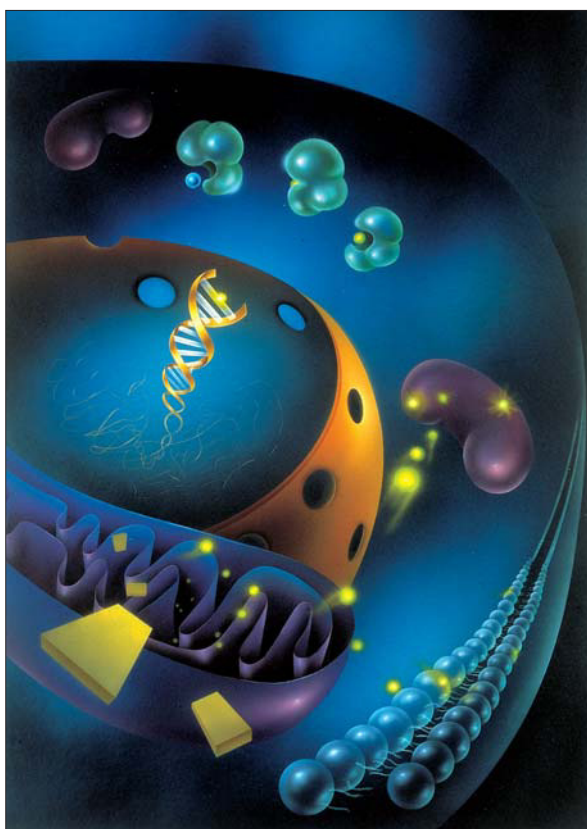


Influencia de los radicales libres en el envejecimiento celular

FERNANDO PAREDES SALIDO y JUAN JOSÉ ROCA FERNÁNDEZ
Farmacéuticos.



Se denominan radicales libres a aquellas moléculas que tienen un electrón desapareado en su orbital más externo. Esto les confiere una capacidad de reacción muy elevada, por lo que son capaces de actuar en los sistemas biológicos produciendo cambios en la composición química o en la estructura de los elementos celulares que los hace incompatibles con la vida. En el presente trabajo se aborda la influencia de los radicales libres en el envejecimiento celular.

Los radicales libres se pueden formar a partir de muchas moléculas, pero los derivados de la molécula del oxígeno son los que tienen mayor importancia en patología humana.

Los organismos vivos han diseñado estrategias genéticas para defenderse de las agresiones de los radicales libres. Se trata de las enzimas que aceleran su inactivación, como la

superóxidodismutasa (SOD), la catalasa, y la glutatión peroxidasa, entre otras. Hay que destacar también las moléculas que existen fisiológicamente, como la ceruloplasmina, el ácido úrico, las vitaminas antioxidantes, los betacarotenos, la cisteína, y las sustancias que actúan como agonistas del glutatión, como la N-acetilcisteína.

Radicales libres

Aunque hace ya más de medio siglo que se sabe que el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) se forma de manera natural en los seres vivos, hasta 1969 no se comenzaron a conocer los aspectos biológicos de los radicales superóxido (O_2^-) e hidroxilo (OH^\cdot). Por aquellos mismos años, McCordy

y Fridovich descubrieron la superóxido dismutasa (SOD), una enzima que transforma el radical superóxido en H_2O_2 y O_2 .

Es bien sabido que los electrones se disponen alrededor de los núcleos de los átomos en capas perfectamente definidas que se denominan orbitales. Cada orbital contiene un máximo de dos electrones que se hallan apareados, es decir, tienen espines opuestos. La mayoría de las sustancias presentes en el organismo contienen sólo electrones apareados y suelen ser, por tanto, químicamente estables. Los radicales son especies químicas que contienen orbitales desapareados en su orbital más externo. Estos electrones desapareados les confieren una enorme reactividad química que le conducirá a interactuar rápidamente con otras moléculas.

Estos radicales pueden también reaccionar con una especie química estable. El radical puede, en este caso, cederle su electrón desapareado, tomar uno de esta molécula para aparear su electrón, o unirse a ella. En cualquiera de los tres casos la situación resultante es la génesis de otro radical químicamente agresivo.

El oxígeno es una molécula básicamente oxidante, hasta el punto de que es el principal responsable de la producción de especies oxidantes en las células de metabolismo aerobio.

Estrés oxidativo

El radical hidroxilo ($\cdot OH$) procede de la rotura del enlace covalente entre el oxígeno y el hidrógeno de una molécula de agua, reacción en la que también se genera otro oxidante, el $\cdot H$.

El $\cdot OH$ es el radical más reactivo que nuestra química conoce. Puede interactuar con las bases nitrogenadas de los ácidos nucleicos (ADN y ARN) y alterar la información genética de las células, o estimular la peroxidación lipídica, en la que el $\cdot OH$ ataca a los ácidos grasos poliinsaturados, convirtiéndolos a su vez en oxidantes. Un sólo radical $\cdot OH$ puede transformar cientos de moléculas de ácidos grasos en hidroperóxidos, que al descomponerse produ-

Tabla 1. Compuestos de oxígeno reactivos de interés en el estrés oxidativo

Compuesto	Características
O_2^- (anión superóxido)	Se forma en reacciones de autooxidación
HO_2 (radical perhidroxilo)	Forma hidrogenada del anterior. Más liposoluble
H_2O_2 (peróxido de hidrógeno)	No es un radical libre, pero tiene una acción oxidante
OH (radical hidroxilo)	Es el radical libre más reactivo que se conoce
RO (radical alkoxy)	
ROO (radical peroxi)	
1O_2 (oxígeno singlete)	

cen aldehídos, auténticos venenos para las membranas celulares.

El radical peroxilo (ROO) tiene una menor reactividad que el anterior.

La molécula de H_2O_2 y la del ácido hipocloroso ($HOCl$) se comportan como oxidantes, al igual que la mayoría de los radicales libres, aunque sería más correcto referirse a ellos como especies reactivas de oxígeno (ERO).

La unión de oxígeno con nitrógeno puede dar lugar a la formación de óxido nitroso, capaz de inducir la peroxidación lipídica.

Los iones Fe^{+++} y Cu^{++} actúan como catalizadores en la formación de radicales hidroxilo. En presencia de estos iones, el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) reacciona violentamente con moléculas de oxígeno dando lugar a radicales hidroxilo.

Otras sustancias como el ácido ascórbico son capaces de reducir el ión férrico (Fe^{+++}) a ferroso (Fe^{++}), que cataliza la producción de oxidantes. Es muy importante mantener estos metales fuera del alcance de los oxidantes.

En la tabla 1 se incluyen los compuestos de oxígeno reactivos de interés en el estrés oxidativo y sus comentarios.

Procedencia de los radicales libres

Los oxidantes, aunque son químicamente muy inestables y altamente tóxicos para las células, se producen en condiciones normales en el interior de éstas. Se estima que el 5% de todo el oxígeno que consumimos en las etapas finales del metabolismo oxidativo sigue la llamada vía univalente. Varios de los metabolitos intermedios que se generan son radicales libres. Por tanto, el metabolismo normal es una fuente de radicales libres.

La xantina oxidasa (enzima responsable de la conversión de hipo-

xantina en ácido úrico) también genera radicales libres (radicales superóxido).

La segunda fuente de radicales libres es también endógena y está constituida por el metabolismo de los fagocitos (neutrófilos y macrófagos). Éstos están dotados de diversas enzimas líticas (proteasas, lipasas, nucleasas), así como de vías metabólicas (mieloperoxidasa en el caso de neutrófilos) que generan diversas especies químicas agresivas (peróxido de hidrógeno, radicales superóxido e hidroxilo).

Los oxidantes pueden proceder del exterior, ya sea directamente o como consecuencia del metabolismo de ciertas sustancias. De las fuentes exógenas de radicales libres, el tabaquismo es una de las más importantes. El humo del tabaco es una mezcla de sustancias entre las cuales destacan los óxidos de nitrógeno y de azufre. Otros componentes del humo del tabaco pueden interactuar con el citocromo P450 y con el catabolismo del ácido araquidónico y de las flavonas.

Los óxidos de nitrógeno pueden también proceder de la contaminación atmosférica.

Los hidrocarburos presentes en la polución ambiental constituyen, asimismo, una fuente nada despreciable de radicales libres.

El ozono (O_3) es una ERO dotada de un extraordinario poder oxidante. Puede proceder de la acción fotoquímica de las radiaciones electromagnéticas sobre el oxígeno, de los campos eléctricos o de la combustión de los carburantes. Su toxicidad se manifiesta tras exposiciones de pocas horas a concentración de tan sólo 3 o 4 partes por millón (ppm). Es muy poco abundante en las capas más bajas de la atmósfera (1 ppm), aunque su con-

centración aumenta a medida que nos elevamos sobre el nivel del mar hasta alcanzar las 10 ppm. El O³ puede oxidar grupos (-SH, -NH₂, -OH y -COH), y en los fosfolípidos de las membranas celulares induce la peroxidación lipídica.

Una concentración de oxígeno (O₂) demasiado elevada puede generar también una sobrecarga de ERO. Así, cuando la concentración de O₂ en el aire inspirado sobrepasa el 30-40%, las defensas antioxidantes comienzan a fracasar. Una concentración del 100% es altamente tóxica y sólo se suele resistir, sin que aparezcan lesiones, durante unos pocos minutos.

Acción de los radicales libres

Las sustancias oxidantes pueden actuar sobre cualquier molécula, aunque algunas parecen ser más susceptibles que otras a la acción de los antioxidantes. Especialmente sensibles resultan los ácidos nucleicos, las proteínas y los fosfolípidos presentes en todas las membranas de las células. La interacción de los oxidantes con estas moléculas producirá en ellas una modificación estructural, que se traducirá en una alteración funcional. El efecto que producen los oxidantes en los organismos vivos se ha denominado estrés oxidativo.

Aunque el H₂O₂ no es un radical libre, tiene suficiente agresividad para ser considerado ERO. Este radical libre, en presencia de iones hierro (Fe) o de cobre (Cu), reacciona activamente con el radical superóxido, lo que genera los perjudiciales radicales hidroxilo (·OH).

Lo malo no es que se generen radicales libres en el organismo, fenómeno que ocurre en situacio-

Tabla 2. Procesos en los que los oxidantes desempeñan algún papel etipatogénico

- Síndromes de isquemia/reperfusión*
- Accidentes vasculares cerebrales
 - Cardiopatía isquémica
 - Isquemia mesentérica
 - Neuropatías postraumáticas y postisquémicas
 - Transplantes y preservación de órganos
 - Necrosis tubular aguda

- Procesos inflamatorios*
- Colagenosis
 - Quemaduras
 - Infecciones
 - Pancreatitis
 - Bronquitis crónica/efisema
 - Síndrome de distrés respiratorio del adulto
 - Reacciones adversas a ciertos fármacos
 - Fibrosis pulmonar
 - Síndrome del aceite tóxico

- Procesos degenerativos*
- Lesiones seniles oculares (cataratas)
 - Arterioesclerosis
 - Envejecimiento
 - Complicaciones de la diabetes

- Otros*
- Úlcera péptica
 - Reacciones adversas a fármacos
 - Fibroplasia retrolental
 - Transformación cancerosa

nes normales, sino que exista un desequilibrio entre su producción y su eliminación, que es lo que determina que aparezca o no la enfermedad.

Parece que los radicales libres contribuyen de forma importante a la aparición de enfermedades tales como la arterioesclerosis, la artritis reumatoide, el enfisema, el

síndrome del distrés respiratorio del adulto o los procesos isquémicos del sistema nervioso central. Es posible que en otros procesos como las enfermedades fibrosantes, el síndrome del aceite tóxico, la úlcera péptica, ciertos cánceres, e incluso el envejecimiento, intervengan los radicales libres. Los procesos en los que los oxidantes desempeñan algún papel etipatogénico se incluyen en la tabla 2.

Fármacos como la bleomicina, la ciclofosfamida, nitrofurantoína o el paraquat pueden producir graves reacciones de toxicidad pulmonar, que se creen pueden estar mediadas por los radicales libres.

Antioxidantes

Algunos de los mecanismos antioxidantes conocidos son de naturaleza enzimática. De estos mecanismos, algunos actúan en el interior de las células, mientras que otros parecen ser más eficaces en el medio extracelular (fig. 1).

La catalasa es una enzima que destruye el peróxido de hidrógeno, transformándolo en H₂O (agua) y O₂. La principal función de la SOD parece ser la de eliminar específicamente el anión superóxido. Se sintetiza principalmente en los epitelios, particularmente el alveolar, y en los endotelios vasculares.

El glutatión (GSH) es el elemento central de muchos sistemas detoxificadores. Contiene un grupo sulfhidrilo (-SH), que lo hace idóneo para atenuar el efecto de los radicales libres.

La albúmina o ciertos ácidos grasos pueden actuar de manera no específica amortiguando el efecto oxidativo de los radicales libres. Los tocoferoles presentes en el suero y en las membranas de los hematíes protegen la integridad de las membranas celulares. Además, pueden neutralizar al oxígeno singlete (O₂), otro radical libre.

El ácido ascórbico tiene un efecto similar al de la catalasa, desdoblado el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno. También funcionan como antioxidantes circulantes la nicotinamida y el ADP.

Los carotenos, sustancias muy relacionadas con la vitamina A, debido a su gran liposolubilidad,

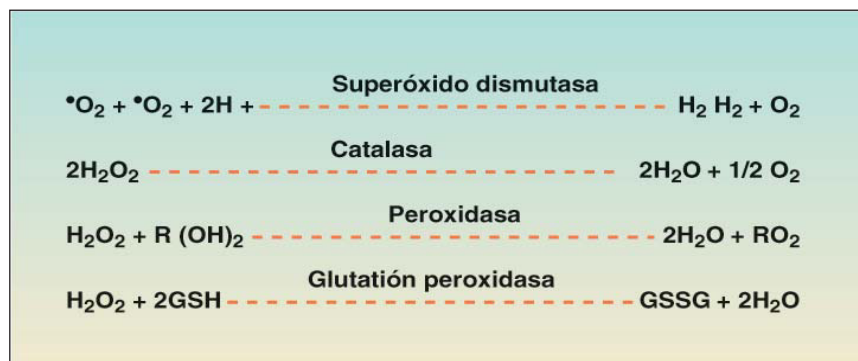


Fig. 1. Sistemas antioxidantes enzimáticos y reacciones que catalizan.

actúan prioritariamente en los compartimentos más hidrofóbicos, en los que penetran con gran facilidad. El licopeno (una sustancia de tipo carotenoide) es el mejor agente neutralizador del oxígeno singlete que se conoce.

El ácido úrico es otra molécula con capacidad antioxidante que neutraliza eficazmente al radical hidroxilo y peroxilo, y puede prevenir al ácido ascórbico de la oxidación. Un aminoácido como la taurina, presente tanto en el medio intracelular como el extracelular, es también un buen antioxidante, siendo su concentración más elevada en aquellas células que soportan más carga oxidativa.

Ciertos fármacos como la indometacina y otros antiinflamatorios no esteroideos, al bloquear la vía de la ciclooxigenasa, inhiben la hiperreactividad inducida por los antioxidantes inhalados.

De los antioxidantes extracelulares, hay que destacar las antiproteasas y la ceruloplasmina, principal inhibidor sérico de la peroxidación lipídica.

Existen, por último, antioxidantes artificiales que ya se han comenzado a emplear en medicina; entre ellos cabe destacar la N-acetilcisteína, el dimetilsulfóxido (DMSO), la etildimetiltiourea y el etanol. Los tres últimos poseen actividad antirradicales libres y pueden neutralizar el efecto del pernicioso radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$). En la tabla 3 aparecen los diferentes tipos de antioxidantes.

Envejecimiento

El glutatión es el tiol no proteico más abundante de la célula. La importancia de éste en el envejecimiento fue objeto de estudio inicialmente por Pinto y Dartley, y más tarde por Lang et al.

Harman estableció en 1956 que el envejecimiento se debía a la acción oxidante de los radicales libres. Por tanto, los antioxidantes pueden administrarse para disminuir los efectos del envejecimiento en el organismo.

Aproximadamente el 2% del oxígeno que utilizan las células no se convierte en agua, sino en espe-

Tabla 3. Tipos de antioxidantes

Enzimáticos

- Catalasa
- Superóxido dismutasa (SOD)
- Sistema glutatión
- Glucosa fosfato deshidrogenasa (genera NADPH)

No enzimáticos

Endógenos

- Glutatión
- NADPH
- Tocoferoles
- Ácido ascórbico
- Carotenos (albúmina, ceruloplasmina y ácidos grasos)

Exógenos

- Etanol
- Etildimetiltiourea
- Dimetilsulfóxido (DSO)
- N-acetilcisteína y otros tioles

cies reactivas de oxígeno. La mayoría de estas especies se originan en la mitocondria. De ahí la importancia de ésta y, especialmente, del ADN mitocondrial para entender el envejecimiento.

Para minimizar el efecto del envejecimiento se administran los antioxidantes. De hecho, el papel protector de los antioxidantes contra el envejecimiento ha sido objeto de estudio y está probado en la actualidad. Así, se ha observado que aquellos antioxidantes que protegen contra la oxidación del glutatión son efectivos para evitar la pérdida de las funciones fisiológicas que se observan en el envejecimiento.

Teoría del envejecimiento asociada a los radicales libres

El envejecimiento es un proceso multifactorial. Una de las teorías más importantes es la de los radicales libres, propuesta por Harman en 1956. De acuerdo con esta teoría, los radicales libres producidos en el metabolismo del oxígeno causan daño a las células, lo que conduce a alteraciones en el metabolismo. La idea general de esta teoría es que los antioxidantes celulares no son capaces de detoxificar las especies reactivas de oxígeno que se generan continuamente en la vida. Por ello, el envejecimiento celular está asociado a un estrés oxidativo crónico.

Se observó que las especies que tienen un consumo alto de oxígeno tienen una longevidad baja. Sin embargo, los pájaros y los primates constituyen excepciones. Esto puede explicarse por el hecho de que las mitocondrias de las células de estos animales producen menos radicales que las mitocondrias de otros. Por tanto, las especies más longevas producen menos radicales libres.

Varios autores han encontrado una relación entre la oxidación del glutatión y el envejecimiento de varios animales. Esta oxidación puede deberse a un aumento en la producción de radicales libres o a una disminución en su capacidad de detoxificación. De este modo, el envejecimiento se asocia con una disminución de las enzimas que catalizan la reducción del glutatión, como la glutatión reductasa o la glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa, y a un aumento de la actividad de las enzimas que favorecen la oxidación del glutatión como la glutatión peroxidasa o la transferasa.

Papel de las mitocondrias en el envejecimiento celular

Jaime Miquel et al propusieron la llamada teoría mitocondrial del envejecimiento celular. Esta teoría establece que la senescencia se debe a la acción de los radicales libres sobre el genoma mitocondrial de las células. Muchos estudios han demostrado que existe un daño al ADN mitocondrial, a las proteínas y a los lípidos. También se han observado cambios en la función y morfología de las mitocondrias asociado al envejecimiento.

Estas lesiones oxidativas en el ADN mitocondrial afectan a los genes mitocondriales, causando deleciones y mutaciones puntuales, lo cual puede contribuir a la aparición de enfermedades neurodegenerativas.

Muchos investigadores han observado que la actividad respiratoria global de las mitocondrias disminuye con la edad en hígado, músculo esquelético y cerebro. Las mitocondrias de animales viejos producen más radicales libres que las de los jóvenes y la tasa de producción de agua oxigenada presenta una correlación inversa con las

variaciones en la longevidad entre especies. Estos resultados demuestran que la generación de prooxidantes es un factor que influye en la velocidad del envejecimiento. Por tanto, el daño mitocondrial está estrictamente relacionado con el envejecimiento.

La peroxidación lipídica es un factor esencial en el proceso de senescencia de las células aeróbicas. Se necesita la formación de radicales de oxígeno en las membranas para que se inicie la peroxidación lipídica. Los peróxidos lipídicos se pueden romper y dar lugar a aldehídos que son un importante marcador de envejecimiento.

También se ha descrito daño a las proteínas atribuibles a radicales libres. Así, en el paso a células más viejas, se produce un descenso en la actividad de la proteasa alcalina neutra que degrada proteínas oxidadas. La acumulación de estas proteínas está relacionada con el deterioro de la función fisiológica.

Por otra parte, se ha demostrado que los radicales libres del oxígeno, modifican cada día unas 10.000 bases de ADN por célula. Las enzimas reparadores del ADN son capaces de eliminar la mayoría de las lesiones oxidativas, pero no todas. Estas lesiones se acumulan con la edad y la mayoría se originan en el ADN mitocondrial, no en el ADN nuclear. Se ha demostrado que la oxidación del ADN mitocondrial se asocia con la oxidación del glutatión mitocondrial.

La presencia de lesiones oxidativas demuestra que la protección antioxidante del GSH no es suficiente en el envejecimiento. Por ello, es importante incrementar la acción del glutatión mediante el aumento de la concentración de GSH.

Uso de los antioxidantes

La teoría de los radicales libres hace posible la utilización de antioxidantes, como las vitaminas C o E. Según esta teoría la administración de estas sustancias protegería contra el envejecimiento. Se ha observado que las vitaminas C o E protegen contra la oxidación del glutatión y el ADN mitocondrial. Asimismo, la vitamina E parece ser que protege del daño

oxidativo inducido por el ejercicio físico, tanto en individuos jóvenes como viejos.

Pero la administración de los antioxidantes no está exenta de riesgos. La cisteína puede tener un efecto prooxidante, la administración de betacaroteno en fumadores aumenta la incidencia de cáncer de pulmón, y la vitamina E disminuye la respuesta aguda de los neutrófilos durante el ejercicio físico. Por tanto, la administración de dosis elevadas de antioxidantes debe realizarse con precaución, pues no es una panacea, sino una posibilidad.

El oxígeno es una de las moléculas más necesarias para los seres vivos, pero también muestra toxicidad porque da lugar a la formación de los radicales libres

Conclusiones

El oxígeno es una de las moléculas más necesarias para los seres vivos, pero también muestra toxicidad porque da lugar a la formación de los radicales libres. Éstos causan modificaciones en los lípidos insaturados, en las proteínas y en el ADN. Este daño está implicado en la aparición de enfermedades como las cardiovasculares, el Parkinson o el cáncer. El daño al ADN parece estar en relación con el envejecimiento. Para evitar el exceso de radicales libres han aparecido una serie de defensas antioxidantes. Unas son endógenas, como el glutatión y las enzimas antioxidantes, y otras son exógenas, como las vitaminas E y C y los carotenoides.

Por otra parte, una gran cantidad de experimentos apoyan el papel de la teoría de los radicales

libres en el envejecimiento. El glutatión es un antioxidante endógeno fundamental. La senescencia está asociada a un descenso del glutatión reducido y a un aumento del glutatión oxidado. El glutatión mitocondrial es crítico y se oxida en mayor medida que el citosólico. Esta oxidación se relaciona con la oxidación del ADN mitocondrial. Asimismo, la administración de antioxidantes o de precursores del glutatión es muy importante para prevenir el envejecimiento. □

Bibliografía general

- Buja LM, Eigenbrodt EH. Apoptosis and necrosis. Basic types and mechanism of cell death. Arch Pathol Lab Med 1993;1208-14.
- Fridovich I. Superoxide dismutases. Adv Enzymol 1974;41:35-48.
- García de la Asunción J, Millán A, Plá R, Bruseghini L, Esteras A, Pallardó FV, Sastre J, Viña J. Mitochondrial glutathione oxidation correlates with age-associated oxidative damage to mitochondrial DNA. FASEB J 1996;10:333-8.
- Halliwell B, Gutteridge. Free radicals in biology and medicine. Oxford: Clarendon Press, 1989.
- Harman, D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry, J Gerontol 1956;11:298-300.
- Hazelton GA, Lang CA. Glutathione contents of tissues in the aging mouse. Biochem J 1980;188:25-30.
- Jankovic BD. Neuromodulation. From phenomenology to molecular evidence. Ann NY Acad Sci 1994;1-38.
- Miquel J, Economos AC, Fleming J y Johnson JE Jr. Mitochondrial role in cell aging. Exp Gerontol 1980;15:579-91.
- Re P, Bartley WA. Negative correlation between oxygen uptake and glutathione oxidation in rat liver homogenates. Biochem J 1969;114:5-9.
- Shigenaga MK, Hagen TM y Ames BN. Oxidative damage and mitochondrial decay in aging. Proc Natl Acad Sci USA 1991;10771-8.
- Viña J, Sastre J, Antón V, Bruseghini L, Esteras A, Asensi M. Effect of aging on glutathione metabolism. Protection by antioxidants. En: Emerit I, Chance B (editors). Free radicals and aging. Basilea: Birkhauser Verlag, 1992; 136-44.
- Viña J. Glutathione: metabolism and physiological functions. Boston: CRC Pres, 1990.