

REVISIÓN Y ACTUALIZACIÓN DE LAS BASES MOLECULARES DEL ESTRÉS OXIDATIVO

AUTORES

Fort-Gallifa I., Calmarza P., Montolio-Breva S., Bravo A., Llorente-Martín, E., Pozo-Giráldez A., Sienes-Bailo P., Sánchez-Pascuala Callau J.J., Vaquer-Santamaría J.M., Dayaldasani-Khialani A., Cerdá-Micó C., Camps- Andreu J., Sáez-Tormo G.

Isabel Fort Gallifa: Laboratori Clínic ICS Camp de Tarragona - Terres de l'Ebre - Hospital Universitari Joan XXIII, Unitat de Recerca Biomèdica, Universitat Rovira i Virgili, Tarragona, España. Comisión Estrés Oxidativo, SEQC-ML, Barcelona, España.

Pilar Calmarza: Servicio de Bioquímica Clínica, Hospital Universitario Miguel Servet, Centro de Investigación en Red en Enfermedades Cardiovasculares (CIBERCV), IIS Aragón, Universidad de Zaragoza, Comisión Estrés Oxidativo, SEQC-ML, Barcelona, España.

Silvia Montolío Breva: Laboratori Clínic ICS Camp de Tarragona - Terres de l'Ebre – Hospital Universitari Joan XXIII, Tarragona. Comisión Estrés Oxidativo, SEQC-ML, Barcelona, España.

Adrián Bravo Gómez: Servicio Bioquímica Clínica. Hospital general universitario Gregorio Marañón, Madrid, Comisión Estrés Oxidativo, Comisión Elementos traza SEQC-ML, Barcelona, España.

Elena Llorente Martín: Servicio de Bioquímica Clínica, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid, Comisión Estrés Oxidativo, SEQC-ML, Barcelona, España.

Adela Pozo Giráldez: Servicio de Bioquímica Clínica y Patología Molecular. Hospital Clínico Universitario de Valencia, Comisión Estrés Oxidativo, SEQC-ML, Barcelona, España.

Paula Sienes Bailo: Servicio de Bioquímica Clínica, Hospital Universitario Miguel Servet, Zaragoza, Instituto de Investigación Sanitaria Aragón (IIS Aragón), Comisión Estrés Oxidativo, SEQC-ML, Barcelona, España.

Joan José Sánchez-Pascuala Callau: Laboratori Clínic ICS Camp de Tarragona - Terres de l'Ebre – Hospital de Tortosa Verge de la Cinta, Comisión Estrés Oxidativo, SEQC-ML, Barcelona, España.

Juana María Vaquer Santamaría: Servicio de Bioquímica Clínica y Patología Molecular. Hospital Clínico Universitario de Valencia, Comisión Estrés Oxidativo, SEQC-ML, Barcelona, España.

Anita Dayaldasani Khialani: UGD de Laboratorio, Hospital Universitario Regional de Málaga. Comité de Educación y Comisión Estrés Oxidativo, SEQC-ML, Barcelona, España.

Concha Cerdá Micó: Directora Médica Asistencial del Consorcio Hospital General Universitario de Valencia, Comisión Estrés Oxidativo, SEQC-ML, Barcelona, España.

Jordi Camps: Unitat de Recerca Biomèdica, Hospital Universitari Sant Joan, Institut d'Investigació Sanitària Pere Virgili, Universitat Rovira i Virgili, Reus, Comisión Estrés Oxidativo, SEQC-ML, Barcelona, España.

Guillermo Sáez Tormo: Dto. de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Medicina y Odontología-INCLIVA, Servicio de Análisis Clínicos, Hospital Universitario Dr. Peset-FISABIO, Universitat de Valencia, Comisión Estrés Oxidativo, SEQC-ML, Barcelona, España.

TÍTULO ABREVIADO

Short title

Bases moleculares del estrés oxidativo.
Molecular bases of oxidative stress.

RESUMEN

Abstract

Los radicales libres son compuestos fisiológicamente producidos, lo que los convierte en elementos fundamentales para la vida.

Para conseguir una óptima concentración de especies radicalarias es necesario que su producción y los mecanismos antioxidantes endógenos y exógenos estén perfectamente equilibrados.

La ruptura del equilibrio homeostático induce el conocido estrés oxidorreductivo o alteración redox celular, mecanismo subyacente en la patogenia de la mayoría de las enfermedades y procesos clínicos, entre estos destacan los procesos inflamatorios, cardiometabólicos, neurodegenerativos, envejecimiento y cáncer.

Mediante este trabajo se pretende realizar una revisión sobre los mecanismos y moléculas implicadas en la producción de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, analizando las bases moleculares de su acción sobre macromoléculas y mecanismos biológicos para mantener el óptimo balance redox.

El objetivo es la descripción de los procesos oxidorreductivos que pueden inducir desequilibrios iniciadores de patologías para establecer las bases moleculares en las que se encuentran implicados los procesos redox.

Free radicals are compounds produced physiologically, fact which makes them essential elements for life.

To achieve an optimal concentration of radical species is necessary that their production and the endogenous and exogenous antioxidant mechanisms are perfectly balanced.

Disruption of this homeostatic balance induces a mechanism known as oxidoreductive stress or cellular redox alteration, an underlying mechanism in the pathogenesis of the vast majority of the diseases and clinical processes such as inflammatory, cardiometabolic, neurodegenerative, aging and cancer processes.

This document is a review of the mechanisms and molecules involved in the production of reactive oxygen and nitrogen species (ROS and RNS) and analyze the molecular bases of their action on macromolecules and biological mechanisms to maintain optimal redox balance.

The aim is the description of the oxidoreductive processes that can induce initiating imbalances of pathologies to establish the molecular bases in which the redox processes are involved.

PALABRAS CLAVE

Estrés oxidativo; estrés nitrosativo; mitocondria; sistemas de defensa antioxidante.

Abreviaturas

ADN: ácido desoxirribonucleico
 ATP: adenosín trifosfato
 CD: dienos conjugados
 EO: estrés oxidativo
 EN: estrés nitrosativo
 GC-MS: cromatografía de gases-espectrometría de masas
 GCS: γ -glutamil cisteinil sintetasa
 GPx: glutatión-peroxidasa
 GR: glutatión reductasa
 GSH: glutatión reducido
 GSSG: glutatión oxidado
 GST: glutatión-S-transferasa
 G6PDH: glucosa-6-fosfato deshidrogenasa
 HPLC: cromatografía líquida de alta eficiencia
 HNE: 4-hidroxinonenal
 LC-MS: cromatografía líquida-espetrometría de masas
 LDL: lipoproteínas de baja densidad
 MDA: malonaldehido
 NADPH: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
 NF-kB: factor nuclear-kB
 NOS: óxido nítrico sintasa
 NO: óxido nítrico
 ORS: estrés oxidorreductivo
 PUFA: ácidos grasos poliinsaturados
 ROS: especies reactivas de oxígeno
 RL: radicales libres
 RNS: especies reactivas de nitrógeno
 RS: receptores *scavenger*
 TRX: tiorredoxina
 8-oxo-dG: 8-oxo-2-desoxiguanina

Introducción

Desde hace varios siglos se conoce al oxígeno como elemento vital para el metabolismo energético mitocondrial. Está implicado en prácticamente todas las células de nuestro organismo en procesos bioquímicos clave para la conversión oxidativa de los combustibles químicos de nuestra dieta en energía biológicamente utilizable, adenosín trifosfato (ATP).

Otto Warburg, Premio Nobel de Fisiología-Medicina en 1931, describió los sistemas enzimáticos que forman parte del proceso respiratorio que media esta conversión y su discípulo Hans A. Krebs, descubridor del ciclo que lleva su nombre, contribuyó con una genial visión del metabolismo intermediario al establecer la conexión definitiva entre el final de los esqueletos carbonados de los tres principios inmediatos y la liberación de anhídrido carbónico, en el proceso de la respiración celular, siendo galardonado con el Premio Nobel de Fisiología y Medicina en 1953 (1).

Por otra parte, desde la primera aparición en la literatura científica del término “estrés oxidativo” (EO), utilizado por Ernst Beutler en la década de los setenta, y posteriormente definido por Helmut Sies como un desequilibrio entre la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la capacidad defensiva de los sistemas antioxidantes, la investigación biomédica ha demostrado la presencia de este fenómeno como mecanismo subyacente en la patogenia de muchas enfermedades y procesos clínicos, entre los que destacan por su incidencia e importancia los procesos inflamatorios en general, las enfermedades cardiometabólicas, los trastornos neurodegenerativos y el cáncer, así como todas aquellas enfermedades asociadas al envejecimiento.

Durante los últimos años el EO ha experimentado cambios, tanto conceptuales como en su aplicación práctica. Hoy sabemos que el equilibrio homeostático intra y extracelular puede verse afectado por una sobreproducción de moléculas oxidantes, pero también por un exceso de agentes reductores, habiéndose introducido el término de estrés oxireductivo (ORS), definido como el mecanismo de alteración redox celular, a partir del cual se generan toda una serie de patologías asociadas. De esta forma, ha podido definirse un nuevo concepto, la “patología o enfermedad redox” (figura 1).

No obstante, pese al conocimiento de que las alteraciones redox representan un mecanismo distorsionador de las señales de transducción y expresión génica y su vinculación con los procesos degenerativos y comorbilidades asociadas, la aplicación de los productos de oxidación en la investigación translacional no ha conseguido respaldo suficiente para su incorporación como herramienta diagnóstica y aplicación clínica.

El EO, es actualmente, un término clásico dentro de la investigación básica y clínica translacional, y podemos afirmar que ha alcanzado su máxima

expresión e importancia durante las dos últimas décadas del siglo XXI. El ejemplo más representativo de esta inequívoca relevancia es el descubrimiento del factor HIF1 (*Hypoxia Inducible Factor 1*) por los investigadores merecedores del Premio Nobel de Fisiología y Medicina en 2019, los profesores Gregg Semenza, William Kaelin y Sir Peter Ratcliffe, al descubrir la maquinaria molecular que regula la expresión de genes sensibles a los cambios en los niveles de oxígeno.

1. Mitocondria y función mitocondrial como mecanismo generador de radicales libres (RL)

Las mitocondrias son orgánulos que aparecen en la mayor parte de las células eucariotas cuyos orígenes los encontramos en la teoría endosimbionte y que están formadas por la membrana mitocondrial externa (MME), muy permeable y rica en porina, proteína responsable de la estructura de los canales acuosos que se encuentran en la bicapa lipídica y que le confiere permeabilidad a moléculas pequeñas (<5.000 Da); la membrana mitocondrial interna (MMI), altamente impermeable, incluso al paso de iones y moléculas pequeñas, condición que se asocia a su capacidad para favorecer el gradiente de protones entre la matriz mitocondrial (MM), espacio interno delimitado por la MMI, y el espacio intermembrana (EI)(1).

La MMI posee numerosos pliegues hacia el interior llamados crestas mitocondriales, donde se sitúan los complejos funcionales de la cadena de transporte de electrones (CTE) y la ATP sintasa.

En la MM se encuentra el ADN mitocondrial, los ribosomas y las enzimas fundamentales para las rutas metabólicas.

Entre las funciones mitocondriales encontramos la degradación de ácidos grasos mediante el β -oxidación y el almacenaje de calcio intracelular. La principal finalidad de las mitocondrias es la biosíntesis de ATP, su génesis está facilitada por la actividad de la CTE junto a la ATP sintasa en el proceso denominado fosforilación oxidativa (FO), responsable de la formación del 90% de las ROS que acontecen globalmente en la célula (2).

Clásicamente se ha considerado a los complejos I y III de la CTE como los dos centros primordiales generadores de ROS, donde se producen grandes cambios en la energía potencial de los electrones debido a la reducción del oxígeno, siendo el potencial redox generado en ellos crucial para la formación de RL.

Los últimos estudios sugieren que la producción de ROS por el complejo II alcanza niveles similares al complejo I mediante mecanismos en los que se encuentran implicados succinato y ubiquinona (3,4).

El complejo I es multimérico, formado por 45 cadenas polipeptídicas y contiene un flavín mononucleótido (FMN) como grupo prostético (cofactor) y 8 grupos de hierro-azufre que están implicados en la formación de ROS.

El complejo III está formado por 11 subunidades. Tres de estas, el citocromo B, el C1 y la proteína Riskie, tienen función transportadora de electrones y poseen grupos prostéticos. En este complejo, se produce un conjunto de reacciones más abstracto donde participa el ciclo de ubiquinona (ciclo Q) en su estado de ubisemiquinona (semireducida), en la génesis de radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) en la MMI y MME. En la figura 2 (5) se muestra la estructura de la mitocondria.

Diversos mecanismos de disfunción mitocondrial han sido identificados en diferentes grupos de patologías como uno de los mecanismos implicados en la génesis de las mismas (6-9).

2. Tipos de RL

En los seres vivos, los RL provienen de procesos fisiológicos principalmente asociados al oxígeno.

La medición directa de la concentración de RL es compleja y no asequible a la mayoría de los laboratorios. La resonancia paramagnética de

electrón espín libre es una técnica dificultosa basada en la absorción electromagnética de la radiación por una muestra paramagnética, tales como las especies con uno o más electrones desapareados, cuando ésta se localiza en un campo magnético. Incluye la estabilización de las especies radicalarias y su posterior medición (10).

Debido a la dificultad intrínseca de esta metodología, los esfuerzos se han centrado en la medición de los procesos de EO y estrés nitrosativo (EN) mediante vías alternativas. La medición de los productos estables de reacciones de las ROS y especies reactivas de nitrógeno (RNS) con macromoléculas puede determinarse mediante tecnología relativamente sencilla y habitualmente disponible en los laboratorios clínicos.

a. ROS

Las ROS pueden ser generadas endógenamente mediante la cadena de transporte electrónico mitocondrial y oxidasas NADPH, o bien exógenamente por radiación, contaminantes del aire y ciertos xenobióticos que experimentan ciclos continuos de reducción-oxidación.

Estas especies en los sistemas biológicos se clasifican en radicalarias o no radicalarias (tabla 1).

Entre el 1-2% del O_2 que consumimos se reduce a través de vías sucesivas de ganancia de un electrón, convirtiéndose en el anión radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), considerado precursor de muchas de las ROS (11).

El radical hidroxilo ($\cdot OH$) es una especie más reactiva/oxidante que el $O_2^{\cdot-}$ y, por ello,

Tabla 1:
Principales ROS con importancia biológica encontradas en los sistemas vivos.

ROS Radicales	Símbolo	ROS No Radicales	Símbolo
Superóxido	$O_2^{\cdot-}$	Oxígeno singlete	$^1 O_2$ (1Δg)
Hidroxilo	$\cdot OH$	Peróxido de hidrógeno	$H_2 O_2$
Hidroperoxilo	$HO \cdot_2$	Ácido hipocloroso	$HClO$
Peroxilo	$ROO \cdot$	Ozono	O_3
Alcoxilo	$RO \cdot$		
Hidroperóxido	$HOO \cdot$		
Anión carbonato	$CO_3^{\cdot-}$		

considerada la responsable de los efectos citotóxicos de las ROS.

Las reacciones de las ROS con biomoléculas generan productos secundarios electrón-deficientes lo que les confiere alta reactividad, iniciando de nuevo un ciclo de oxidación.

b. RNS

Dentro de las RNS, la considerada más importante es el óxido nítrico ($\text{NO}\cdot$), por su implicancia como molécula de señalización en procesos biológicos, tales como el control de la presión sanguínea, la inhibición de la agregación plaquetaria y la neurotransmisión.

Se forma a partir de la conversión de la L-arginina en L-citrulina, gracias a la óxido nítrico sintasa (NOS), enzima de la que encontramos cuatro isoformas: nNOS, tipo I o neuronal, eNOS, tipo III o endotelial, mitNOS o mitocondrial, localizada en la mitocondria, todas constitutivas y reguladas por la concentración intracelular de calcio libre, la iNOS, tipo II o inducible, no regulada por calcio sino por citocinas o productos bacterianos (12).

Las RNS en los sistemas biológicos también pueden clasificarse en especies radicalarias o no radicalarias (13) (tabla 2).

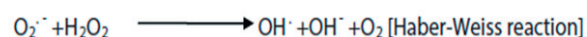
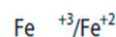
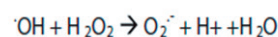
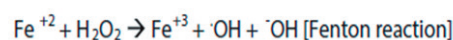
El $\text{NO}\cdot$ es considerado el precursor de las RNS generadas en su mayoría por su reactividad con las ROS.

3. Reacciones químicas generadoras de radicales

Dentro de las reacciones más relevantes se encuentran la generación de peróxido de hidrógeno (H_2O_2).

A partir del O_2 mediante el radical hidroperóxido a pH 7,4 se genera $\text{O}_2\cdot^-$, este puede transformarse en peróxido de hidrógeno (H_2O_2) gracias a la enzima superóxido dismutasa (SOD).

Si el H_2O_2 interactúa con Fe^{+2} (reacción de Fenton) forma $\cdot\text{OH}$, un fuerte oxidante que es convertido en agua por la enzima catalasa (figura 3)(14,15).



El H_2O_2 es la ROS intracelular más abundante y un importante agente de señalización intracelular, este difunde libremente y puede reaccionar con el $\text{O}_2\cdot^-$ para formar $\cdot\text{OH}$ mediante la reacción de Haber-Weiss.

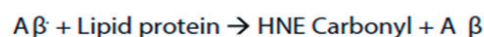
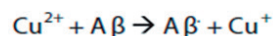
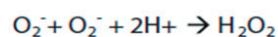
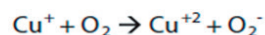
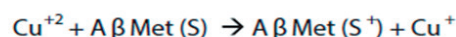


Tabla 2:

Principales RNS de importancia biológica encontrados en los sistemas vivos.

RNS Radicales	Símbolo	RNS No Radicales	Símbolo
Óxido nítrico	$\text{NO}\cdot$	Peroxinitrilo	ONOO^-
Dióxido de nitrógeno	$\text{NO}_2\cdot$	Ácido peroxinitroso	ONOOH
		Catión nitroso	NO^+
		Catión nitronio	NO_2^+
		Catión nitroxilo	NO^-
		Tetraóxido de dinitrógeno	N_2O_4
		Trióxido de dinitrógeno	N_2O_3
		Cloruro de nitrilo	NO_2Cl

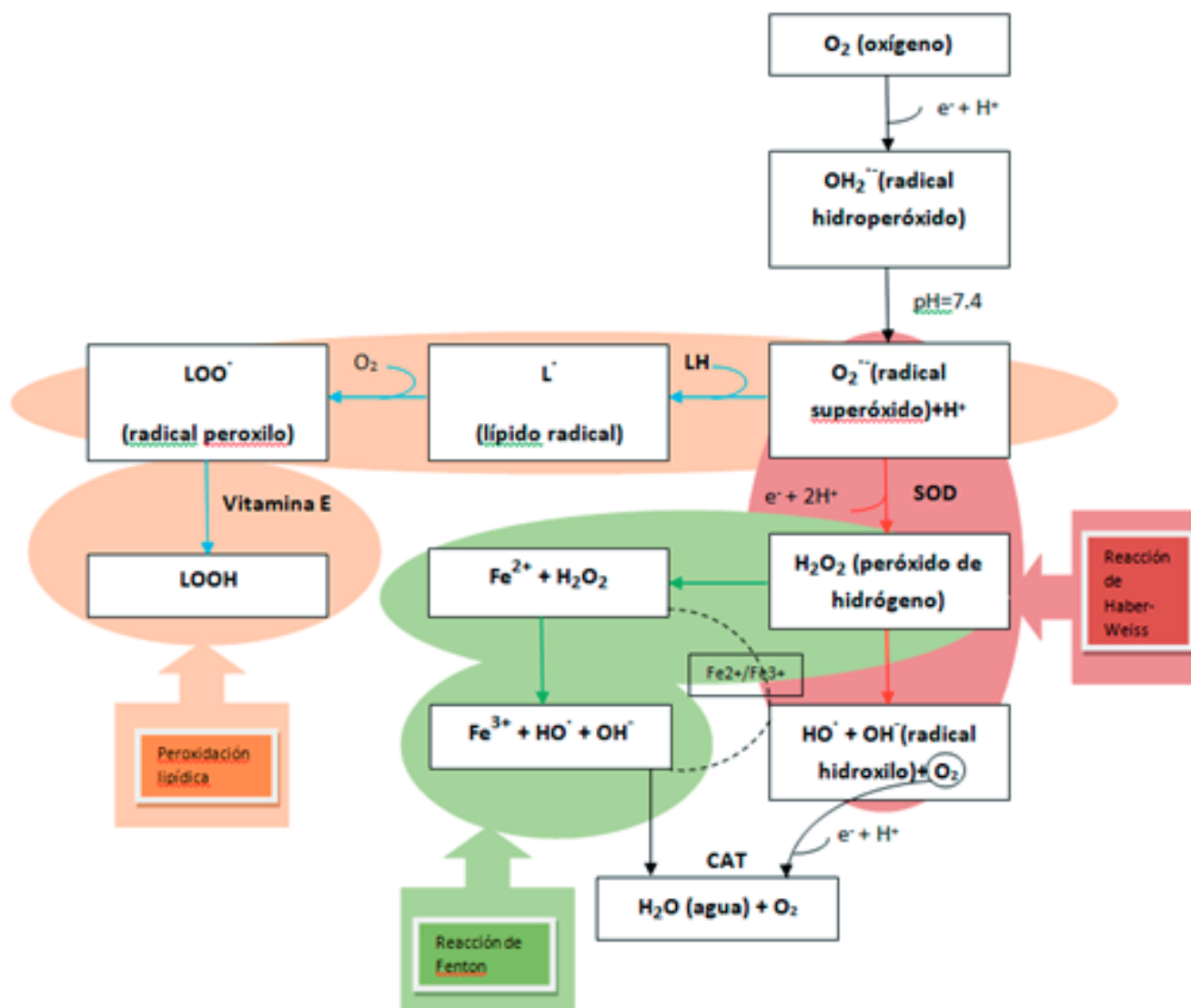


Figura 3.

Representación de las reacciones químicas moleculares más relevantes a nivel intracelular implicadas en la formación de ROS. Adaptada de Reacciones originarias de ROS.

Las reacciones de Fenton y de Haber-Weiss juegan un importante papel en el EO y están involucradas en numerosas patologías (16).

Además, el radical $O_2^{\cdot-}$ está implicado en tres tipos de reacciones químicas: abstracción de hidrógeno y reacciones de adición y de oxidación, tal y como se muestra en la figura 3.

Cuando la producción de este radical $O_2^{\cdot-}$ excede la capacidad detoxificadora, éste puede reaccionar con NO^{\cdot} produciendo $ONOO^-$, otra especie potencialmente oxidante que participa en la progresión de patologías vasculares, lesiones por isquemia-reperusión, inflamación, shock circulatorio, el dolor y la neurodegeneración (17).

4. Acciones biológicas y efectos tóxicos: modificación oxidativa de lípidos, proteínas y ácidos nucleicos

Actualmente sabemos que el balance oxidativo celular es fundamental para la regulación metabólica y por tanto para la vida. Si el equilibrio entre los sistemas oxidantes y antioxidantes se desplaza a favor de los primeros, por producción excesiva de ROS o RNS o por disminución de los mecanismos antioxidantes, se induce una situación conocida como EO o EN (18).

El EO/EN afecta inicialmente a macromoléculas y posteriormente a las funciones de los distintos compartimentos intracelulares, lo que puede desembocar en la muerte celular o apoptosis (19).

Cuando el oxígeno reacciona con los electrones desapareados de las moléculas se transforma en ROS con funciones cruciales para mantener la homeostasis celular, la señalización y respuestas biológicas como la diferenciación, migración y proliferación celular. También ejercen su función a través de la regulación redox los canales iónicos y los factores de transcripción, elementos necesarios para los procesos biosintéticos (20,21).

Se puede afirmar que las ROS tienen un comportamiento dual, la exposición prolongada a concentraciones elevadas de RL puede producir daños en las macromoléculas, provocando una disrupción del sistema biológico, pero una concentración moderada es fundamental para la regulación de las cascadas de señalización.

Esta especificidad biológica se logra mediante la cantidad, duración y localización de la producción de ROS.

El acúmulo de ROS/RNS puede reaccionar químicamente con macromoléculas, tales como lípidos, proteínas, carbohidratos y ácidos nucleicos, originando como consecuencia de su interacción efectos citotóxicos (13,22,23) (tabla 3).

4.1. Modificaciones lipídicas

En la última década se ha consolidado la teoría oxidativa de la arteriosclerosis que considera la lesión arterial inicial, la estría grasa y su progresión a la placa de ateroma íntimamente asociadas al acumulo de lipoproteínas de baja densidad (LDL), que han sido mínimamente oxidadas a macrófagos (24).

La oxidación de LDL está mediada por RL que producen numerosos cambios estructurales, dependientes de un evento inicial común: la peroxidación de los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) en las partículas LDL.

El proceso resultante del ataque a los lípidos de membrana por las ROS se denomina peroxidación lipídica, donde el protagonista es el radical O_2^- . La lipoperoxidación cambia las propiedades de la membrana, pudiendo inactivar sus receptores o enzimas, para alterar la función celular normal (25).

Algunos de los productos de la lipoperoxidación mantienen una reactividad importante en la iniciación de reacciones en cadena, propagando el poder oxidante de las ROS a estructuras próximas y alejadas del foco inicial.

Uno de los productos finales más importantes es el malonaldehído (MDA), muy tóxico por su alta reactividad con proteínas y ADN. El MDA produce modificación de las bases nitrogenadas generando productos altamente mutagénicos y carcinogénicos (18).

Este proceso también genera aldehídos insaturados, isoprostanos y sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico capaces de deshabilitar las proteínas celulares (26).

La LDL-oxidada por sí misma ya es un estímulo potente para la formación vascular de ROS, generando un círculo continuo, las ROS sustraen un hidrogenión (H^+) de un doble enlace en los PUFA e inician la oxidación de LDL, y posteriormente se da una reordenación molecular que forma dobles enlaces conjugados, conocidos como dienos conjugados (CD) (27).

Tras la primera fase de iniciación se da una segunda fase rápida de propagación que implica la abstracción de otro H^+ por el radical peroxil ($LOO\cdot$) de otro PUFA, formando los hidroperóxidos lipídicos.

Sigue una fase de descomposición en la que se rompen los dobles enlaces formándose aldehídos. Los

Tabla 3:

Efectos del daño oxidativo en macromoléculas. Adaptada de la cita bibliográfica (20).

Daño oxidativo en lípidos
· Mediante diferentes mecanismos de reacción de ROS con ácidos grasos de la membrana lipídica genera desestructuración de la membrana y finalmente la muerte celular
· En los alimentos la peroxidación lipídica causa el desarrollo de olores y sabores desagradables
Daño oxidativo en proteínas
· Modificaciones específicas en aminoácidos
· Fragmentación de la cadena peptídica
· Agregación de productos reticulados
· Alteración de la carga eléctrica
· Incremento de la susceptibilidad a la proteólisis
· Destrucción de la función enzimática por la oxidación de los centros Fe-S causada por el O_2^-
· La oxidación de aminoácidos específicos de proteínas actúa como marca para la degradación por proteasas específicas
· La oxidación de aminoácidos específicos conduce a la reticulación
Daño oxidativo en DNA
· Deleciones, mutaciones y translocaciones en DNA
· Ruptura de las hebras de DNA
· Reacción cruzada entre DNA y proteínas

principales son: MDA, 4-hidroxinoneal (HNE) y hexanal, que pueden reaccionar con los grupos amino de la Apo B100.

Durante el proceso de oxidación de LDL también se producen cambios en su mitad proteica, roturas del esquema peptídico y derivatización de algunos aminoácidos (28).

Tras la oxidación se produce un incremento en la carga negativa de las partículas LDL, posiblemente debido a la formación de bases de Schiff entre grupos amino cargados positivamente y grupos aldehído, estas son reconocidas por los receptores *scavenger* (RS) de los macrófagos, presentes en la íntima media de las arterias.

La oxidación de LDL ocurre principalmente dentro de la íntima arterial y las células implicadas en la formación de la placa de ateroma son los monocitos, que al madurar en el espacio subendotelial se transforman en macrófagos.

En el estado de macrófagos adquieren la capacidad de reconocer e internalizar la LDL-oxidada, a través de los RS que a diferencia del receptor de LDL nativa (R-LDL) su actividad no es inhibida por altos niveles de colesterol intracelular, lo cual, añadido a una ineficiente degradación, contribuye a la acumulación masiva de colesterol (29).

4.2. Modificación oxidativa de las proteínas

Entre las acciones más conocidas de los RL está la oxidación de la estructura principal y de las cadenas laterales de las proteínas que interaccionan con la cadena lateral de otros aminoácidos generando el marcador de oxidación proteica grave más utilizado, los carbonilos, para cuya medición se han desarrollado varios ensayos.

Las proteínas representan casi el 70% de las dianas de ROS/RNS y sus reacciones con algunos de estos RL pueden producir oxidación, hidroxilación de grupos aromáticos y aminoácidos alifáticos de cadenas laterales, nitración de residuos de aminoácidos aromáticos, oxidación de grupos sulfhídrico, etc.

La importancia de estos procesos radica en la génesis de cambios conformacionales, degradación y desarrollo anómalo de las proteínas, lo que provoca alteraciones importantes en múltiples funciones biológicas: actividades enzimáticas, transmisión de señales, regulación metabólica y genética, etc.

Los aminoácidos cisteína y metionina son particularmente susceptibles al ataque por las ROS.

En lo que se refiere a los ensayos relacionados con la oxidación peptídica cabe destacar que la medida de glutatión reducido (GSH) y de glutatión oxidado (GSSG), así como de las proteínas S glutationadas en sangre, se considera un indicador del estatus del EO en humanos.

La depleción de GSH total (GSH+2 GSSG + glutatión unido a proteínas,) así como una disminución de la relación GSH/GSSG son indicadores de EO/EN, relacionados con diversas patologías entre las que destacan las enfermedades neurodegenerativas (30,31).

Las RNS inducen modificación en proteínas, destaca la modificación en el aminoácido tirosina por su papel en la transducción de señales en fenómenos como la fosforilación. El análisis de productos de nitración como la 3-nitrotirosina (NO₂-Tir), marcador estable de oxidantes derivados de NO·, o los productos halogenados de tirosina como cloro-tirosina o 3-bromotirosina y cuya medición mediante métodos tales como HPLC (cromatografía líquida de alta resolución), GC-MS (cromatografía de gases-espectrometría de masas), LC-MS (cromatografía líquida-espectrometría de masas) se han utilizado para el estudio del EO/EN implicados en patologías ya mencionadas en este trabajo (32-34).

4.3. Daño oxidativo en ADN

Las ROS generadas bajo diferentes condiciones pueden dañar el ADN celular, concretamente los radicales hidroxilos, generan una amplia variedad de productos, formados por modificación de las bases y azúcares que pueden medirse por HPLC, GC-MS, LC-MS y técnicas inmunoquímicas (35).

Las modificaciones de las bases nucleotídicas se producen frecuentemente en la guanina, dando lugar a la base modificada, 8-oxo-2-desoxiguanina (8-oxo-dG), altamente mutagénica. Su presencia en las estructuras de ADN induce la incorporación de bases nucleotídicas erróneas por la ADN polimerasa durante la replicación y por ello es la molécula medida usualmente. Un problema que se plantea es la limitada disponibilidad de tejido humano para obtener ADN y que en ningún caso se sabe en qué parte del ADN se produce el daño oxidativo.

En resumen, la degradación de las bases nitrogenadas, transformación, translocación y reticulación de las proteínas, se traducirá en

Tabla 4:
Reacciones moleculares de las ROS con macromoléculas.

Macromolécula	Modificación	Especie causante de la modificación	Producto
DNA	Ruptura de la doble cadena	$\cdot\text{OH}$	8-hidroxi-deoxiguanosina
	Oxidación de bases púricas y pirimidínicas	$\cdot\text{OH}$ (reacción de Fenton)	8-hidroxi-guanina, 8-hidroxi-guanosina, 8-hidroxi-adenina, glicol timina, fapy-guanina, 5-hidroxiuracilo y fapy-adenina
	Desaminación del DNA: transición GC a AT	Otras ROS	
	Transiciones GC a TA	ONOO^-	8-oxo-deoxiguanosina, 8-nitrodesoxiguanosina
	Transiciones GC a TA, GC a AT y AT a GC	N_2O_3	
Lípidos	Peroxidación lipídica	$\cdot\text{OH}$	HNE, MDA, hidroperóxidos, isoprostanos
	Eliminación H^+ o inserción en los dobles enlaces	NO_2	
	Inducción del ONO^-	$\text{NO}\cdot$	
	Reacción con las ROS	$\text{NO}\cdot$ ANTIOXIDANTE	
Glúcidos	Formación de AGEs (<i>Advanced Glycation Ends</i>)	$\cdot\text{OH}$	Los aldehídos o cetonas de estructuras glucídicas pueden reaccionar con grupos amino de proteínas formando "bases de Schiff" generadores de "productos Amadori" precursores de AGEs (acumulables en el cerebro envejecido)
Proteínas y aminoácidos	Oxidación de proteínas y aminoácidos libres.	O_2^- y $\cdot\text{OH}$	Oximas. Aldehído y ácido carboxílico de proteína
	Reacción con grupos tiol	Hidrógeno + ONOOH	Cisteína y un anión hidroxilo

alteraciones funcionales relacionadas con el envejecimiento, carcinogénesis, enfermedades neurodegenerativas, autoinmunes y cardiovasculares, entre otras (36).

Así mismo, las ROS también están implicadas en la transducción de señales provenientes de citocinas y del factor nuclear-kB (NF-kB). Particularmente, constituyen la base molecular del efecto biocida, mediante la formación del radical superóxido y otras especies relacionadas tras la activación de neutrófilos y macrófagos (37-38).

En la tabla 4 se recogen las reacciones que llevan a cabo las ROS y RNS con las macromoléculas (13,17).

La generación de ROS/RNS está presente en numerosos procesos metabólicos y destaca por la intensidad de su producción la CTE mitocondrial, donde se genera uno de las ROS de más relevancia, el O_2^- (15).

5. Sistemas de defensa antioxidante

Para contrarrestar el efecto nocivo de las ROS, los organismos aerobios cuentan con sistemas de defensa antioxidante, conformados por enzimas y compuestos moleculares que evitan la formación incontrolada y excesiva de RL y promueven la neutralización, eliminación y bloqueo de su reactividad en cadena.

Se considera que una sustancia tiene capacidad antioxidante si está presente en baja concentración respecto al sustrato oxidable y puede retrasar o inhibir significativamente la oxidación de dicho sustrato.

Los niveles bajos de antioxidantes o su inhibición, en el caso de las enzimas antioxidantes, causan EO y pueden dañar o destruir las células. Por esta razón los sistemas de defensa antioxidante tienen un papel clave reduciendo la aparición de determinadas enfermedades y patologías y potenciando el sistema inmunológico.

Existen evidencias epidemiológicas que sustentan el papel patológico de los RL en los procesos biológicos y que se han demostrado por la correlación entre la incidencia de inflamación y degeneración y una baja concentración de antioxidantes.

En condiciones fisiológicas, la concentración de antioxidantes es superior a la de especies reactivas, y la formación de ROS tiene lugar de forma continua, pero controlada (39,40).

5.1. Sistema antioxidante endógeno

Los mecanismos antioxidantes endógenos pueden clasificarse según su naturaleza enzimática o no.

Las enzimas antioxidantes constituyen la primera y mejor línea de defensa celular frente al daño oxidativo y degradan el $O_2\cdot^-$ y el H_2O_2 , transformándolo en moléculas menos nocivas, mediante mecanismos bioquímicos específicos. La segunda línea de defensa la forman moléculas no enzimáticas que actúan también sobre los RL (41).

El **sistema antioxidante enzimático** está integrado por tres enzimas principales que trabajan desactivando selectivamente los RL, la SOD, catalasa y glutatión-peroxidasa (GPx). La protección antioxidante eficaz se consigue gracias a la actuación sincronizada de estas tres enzimas principales, apoyada por el resto de antioxidantes, con un papel no menos importante.

La **SOD** se encarga de la dismutación de radicales $O_2\cdot^-$ a O_2 y H_2O_2 y esta última, aunque es más estable, sigue teniendo alta reactividad. Existen varias isoformas de SOD: la Cu/Zn-SOD (citoplásmica, 32 kDa; SOD-1), Mn-SOD (mitocondrial, 96 kDa; SOD-2) y Cu/Zn-SOD extracelular (fluidos extracelulares como linfa, líquido sinovial o plasma, 135 kDa; SOD-3). Es importante resaltar que los sujetos con síndrome de Down muestran un aumento de copias de la

Cu/Zn-SOD generando un incremento de ROS, concretamente del producto H_2O_2 ; este producto, a pesar de mejorar la estabilidad, sigue manteniendo su alta reactividad, y sus implicaciones patológicas, lo que se traduce en un incremento del EO en este grupo de pacientes (42).

Las **catalasas** llevan a cabo la dismutación y peroxidación de dos moléculas de H_2O_2 en O_2 . Es una de las actividades catalíticas más rápidas conocidas, con una constante de Michaelis (Km) y velocidad máxima (Vmax) para el agua muy altas, convirtiéndose en el agente antioxidante más efectivo contra esta especie. Presentan también actividad peroxidasa sobre muchas sustancias orgánicas como el etanol.

La **GPx** cataliza la reducción de peróxidos (ROOH, inclusive el H_2O_2) a alcoholes (ROH), aprovechando el potencial reductor del GSH. El GSH presenta actividad para la eliminación de lipoperóxidos y xenobióticos, a la vez que se oxida a GSSG. Su Km para el agua es reducida, encargándose de la degradación de estas especies a bajas concentraciones y actuando como mecanismo complementario de la catalasa. Existe una GPx selenio-dependiente de localización intralipídica, con acción directa sobre hidroperóxidos formados en las membranas celulares.

En este sistema participan junto a la GPx, la glutatión reductasa, la glutatión transferasa, glutaredoxinas, NADPH y GSH. Respecto a la GPx selenio-dependiente, existen distintas isoformas (GPx1 a GPx7 y una probable GPx8 de membrana) con diferentes localizaciones (citoplásmico, plasma, líquido seminal, otras).

Otras enzimas como glutatión-reductasa (GR), glutatión-S-transferasa (GST) y γ -glutamil cisteinil-sintetasa (GCS) colaboran indirectamente con la GPx, contribuyendo a regular el GSH intracelular, uno de los principales antioxidantes celulares no enzimáticos.

La tioredoxina (TRX) y la tioredoxina-reductasa, de las que depende el **sistema TRX**, actúan como sistema complementario para el control del entorno redox celular. Este sistema está involucrado en la regulación redox, mediante la catálisis de intercambios tiol-disulfuro. Como consecuencia se generan modificaciones de la actividad enzimática de varias proteínas o en la transferencia de electrones a reductasas tiol-dependientes como las peroxiredoxinas (Prx), con un papel clave en la degradación de H_2O_2 , hidroperóxidos y peroxinitritos. Las Prx tienen una eficacia catalítica

notablemente alta, con velocidades de reacción similares a las de otras enzimas antioxidantes como la GPx y la catalasa y están ampliamente distribuidas en diferentes orgánulos (30,43,44).

Tanto el GSH como otras moléculas que contienen tioles, como la tiorredoxina (Trx), tienen alto poder reductor y, consecuentemente, antioxidante, ya que pueden ceder un electrón a las especies liberadoras de ROS, disminuyendo su reactividad.

La G6PDH cataliza una de las reacciones del ciclo de las pentosas generadora de NADPH+H⁺. Su deficiencia desencadena lesión oxidativa eritrocitaria, por la limitación de la producción de NADPH, necesario para regenerar el GSH, provocando acúmulo de O₂^{·-} y H₂O₂.

Algunos metales, como el selenio, zinc, magnesio, cobre, hierro, entre otros, forman parte del sitio activo de las enzimas antioxidantes, de modo que actúan como cofactores, tratándose pues, de elementos clave en la defensa y que contribuyen a aumentar la función de estas enzimas. Un ejemplo es el selenio que forma parte de la GPx. Los restantes elementos minerales están implicados en el centro catalítico de la familia de las SOD (41,45,46).

El **sistema antioxidante no enzimático** incluye compuestos de bajo peso molecular, que actúan como depuradores de RL. Entre ellos, destaca el GSH, un tripéptido protector frente a diferentes especies oxidantes, con un papel clave en numerosos desórdenes neurodegenerativos.

Dentro de sus propiedades figura su capacidad para conjugarse con compuestos especialmente tóxicos, solubilizarlos y facilitar su excreción biliar, otorgándole la capacidad de ser uno de los antioxidantes endógenos más eficaces que nos ofrece la naturaleza.

Además de los sistemas de protección antioxidante, enzimáticos y no enzimáticos, existen otros mecanismos endógenos que contribuyen a paliar el posible daño oxidativo.

Como factores estructurales protectores ante el EO destacan en los ácidos nucleicos la cromatina compacta, la presencia de histonas y la formación de complejos estables del ADN con las proteínas (47).

El plasma puede estabilizar las ROS de vida media mayor, como O₂^{·-} o H₂O₂, previniendo reacciones con iones metálicos catalíticos que pueden generar especies más nocivas. Por esta razón el estatus antioxidante del plasma es el resultado concomitante de muchos compuestos e interacciones metabólicas sistémicas.

5.2. Sistema antioxidante exógeno

Además de la defensa endógena, parece cada vez más clara la protección que desempeña el consumo de productos exógenos, principalmente a través de la dieta, especialmente frutas y verduras.

Entre ellos se encuentra la vitamina C o ácido ascórbico, que actúa frente a las especies moleculares O₂^{·-}, ·OH, H₂O₂ y oxígeno singlete. Su regeneración a ácido ascórbico utiliza sistemas dependientes de GSH.

La vitamina E o alfa-tocoferol, antioxidante lipofílico, es eficaz en la defensa y mantenimiento de fosfolípidos de membrana. El suplemento en la dieta ha demostrado reducción del EO y prevención de fenómenos asociados como el deterioro de la función mitocondrial. También se ha relacionado con la longevidad de la especie humana.

Los carotenoides, junto con la vitamina E, son los antioxidantes más importantes contenidos en las membranas celulares. Los principales son alfa y beta-caroteno, luteína, licopeno, criptoxantina y zeaxantina, en los que se han descrito efectos antimutagénicos.

La melatonina es otra de las moléculas biológicas de actualidad a la que se le atribuyen acciones protectoras y antioxidantes y existen evidencias que demuestran que puede actuar recolectando RL. Además, regula la expresión génica de enzimas antioxidantes como la SOD y GPx (48).

Otros compuestos como flavonoides, ácidos fenólicos, ácido úrico, aminoácidos, coenzima Q, ubiquinona, entre otros, también forman parte de este grupo de antioxidantes no enzimáticos (48,49).

La capacidad antioxidante celular está determinada por los sistemas enzimáticos, mientras que la plasmática está asociada a la concentración de antioxidantes de bajo peso molecular suplementados en la dieta. Estos compuestos son rápidamente consumidos y necesitan ser incorporados para mantener el balance frente a las especies oxidantes (41).

5.3. Regulación de las enzimas antioxidantes

Los enzimas antioxidantes y sus reactivos se encuentran simultáneamente en el interior de las células y tejidos, presentando un amplio rango de proporciones y actividades. En cada momento, su regulación dependerá de la concentración de O₂ ambiental y de la existencia de señales exógenas de naturaleza tanto física como química. La regulación

redox involucra una variedad de redes de señalización complejas, donde la concentración de tioles celulares y de ROS parece jugar un papel fundamental en la determinación del crecimiento o muerte celular, así como en la activación o inactivación de diferentes mecanismos antioxidantes. La regulación de los enzimas antioxidantes puede tener lugar mediante control de su actividad enzimática o mediante mecanismos de control de la expresión génica, que serán diferentes para cada tipo específico de célula, tejido u órgano (30,50,51).

Varios sensores de H_2O_2 y proteínas que participan en diferentes vías de señalización regulan la actividad transcripcional, mediante su unión al ADN en función del estado redox de la célula. Entre ellos figuran los factores de transcripción AP-1, FoxO, Nrf2, CREB, HSF1, HIF-1, TP53, NF- κ B, Notch y SP1, que inducen la expresión de ciertos genes como los necesarios para la detoxificación de oxidantes y para la reparación y mantenimiento de la homeostasis celular. La regulación de estos factores, mediada por H_2O_2 , puede ocurrir además a otros niveles como la síntesis/degradación, transactivación o el transporte núcleo-citoplasma.

En general, las respuestas primarias frente al EO se modulan principalmente mediante la actuación combinada de las vías del NF- κ B, AP1 y MAP-quinasas, siendo la vía del Nrf2 también necesaria para inducir las defensas antioxidantes y minimizar el daño oxidativo, cuando este aumenta. Si estas defensas son insuficientes, la célula acabará induciendo la permeabilización de la membrana mitocondrial para disminuir la producción de ROS, lo que originará la alteración del equilibrio redox y finalmente la apoptosis (50,52).

Junto a esta forma de control, las modificaciones postrasduccionales mediadas por redox, topológicamente confinadas a grupos tiol se consideran importantes mecanismos moleculares, mediadores de muchas respuestas antioxidantes. La S-glutationilación es la modificación postrasduccional en los residuos de cisteína y consiste en la adición reversible de glutatión, pudiendo producir activación o inactivación de la función de la proteína y permitiendo modular diferentes vías celulares, así como alterar perfiles de expresión génica, mediante la unión a diferentes factores de transcripción como Nrf2 o NF- κ B.

Por último, los microARN sensibles a redox han surgido en los últimos años como actores clave en la regulación postranscripcional de la expresión

génica mediada por redox. El término “redoximiRs” se ha acuñado para definir el subconjunto de microARNs que regulan o están regulados por el estado redox de la célula (51). Estos se encuentran implicados en patologías tales como enfermedades cardiovasculares o neurodegenerativas a través de su implicación en el sistema GSH/GSSG o el estrés del retículo endoplasmático.

Además de las mencionadas, otras enzimas como la glutamato-cisteína ligasa, necesaria para sintetizar glutatión, y proteínas como acuaporinas o los exportadores de GSSG, que facilitan el transporte de ROS o de sus productos a través de las membranas biológicas, son también importantes en las respuestas adaptativas al EO y se encuentran controladas transcripcional, traduccional y postraduccionalmente. Todos estos mecanismos consiguen asegurar que, igual que existe un pH óptimo para cada espacio celular o subcelular, también existe un patrón óptimo de prooxidantes y antioxidantes para cada condición fisiológica (50).

6. Conclusiones

El término EO aparece vinculado al comportamiento dual del oxígeno por su papel fundamental en el metabolismo energético y su implicación en la toxicidad celular, siendo la mitocondria el mayor generador de energía y, a su vez, de ROS.

La reactividad de las ROS y RNS a nivel celular es contrarrestada por los sistemas antioxidantes endógenos principalmente, tanto enzimáticos como no enzimáticos, y a los sistemas antioxidantes exógenos, de aporte fundamentalmente dietético.

El desequilibrio entre la producción de ROS y RNS y la actividad de los sistemas antioxidantes se considera la base fundamental de la patogenia de la mayoría de las enfermedades.

En este trabajo se recoge una descripción de los procesos oxidorreductivos generadores de moléculas activas química y molecularmente y su afectación a las estructuras básicas celulares, puntal básico de la iniciación de las diferentes patologías, con el objetivo de establecer los pilares para la identificación de herramientas útiles en la identificación de ROS y RNS que son de utilidad en el diagnóstico de los diferentes grupos de patologías.

Referencias

1. Youle RJ. Mitochondria—Striking a balance between host and endosymbiont. *Science*. 2019;365: eaaw9855.
2. Balaban RS, Nemoto S, Finkel T. Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell*. 2005;120:483-95.
3. Quinlan CL, Orr AL, Perevoshchikova IV, Treberg JR, Ackrell BA, Brand MD. Mitochondrial complex II can generate reactive oxygen species at high rates in both the forward and reverse reactions. *J Biol Chem*. 2012;287:27255-64.
4. Mailloux RJ. An update on mitochondrial reactive oxygen species production. *Antioxidants (Basel)*. 2020;9:472.
5. Zhao RZ, Jiang S, Zhang L, Yu ZB. Mitochondrial electron transport chain, ROS generation and uncoupling (Review). *Int J Mol Med*. 2019;44:3-15.
6. From the American Association of Neurological Surgeons (AANS), American Society of Neuroradiology (ASNR), Cardiovascular and Interventional Radiology Society of Europe (CIRSE), Canadian Interventional Radiology Association (CIRA), Congress of Neurological Surgeons (CNS), European Society of Minimally Invasive Neurological Therapy (ESMINT), European Society of Neuroradiology (ESNR), European Stroke Organization (ESO), Society for Cardiovascular Angiography and Interventions (SCAI), Society of Interventional Radiology (SIR), Society of NeuroInterventional Surgery (SNIS), and World Stroke Organization (WSO), Sacks D, Baxter B, Campbell BCV, Carpenter JS, Cognard C, Dippel D, et al. Multisociety Consensus Quality Improvement Revised Consensus Statement for Endovascular Therapy of Acute Ischemic Stroke. *Int J Stroke*. 2018 ;13:612-32.
7. Navarrete ML, Cerdeño MC, Serra MC, Conejero R. Síndrome de distrés mitocondrial y de la microcirculación en el paciente crítico. Implicaciones terapéuticas. *Med Intensiva*. 2013;37:476-84.
8. Peoples JN, Saraf A, Ghazal N, Pham TT, Kwong JQ. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in heart disease. *Exp Mol Med*. 2019;51:1-13.
9. Zhou H, Toan S. Pathological Roles of Mitochondrial Oxidative Stress and Mitochondrial Dynamics in Cardiac Microvascular Ischemia/Reperfusion Injury. *Biomolecules*. 2020;10:85.
10. Hawkins CL, Davies MJ. Detection and characterisation of radicals in biological materials using EPR methodology. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1840:708-21.
11. Lushchak VI. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Ukr Biochem J*. 2015;87:11-8.
12. Gutiérrez-Salinas J, Mondragón-Terán P, García-Ortiz L, Hernández-Rodríguez S, Ramírez-García S, NúñezRamos NR. Breve descripción de los mecanismos moleculares de daño celular provocado por los radicales libres derivados de oxígeno y nitrógeno. *Rev Esp Med Quir*. 2014;19:446-54.
13. Pedraza Chaverri J, Cárdenas Rodríguez N, Chirino YI. El óxido nítrico y las especies reactivas de nitrógeno. Aspectos básicos e importancia biológica. *Educ Química*. 2018; 17:443-51.
14. Neha K, Haider MR, Pathak A, Yar MS. Medicinal prospects of antioxidants: A review. *Eur J Med Chem*. 2019;178:687-704.
15. Tain RW, Scotti AM, Li W, Zhou XJ, Cai K. Influence of free radicals on the intrinsic MRI relaxation properties. *Adv Exp Med Biol*. 2017;977:73-9.
16. Carocho M, Ferreira ICFR. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food Chem Toxicol*. 2013;51:15-25.
17. Li YR, Trush M. Defining ROS in Biology and Medicine. *React Oxyg Species (Apex)*. 2016;1:9-21.
18. Szabó C, Ischiropoulos H, Radi R. Peroxynitrite: Biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics. *Nat Rev Drug Discov*. 2007;6:662-80.
19. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*. 2007;39:44-84.
20. Omer N, Rohilla A, Rohilla S, Kushnoor A. Nitric Oxide: Role in Human Biology. *IJPSPDR*. 2012;4:105-9.
21. Jakubczyk K, Dec K, Kałduńska J, Kawczuga D, Kochman J, Janda K. Reactive oxygen species - sources, functions, oxidative damage. *Pol Merkur Lekarski*. 2020;48:124-7.
22. Brieger K, Schiavone S, Miller FJ, Krause KH. Reactive oxygen species: From health to disease. *Swiss Med Wkly*. 2012;142:w13659.
23. Sisein EA. Review Article Biochemistry of Free Radicals and Antioxidants. *Sch Acad J Biosci*. 2014;2:110-8.
24. Scandalios JG. Oxidative stress: Molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Braz J*

- Med Biol Res. 2005;38:995-1014.
25. Witztum JL. The oxidation hypothesis of atherosclerosis. *Lancet*. 1994;344:793-5.
 26. Firuzi O, Miri R, Tavakkoli M, Saso L. Antioxidant Therapy: Current Status and Future Prospects. *Curr Med Chem*. 2012;18:3871-88.
 27. Esterbauer H, Gebicki J, Puhl H, Jürgens G. The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Radic Biol Med*. 1992;13:341-90.
 28. Parthasarathy S, Rankin SM. Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. *Prog Lipid Res*. 1992;31:127-43.
 29. Hoppe G, O'Neil J, Hoff HF. Inactivation of lysosomal proteases by oxidized low density lipoprotein is partially responsible for its poor degradation by mouse peritoneal macrophages. *J Clin Invest*. 1994;94:1506-12.
 30. Couto N, Wood J, Barber J. The role of glutathione reductase and related enzymes on cellular redox homeostasis network. *Free Radic Biol Med*. 2016;95:27-42.
 31. Papathanasiou IV, Fradelos EC, Malli F, Stefanidis I, Zintzaras E, Doxani C. A Systematic review of observational studies assessing the impact of oxidative stress in cognitive decline. *Wiad Lek*. 2021;74:1995-2003.
 32. Bruno G, Wenske S, Lackmann JW, Lalk M, von Woedtke T, Wende K. On the Liquid Chemistry of the Reactive Nitrogen Species Peroxynitrite and Nitrogen Dioxide Generated by Physical Plasmas. *Biomolecules*. 2020;10:1687.
 33. Yoon S, Eom GH, Kang G. Nitrosative Stress and Human Disease: Therapeutic Potential of Denitrosylation. *Int J Mol Sci*. 2021;22:9794.
 34. Duncan MW. A review of approaches to the analysis of 3-nitrotyrosine. *Amino Acids*. 2003;25:351-61.
 35. Mañon Rossi W, Garrido G, Núñez Sellés A.J. Biomarkers of oxidative stress in antioxidant therapy. *J Pharm Pharmacogn Res*. 2016;4:62-83.
 36. Pisoschi AM, Pop A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *Eur J Med Chem*. 2015;97:55-74.
 37. Gorrini C, Harris IS, Mak TW. Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy. *Nat Rev Drug Discov*. 2013;12:931-47.
 38. Sáez GT, Bannister WH, Bannister J V. Free radicals and thiol compounds — The role of glutathione against free radical toxicity. In: Viña J, editor. *Glutathione: Metabolism and Physiological Functions*. Reissued by CRC Press, 2017:237-54.
 39. Mariaca CJ, Zapata M, Uribe P. Oxidación y antioxidantes: hechos y controversias. *Rev la Asoc Colomb Dermatología y Cirugía Dermatológica*. 2016;24:162-73.
 40. Sánchez-Valle V, Méndez-Sánchez N. Estrés oxidativo, antioxidantes y enfermedad. *Med Sur*. 2013;20:161–8.
 41. Avello M, Suwalsky M. Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección. *Atenea (Concepción)*. 2006:161-72.
 42. De La Torre R, Casado A, López-Fernández E, Carrascosa D, Ramírez V, Sáez J. Overexpression of copper-zinc superoxide dismutase in trisomy 21. *Experientia*. 1996;52:871-3.
 43. Yang HY, Lee TH. Antioxidant enzymes as redox-based biomarkers: a brief review. *BMB Rep*. 2015;48:200–8.
 44. Lu J, Holmgren A. The thioredoxin antioxidant system. *Free Radic Biol Med*. 2014;66:75-87.
 45. De la Peña Fernández A, Redondo Bellón P. Radicales libres y mecanismos antioxidantes. Generalidades y aplicaciones en la práctica clínica. *Rev Clin Esp*. 1997;197:434-46.
 46. Montero M. Los Radicales Libres y las Defensas Antioxidantes. Revisión. *An. Fac. med*. 1996;57:278-81.
 47. Oré R, Castillo O, Sandoval M, Valdivieso R, Oriundo R, Woolcott OO, et al. Respuesta del sistema antioxidante en varones sanos, frente a hiperglicemia aguda inducida. *An. Fac. med*. 2009;70:186-92.
 48. Díaz López B. Acción de la melatonina en el proceso de envejecimiento. *Rev Esp Geriatr Gerontol*. 2001;36:262-9.
 49. Vilaplana Batalla M. Antioxidantes presentes en los alimentos: vitaminas, minerales y suplementos. *Offarm Farm y Soc*. 2007;26:79-86.
 50. Sies H, Berndt C, Jones DP. Oxidative Stress. *Annu Rev Biochem*. 2017;86:715-48.
 51. Morris G, Puri BK, Walker AJ, Berk M, Walder K, Bortolasci CC, et al. The compensatory antioxidant response system with a focus on neuroprogressive disorders. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2019;95:109708.
 52. Espinosa-Diez C, Miguel V, Mennerich D, Kietzmann T, Sánchez-Pérez P, Cadenas S, et al. Antioxidant responses and cellular adjustments to oxidative stress. *Redox Biol*. 2015;6:183-97.