares lisas, mediadas por el factor relajante endotelial, o sea el ahora tan de moda óxido nítrico; se provoca una cadena de respuestas inmunes; se liberan proteínas con acción quimiotáctica sobre monocitos y de crecimiento de los mismos, y adhesinas; ocurren también trastornos de la homeostasis de eicosanoide, y agregación excesiva de plaquetas. Es decir, todo el proceso de aterogénesis pudiera ser visualizado como consecuencia de la peroxidación de lipoproteínas. Si esta hipótesis resultara correcta, representaría la aterosclerosis no sólo la primera enfermedad humana reconocida como causada por radicales libres, sino además, prevenible en grado significativo.

Sin duda, resultará más fácil su prevención mediante compuestos antioxidantes que tratar de interferir con la generación de radicales o metabolitos reactivos. En efecto, los ácidos grasos poliinsaturados se ven protegidos contra la peroxidación por toda una gama de antioxidantes. El principal de ellos viene a ser el alfa-tocoferol, del cual alrededor de siete moléculas se encuentran en cada partícula de lipoproteína de baja densidad. Estos antioxidantes compiten con la peroxidación en cadena al barrer con los radicales lipídicos peróxido. El conocimiento detallado de esta interacción *in vivo* en seres humanos, seguramente será la base, como ya dijimos, de la prevención racional de la aterosclerosis.

## Prematurez

Pasemos ahora a la vertiente opuesta del humano transcurrir, la del niño recién nacido prematuro. Al menos en el campo de la pediatría, posiblemente haya sido éste aquel en que por primera vez, hace ya cuarenta años, se demostrara que la administración de oxígeno en elevada concentra-

ción, además de salvar vidas pudiera también ocasionar graves daños. Al paso del tiempo, se ha venido reuniendo evidencia de que los radicales oxigenados libres se hallan involucrados en la patogenia de los tres principales padecimientos del niño prematuro sobreviviente, a saber, la retinopatía, la neumopatía crónica y la hemorragia intraventricular. Las tres comparten como trastorno básico la excesiva fragilidad de las células endoteliales, que conduce a daño capilar y hemorragia. Para explicar esta secuencia patogénica, se postula que en el niño que nace con peso bajo, la capacidad destoxicificante de los mecanismos antioxidativos naturales de defensa de las células endoteliales se ve rebasada por las excesivas tasas de generación de radicales de oxígeno y metabolitos oxigenados reactivos.<sup>7</sup>

En el caso de la displasia bronco-pulmonar, esto parece obedecer primaria, si bien no exclusivamente, a la exposición directa del pulmón inmaduro a elevadas concentraciones de oxígeno; en tanto que en la retinopatía y la hemorragia intraventricular, la producción excesiva de radicales ocurre durante la reperfusión después de períodos de hipoxia.

En una investigación reciente conducida en recién nacidos con muy bajo peso, se ha echado mano de la antes mencionada reacción de malonildialdehído con tiobarbiturato, en sangre del cordón umbilical y periódicamente en la periférica, como indicador de la concentración de productos de la peroxidación de lípidos; y de la actividad de la glutatión peroxidasa y de vitamina E, como paradigmas de actividad antioxidante. La concentración de malonildialdehído exhibe correlación con el número de días en que los pacientes estuvieron sujetos a oxigenoterapia y apoyo ventilatorio bajo presión positiva. Los niños que a la postre desarrollaron neumonía crónica, además de ser los de más breve gestación, de menor peso y de mayores requerimientos de oxígeno, mostraron, en la sangre del cordón, concentraciones muy significativamente altas de malonildialdehído, y más bajas de vitamina E y glutatión peroxidasa, que los prematuros que no sufrieron displasia broncopulmonar, y éstos que los recién nacidos normales tomados como testigo.<sup>8</sup>

Como ha quedado dicho, la medición de malonildialdehído no es un método muy sensible de

actividad de radicales, ya que se requiere que ésta sea muy alta para que se eleve la concentración de aquélla en el suero. Así ocurrió en esta serie, lo que refuerza la conclusión de que quienes desarrollaron neumoopatía crónica habían estado expuestos *in útero* a muy altos niveles de actividad de radicales.

Ya se ha señalado que como los correspondientes sistemas enzimáticos maduran a lo largo de la gestación, el *status* antioxidante del niño prematuro aún es pobre al momento del parto. Como consecuencia, sus pulmones se ven pobremente dotados para resistir el embate de la oxígeno terapia. Además, los niños que fueron víctimas de neumoopatía crónica, no mostraron la habitual casi triplicación de las concentraciones plasmáticas de vitamina E que durante la primera semana de vida exhiben los recién nacidos normales, que la obtienen del calostro.<sup>9</sup>

Estas y otras observaciones de las que hoy no hablo, delinean el papel de los antioxidantes en la prevención de los daños ocasionados por el embate de los radicales libres. Pero por virtud de los corto circuitos intelectuales que ya conocemos, de la verdad ha surgido el mito y de éste el timo. A los adictos a ingerir robustos suplementos de antioxidantes (alfa-tocoferol, selenio, beta-caroteno, ácido ascórbico), recordémosles, a guisa de caveat, que estos son agentes redox, antioxidantes sí en las cantidades que de ellos contiene una alimentación equilibrada, pero en potencia violentamente prooxidantes y autooxidantes, como es el caso de

una megadosis de vitamina C en presencia de hierro catalítico.<sup>10</sup>

Dichas historias, la de los radicales libres, la de la actual antioxidantomanía, reviven aquella frase de Fernando Pessoa: "De todas maneras, vivir me ha hecho mucho daño".

## Referencias

1. Slater TF. Necrogenic action of carbon tetrachloride in the rat a speculative mechanism based on activation. *Nature* 1966;299:36-40.
2. Halliwell B. Free radicals and antioxidants: a personal view. *Nutr Rev* 1994; 52:253-265.
3. Holley AE, Cheeseman KH. Measuring free radical reactions in vivo. *Brit Med Bull* 1993;49:494-505.
4. Halliwell B, Gutteridge JMC. Free radicals in biology and medicine. 2a ed. Oxford: Clarendon Press. 1989:418.
5. Esterbauer H, Wag G, Puhl H. Lipid peroxidation and its role in atherosclerosis. *Brit Med Bull* 1993;49:566-576.
6. Gey KF. Prospects for the prevention of free radical disease, regarding cancer and cardiovascular disease. *Brit Med Bull* 1993;49:679-699.
7. Lindman JHN, van Zoergen-Grobden D, Schrijver J. The total free radical trapping ability of cord blood plasma in preterm and term babies. *Pediatr Res* 1989;26:20-24.
8. Inder TE, Graham P, Sanderson K, Taylor BJ. Lipid peroxidation as a measure of oxygen free radical damage in the very low birthweight infant. *Arch Dis Child* 1994;70:F107-111.
9. Phillips BL, Franck LS, Greene H. Vitamin E levels in premature infants during and after intravenous multivitamin supplementation. *Pediatrics* 1987;80:680-683.
10. Herbert V. Does mega-C do more good than harm, or more harm than good? *Nutr Today* 1993;28:28-32.