



Cea Bonilla A, del Arenal Mena IP, Riveros Rosas H, Vázquez-Contreras E, (eds). **Mensaje Bioquímico**, Vol XXVI. Depto Bioquímica, Fac Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd Universitaria, México, DF, MÉXICO. (2002).

(<http://laguna.fmedic.unam.mx/mensajebioquimico>)

(ISSN-0188-137X)

BIOLOGÍA DE LAS ESPECIES DE OXÍGENO REACTIVAS

Wilhelm Hansberg Torres

Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México
Circuito exterior, Ciudad Universitaria, Coyoacán, Apartado Postal 70-242;
México, D.F. 04510 México, Tel: 5622 5655,
whansber@ifisiol.unam.mx

El dióxígeno y las especies de oxígeno reactivas

Sabemos que el 21% de nuestra atmósfera es **dióxígeno** (O_2) y que prácticamente todo es de origen biológico. El O_2 atmosférico es producto de la oxidación del agua que lleva a cabo el fotosistema II de las plantas, algas y cianobacterias con la luz solar. También sabemos que la mayoría de los organismos, entre ellos nosotros, utilizamos el O_2 para respirar y muchos no podemos vivir sin él. Reducimos el O_2 en agua y la energía de esta reacción, que originalmente provino del sol, la utilizamos para formar ATP y para transportar iones y metabolitos a través de las membranas celulares. Aproximadamente el 80% del ATP que utilizamos se forma en las mitocondrias en donde se consume entre el 85 y el 90% del O_2 . Es por ello que no podemos vivir sin respirar. La fotosíntesis oxigénica y la respiración forman un circuito continuo de oxidación del agua y reducción del O_2 (Fig. 1). Este ciclo de

óxido/reducción no ha cambiado desde hace millones de años y tampoco la biomasa total de la tierra. Lo que ha cambiado en ese tiempo son los organismos que llevan a cabo el ciclo. Lo cual nos lleva a concluir que el aumento explosivo de la población humana y de los animales domésticos ha sido a expensas de otras especies que respiran (Fig. 1).

El O_2 de la atmósfera reacciona con algunos metales y los oxida, por ejemplo, el hierro expuesto a la intemperie. Observamos que algunos compuestos orgánicos también se oxidan, por ejemplo, una manzana abierta cambia su color en contacto con el aire. El O_2 reacciona y se combina con casi cualquier otro elemento pero, en la mayoría de los casos, sólo lo hace a temperaturas elevadas. Esto es, el O_2 en su estado basal y a la temperatura ambiente reacciona, pero poco.

Por otro lado, la solubilidad del O_2 en el agua es baja y es más baja mientras más sales estén disueltas y más alta sea la temperatura. La concentración del O_2 en agua destilada, en equilibrio con la atmósfera a nivel del mar a $25^\circ C$, es de $258 \mu M$. En la sangre arterial la concentración del O_2 es $\approx 130 \mu M$ y en la venosa de $\approx 50 \mu M$; en las células es menor a $13 \mu M$ y menos de $1 \mu M$ en la mitocondria. Esto es, hay una diferencia de dos órdenes de magnitud en la concentración del O_2 entre el sitio de entrada y el de su consumo. Sin embargo, también hay que considerar que la solubilidad del O_2 es mayor (≈ 8 veces) en solventes orgánicos que en el agua; es más soluble en las membranas celulares, donde se lleva a cabo la respiración, que en el citosol.

Porque lo requerimos para respirar, hemos considerado al O_2 como sinónimo de vida, cuando en realidad es por el O_2 que nos enfermamos y nos morimos. La gran concentración del O_2 en la atmósfera y su baja reactividad en condiciones ambientales ha generado la impresión en la población de que el O_2 es inocuo. Esta concepción se ha extendido inclusive entre los médicos. Así, es común que al recién nacido, sobre todo si es prematuro, se le aplique O_2 . Cuando se administra en demasía perjudica al niño, causándole, por ejemplo, una fibropatía retrolental o problemas respiratorios. Hay muchos datos que indican que el O_2 es tóxico y lo es a cualquier concentración. Así, por ejemplo, muchos microorganismos se alejan del O_2 y se estratifican dentro de un gradiente de O_2 según sus requerimientos y capacidades antioxidantes. Las plantas crecen mejor en ausencia del O_2 . Las radiaciones ionizantes son más tóxicas en presencia de altas concentraciones de O_2 , lo cual se utiliza en el tratamiento de algunos tumores cancerosos.

fluoroclorocarbonos gaseosos usados para las compresoras y los aerosoles generan radicales de halógeno en la estratósfera que destruyen el O_3 en una reacción en cadena que tardará varios decenios en parar. La máxima concentración de O_3 en nuestra atmósfera está a unos 25 km de la superficie terrestre. Sin embargo, el O_3 también se genera a nivel de la superficie terrestre por efecto de la luz sobre el **dioxígeno de nitrógeno** (NO_2^{\cdot}) que genera la combustión de la materia orgánica, principalmente en los automotores. El NO_2^{\cdot} , en presencia de algunos hidrocarburos contaminantes, se descompone en NO^{\cdot} y O y este último reacciona con el O_2 para formar el O_3 .

El O_3 es un gas irritante, de olor penetrante. Es mucho más oxidante que el O_2 pues reacciona con las proteínas, los lípidos, el NAD(P)H, el ascorbato, el ácido úrico y también genera otras especies reactivas. En soluciones ácidas es uno de los compuestos más reactivos. A una concentración de 0.5 ppm causa inflamación y muerte celular en los bronquios y los alveolos pulmonares, sobre todo en las personas mayores y los niños.

El O_2 es un dirradical, esto es, tiene dos electrones libres o desapareados. Estos electrones tienen el mismo giro, por lo que sólo pueden interaccionar con los electrones de otros elementos y compuestos que estén libres y que tengan el giro opuesto. Ésta es la razón por la cual el O_2 no es muy reactivo. El **oxígeno en singulete** (1O_2) se forma cuando uno de los dos electrones libres capta energía y cambia de giro. Cuando eso sucede, inmediatamente se aparea con el otro electrón libre. Por eso hay dos especies de oxígeno en singulete, el $^1\Sigma g^+$, que tiene los dos electrones desapareados pero con giros opuestos, y el $^1\Delta g$, en el que estos electrones se han apareado (Fig. 2). El primero decae muy rápido y para la biología sólo tiene importancia el segundo. El $^1\Delta g$ es también inestable, decae al estado basal, emitiendo un fotón a 1,268 nm, o reacciona porque, ahora sí, puede aceptar dos electrones, libres o apareados.

Las células tienen sustancias con color, tales como las flavinas, las porfirinas y sus derivados, las quinonas, las pterinas y, en los organismos que llevan a cabo la fotosíntesis, las clorofilas. Estos compuestos son excitados generalmente con la luz azul (430–490 nm) y el componente A de la luz ultravioleta (UV_A 320–400 nm). Los compuestos excitados pueden transferir su energía al O_2 y formar el 1O_2 (1). También, en presencia de una sustancia reductora (que cede fácilmente electrones) el colorante se puede reducir y con el O_2 formar el **ion superóxido** ($O_2^{\cdot-}$). El 1O_2 también se forma en la dismutación espontánea del $O_2^{\cdot-}$, de la descomposición del **peróxido de hidrógeno** (H_2O_2), o de los ácidos hipohalogenosos. También los lipoperóxidos, generados por algunos radicales, pueden liberar 1O_2 .

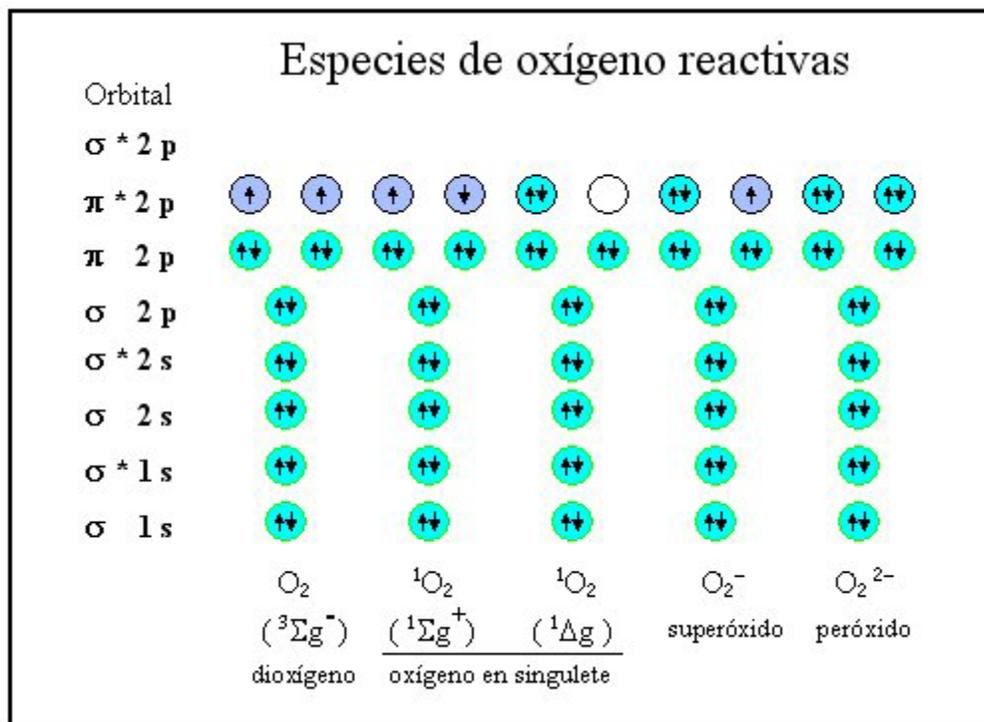


Figura 2. Configuración electrónica de algunas moléculas de oxígeno diatómico. A diferencia del superóxido y del ion peróxido, el oxígeno en singlete puede aceptar pares de electrones, lo cual lo hace muy reactivo. Figura modificada de la figura 1.12. de Halliwell B y Gutteridge JMC (1999). Free radicals in biology and medicine. 3ª edición, Oxford University Press, Oxford.

El 1O_2 es muy reactivo y es capaz de reaccionar con la mayoría de compuestos celulares. El producido fuera de las células reacciona fundamentalmente con las membranas plasmáticas; el producido dentro de las células reacciona con el ADN, las proteínas y los lípidos y otros compuestos celulares, cerca de donde se produce (1).

El O_2^- se forma cuando el O_2 capta un electrón. Esto ocurre en todos los organismos que respiran, pues una pequeña parte de los electrones que pasan por la cadena respiratoria sale de ésta y es captada por el O_2 . Esto ocurre principalmente a nivel de la semiquinona o del ubiquinol y también del complejo I (NADH coenzima Q reductasa). La ubiquinona puede aceptar con facilidad uno o dos electrones y cederlos al O_2 . Alrededor del 1% del O_2 consumido en la respiración genera O_2^- lo cual significa que una persona de 70 Kg en reposo genera unos dos litros de O_2^- al día. Con el ejercicio el consumo de O_2 y por lo tanto la generación de O_2^- aumenta hasta diez veces. Además de la mitocondrial, las cadenas de transporte de electrones del retículo endoplásmico y de la membrana nuclear también pueden generar O_2^- . Los **citocromos P₄₅₀**, una superfamilia de proteínas capaces de hidroxilar una gran variedad de xenobióticos, pueden generar O_2^- . Algunas oxidasas como la oxidasa del NADPH, la oxidasa de xantina y algunas peroxidases inespecíficas producen O_2^- . El 3% de la hemoglobina de un individuo se oxida al día generando metahemoglobina y O_2^- . El O_2^-

también se puede formar a partir de la autooxidación de compuestos como el gliceraldehído o de las flavinas y las tetrahidropterinas reducidas. Se ha calculado que la concentración del O_2^- en la célula está en el intervalo de pico a nanomolar.

Contrario a lo que generalmente se piensa, el O_2^- es poco reactivo. Sólo reacciona a una tasa importante con las quinonas, los fenoles, con el hierro libre o unido a algunas proteínas, por ejemplo los centros [Fe-S] y también con otros radicales (el propio O_2^- , el óxido nítrico y los radicales fenoxi). La dismutación espontánea del O_2^- ocurre sólo cuando uno de los O_2^- se protona para formar el **radical hidroperoxilo** (HO_2^\cdot), por lo que la velocidad de reacción es mayor mientras más ácido sea el medio. El O_2^- inhibe algunas enzimas como la deshidrogenasa de 6-fosfogluconato, la aconitasa y la fumarasa lo que afecta la reducción del NAD^+ y el metabolismo energético. También inhibe la tercera enzima de la vía de síntesis de los aminoácidos ramificados, la deshidratasa del dihidroxiácido, la reductasa de ribonucleótido que genera los difosfato de desoxiribonucleósidos para la síntesis del ADN, y una fosfatasa de proteína, la calcineurina, importante en la transducción de señales. El O_2^- reduce el Fe(III) en Fe^{2+} , reacciona con el ascorbato ($10^5 M^{-1} s^{-1}$) pero no reacciona con el NAD(P)H, con el ADN, con los lípidos, ni con los aminoácidos de las proteínas.

La mayor parte del H_2O_2 o agua oxigenada proviene de la dismutación del O_2^- , aunque también algunas oxidasas lo producen como la oxidasa de xantina, las oxidasas de aminoácidos, las oxidasas de hexosas y las oxidasas de fenoles, entre otras. La concentración del H_2O_2 en las células varía mucho dependiendo del organismo o del tejido y va desde pico o nanomolar hasta cerca de 100 μM , por ejemplo cuando se generan cataratas en el cristalino ocular.

El H_2O_2 es poco reactivo y se puede difundir a través de los compartimentos celulares aunque tiende a formar aductos con algunos carbohidratos, aminoácidos y bases nitrogenadas. Reacciona poco con el ascorbato y no reacciona con compuestos como el NAD(P)H, el ADN, los lípidos, o la mayoría de las proteínas, inclusive a concentraciones milimolares. Algunas enzimas, como la deshidrogenasa de gliceraldehído-3-fosfato o la fosfatasa de fructosa-1,6-difosfato del cloroplasto, sí se inactivan con el H_2O_2 . El H_2O_2 reacciona lentamente con algunos cetoácidos, como el piruvato o el α -cetoglutarato.

Tanto el O_2^- como el H_2O_2 son compuestos que reaccionan poco. Sin embargo, ambos son tóxicos principalmente porque generan 1O_2 y HO^\cdot . El H_2O_2 es tóxico para la mayoría de las células a una concentración de 10 a 100 μM . Cuando el H_2O_2 acepta un electrón desapareado, por ejemplo, de un metal de transición como el Fe^{2+} o el Cu^+ , entonces se fragmenta y forma el **radical hidroxilo** (HO^\cdot) y el **ión hidroxilo** HO^- (reacción de Fenton). Este último es inocuo, se protona para formar agua; en cambio, el HO^\cdot es uno de los compuestos más reactivos que existen. El HO^\cdot casi no se puede difundir porque reacciona rápidamente ($10^9 M^{-1} s^{-1}$) y lo hace prácticamente con cualquier compuesto en el sitio en donde se produce. La urea es uno de los pocos compuestos con los que el HO^\cdot reacciona menos rápido ($10^5 M^{-1} s^{-1}$). La estimulación

de la reacción de Fenton con el O_2^- es la reacción de Haber-Weiss ($O_2^- + H_2O_2 \rightarrow HO^\cdot + HO^- + O_2$) ya que sólo ocurre en presencia de trazas de un metal de transición.

La mayoría de los **metales de transición** contiene electrones desapareados. El Fe^{2+} tiene cuatro y el $Fe(III)$ tiene cinco electrones desapareados; el Cu y el Cu^{2+} tienen un electrón libre; el Cu^+ no tiene electrones desapareados pero acepta fácilmente uno para formar el Cu^{2+} . Por eso, muchos iones de los metales de transición son radicales y pueden participar donando o aceptando electrones. Así, el Fe^{2+} en solución cede un electrón al O_2 formando $Fe(III)$ y O_2^- ; por el contrario, el Cu^{2+} y el Mn^{2+} aceptan un electrón del O_2^- con lo cual catalizan la dismutación del mismo. En cambio, el Zn^{2+} y el $Al(III)$ no participan en reacciones de radicales. Tal vez por eso se utiliza el Zn^{2+} para estabilizar sobre todo las cisteínas de las proteínas como los factores de transcripción con dedos de Zn . En la célula el hierro y el cobre pueden catalizar la autooxidación de compuestos como el $NAD(P)H$, el ascorbato, los tioles, las pteridinas reducidas y otros compuestos. La toxicidad del O_2^- y del H_2O_2 depende en gran medida de la disponibilidad y la distribución de estos metales de transición.

Además de las especies de oxígeno reactivas mencionadas, en la última década se ha descubierto que hay otras especies de oxígeno combinadas con el nitrógeno que son importantes en la biología. Tal es el caso del **monóxido de nitrógeno** u **óxido nítrico** (NO^\cdot). El NO^\cdot es un gas incoloro relativamente soluble que se forma a través de la óxido nítrico sintasa a partir del grupo guanidino de la arginina (Fig. 1). La concentración fisiológica del NO^\cdot es de orden nanomolar, aunque puede llegar a ser micromolar en el sitio en el que se produce.

El NO^\cdot es un radical porque tiene un electrón desapareado. Sin embargo, igual que el O_2^- , al cual se parece mucho, el NO^\cdot no es muy reactivo y se puede difundir. Reacciona lentamente con los tioles formando tionitritos (nitrosotioles) o con los sulfhidrilos de algunas enzimas (deshidrogenasa de gliceraldehído-3-fosfato). En cambio, reacciona rápidamente con otros radicales, como con el O_2 , generando NO_2^\cdot y con el O_2^- generando **peroxinitrito** ($ONOO^-$). Ambos compuestos son más oxidantes que el NO^\cdot . El NO^\cdot también reacciona con radicales de aminoácidos, como el radical tirosina, que se encuentra, por ejemplo, en el sitio activo de la reductasa de ribonucleótido. Aún no está claro si éstas y otras especies de nitrógeno reactivo tienen algún papel *in vivo*, pero se piensa que, para que genere daño, el NO^\cdot se debe transformar primero en un compuesto más reactivo, como el NO_2^\cdot , el $ONOO^-$ o el **trióxido de dinitrógeno** (N_2O_3).

El NO^\cdot se une a varios metales de transición como al hierro de las hemoproteínas o los centros $[Fe-S]$ de las enzimas mitocondriales. La inhibición de la oxidasa del citocromo *c* por el NO^\cdot puede tener un efecto metabólico importante. La mayor parte del NO^\cdot que se produce en los tejidos se une a la hemoglobina o a la mioglobina produciendo metahemoglobina o metamioglobina y nitrato (NO_3^-). Este último se elimina por la orina.

El daño que causan las especies de oxígeno reactivas y los mecanismos de reparación

Ante una determinada tensión oxidativa, los organismos se suelen adaptar rápidamente. En general, un estímulo oxidante de baja intensidad hace que una célula pueda resistir luego condiciones más oxidantes. Sin embargo, las especies de oxígeno reactivas que se producen en cualquier estado fisiológico, producen continuamente daño al ADN, a las proteínas y a los lípidos. Así, se pueden detectar en individuos sanos bases nitrogenadas alteradas en el ADN, aminoácidos modificados en las proteínas y peroxidación de lípidos.

En el **ADN** ocurre, a una tasa baja pero continua, la pérdida de bases, la desaminación de la citosina en uracilo y de la 5-metilcitosina en timidina y la ruptura de una o las dos hebras del ADN. Estas alteraciones se incrementan considerablemente con la tensión oxidativa (2). En muchas células se generan modificaciones en las bases del ADN cuando se les añade H_2O_2 . Esto se debe en gran parte a los metales de transición, fundamentalmente al Fe^{2+} , que se encuentran unidos al ADN y que en presencia del H_2O_2 generan $HO\cdot$ que modifica las bases del mismo. El $HO\cdot$ puede atacar tanto las purinas como las pirimidinas, así como la desoxiribosa y además generar rupturas en el ADN. El 1O_2 es más selectivo y generalmente produce sólo aductos de guanina, sobre todo **8-hidroxi guanina** (Fig. 3). La 8-hidroxi guanina también se puede generar a través de otras reacciones. En condiciones de tensión oxidativa las proteínas que normalmente están unidas al ADN pueden generar uniones covalentes con él, por ejemplo, una unión entre una tirosina y una timina. Asimismo, los lipoperóxidos pueden reaccionar con el ADN y modificarlo. El ADN de las mitocondrias y del cloroplasto también se modifica. De hecho, el ADN mitocondrial de los animales generalmente presenta un mayor número de modificaciones que el ADN nuclear.

Los cambios en las bases nitrogenadas pueden generar mutaciones cuando se duplica el ADN. Por ejemplo, la 8-hidroxi guanina puede hacer puentes de hidrógeno con una adenina en vez de con una citosina y la 8-hidroxi adenina con una guanina en vez de con una timina. Cuando hay rupturas en el ADN se activan las polimerasas de poli(ADP-ribosa) (PARP) que unen residuos de ADP-ribosa formando cadenas ramificadas unidas a residuos de glutamato de la propia PARP y de algunas proteínas que están asociadas con el ADN (Fig. 3). El sustrato de la **poliADPribosilación** es el NAD^+ celular que se consume rápidamente. La glicohidrolasa de la poli(ADP-ribosa) despolimeriza simultáneamente el polímero por lo que la reacción sólo dura unos cuantos minutos. Muchas proteínas nucleares se unen a los polímeros de ADP-ribosa de dichas proteínas lo cual modifica su actividad (3). Se piensa que esta reacción facilita la acción de los mecanismos de reparación de las rupturas en el ADN. Hay mecanismos de reparación específicos que sustituyen las bases mal apareadas, oxidadas, desaminadas o que añaden la base faltante y otros que degradan un tramo de nucleótidos en una hebra alrededor de la región alterada y luego una polimerasa de ADN y una ligasa de ADN reparan el tramo (2). En el hombre se conocen varias enfermedades, como el xeroderma pigmentoso, la ataxia telangectasia y el síndrome de Bloom, en las cuales están afectados algunos de estos mecanismos de reparación del ADN.

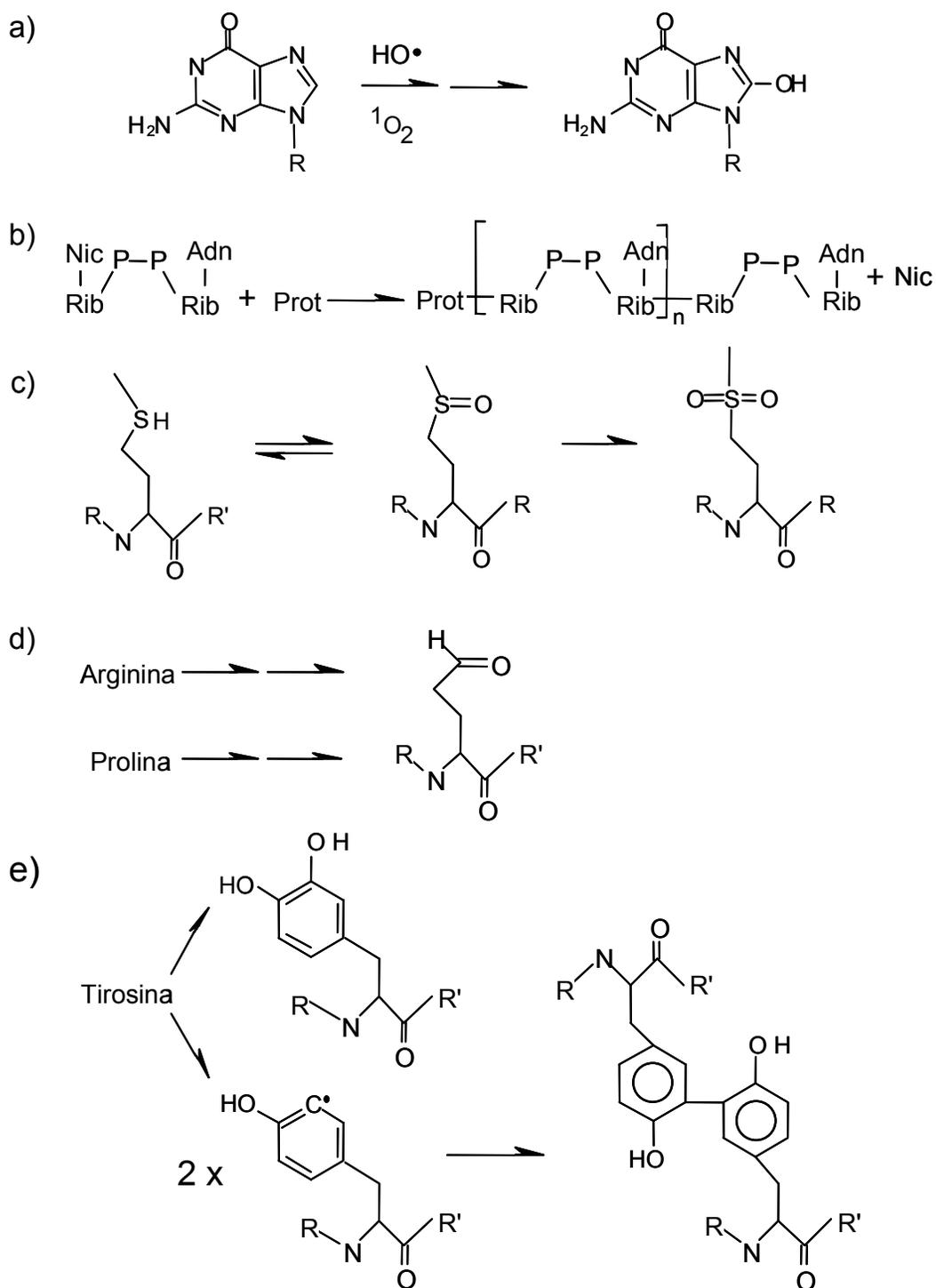


Figura 3. Productos de oxidación en el ADN y las proteínas. a) La 8-hidroxi guanina es el principal producto de oxidación de las bases nitrogenadas especialmente con el $^1\text{O}_2$. b) La ADPribosa se polimeriza enzimáticamente en las proteínas que se unen al ADN en los sitios de ruptura del mismo; n puede ser hasta 200 con varias ramificaciones. c) La formación reversible del sulfóxido de metionina e irreversible de la sulfona de metionina. d) La prolina y la arginina generan el semialdehído de glutámico. El carbonilo que se forma se detecta por la formación de la base de Schiff. e) La tirosina (o la fenilalanina) se hidroxila para generar dihidroxifenilalanina (DOPA) y dos radicales tirosilo pueden formar ditirosina.

Las **proteínas** son las que llevan a cabo la mayoría de las funciones celulares. Muchas proteínas son capaces de absorber una gran cantidad de oxidaciones sin que aparentemente se vea afectada su función. Sin embargo, es indudable que las consecuencias de las alteraciones en algunas funciones, por ejemplo, la recepción y transmisión de señales, el transporte de iones, la duplicación y la reparación del ADN, las respuestas a condiciones de tensión y el metabolismo energético, la transcripción y traducción pueden ser críticas para la célula. Algunas enzimas se inactivan o se activan con el O_2^- y el H_2O_2 cuando interactúan con metioninas o cisteínas susceptibles. Estas reacciones son reversibles y por ello tienen importancia en la regulación de algunas actividades enzimáticas. El sulfóxido de metionina (Fig. 3) se reduce con la reductasa del sulfóxido de metionina peptídico y los puentes disulfuro se reducen con glutatión, con tioredoxina u otras enzimas.

La mayoría de daños en las proteínas son ocasionados por el $HO\cdot$. El $HO\cdot$ reacciona con cualquier aminoácido en el sitio donde se forma, que generalmente son sitios en donde se encuentra un metal de transición. Así la sintetasa de glutamina de *Neurospora crassa* se inactiva cuando es oxidada por un $HO\cdot$ que se forma por la reacción del H_2O_2 con un hierro unido posiblemente cerca del sitio activo (4). La deshidrogenasa del glutamato dependiente del NADPH se inactiva cuando es oxidada por un $HO\cdot$ que se forma por la reacción del H_2O_2 con un hierro unido a su sitio alostérico (5). El 1O_2 es más selectivo y reacciona particularmente con los aminoácidos triptofano, tirosina, histidina, lisina, metionina y cisteína (1, 6). También reaccionan con el grupo hemo de las catalasas de *N. crassa* (7) y la de células humanas (U937) (8) sin afectar mucho su actividad. El grado de oxidación de las proteínas de una célula se puede medir detectando carbonilos en la proteína total purificada. Los carbonilos se forman por la oxidación de la prolina y la arginina en semialdehído de glutamato (Fig. 3) y por rupturas de la cadena peptídica.

Los daños producidos por el $HO\cdot$ y el 1O_2 son irreversibles y en términos generales marcan las proteínas para su degradación. En los eucariotes, la mayoría de proteínas oxidadas se degradan en el citosol y sólo algunas en los lisosomas. El reconocimiento de los sitios oxidados o halogenados o la exposición de regiones hidrofóbicas determinan la ubiquitinación de las proteínas y su degradación en el proteasoma. La **ubiquitina** es una proteína pequeña que se une covalentemente a las lisinas de las proteínas alteradas a través de un sistema de tres enzimas. La primera enzima utiliza ATP para activar el carboxilo terminal de la ubiquitina y unirlo a una de sus cisteínas, la segunda acarrea la ubiquitina y la tercera transfiere la ubiquitina al ϵ -amino de una lisina de la proteína alterada. Otro grupo de proteínas reconoce las proteínas ubiquitinadas y las lleva al proteasoma donde son degradadas. Las bacterias no tienen sistema de ubiquitinación pero tienen varias proteasas que utilizan ATP.

Las **membranas** celulares contienen fosfolípidos que tienen ácidos grasos con varias ligaduras dobles. Estos ácidos grasos poliinsaturados son más lábiles a la oxidación que los saturados y los monoinsaturados porque los metilenos entre dos dobles ligaduras pueden perder fácilmente un hidrógeno (hidrógeno alílico). Las especies de oxígeno reactivas que pueden robar estos hidrógenos son el $HO\cdot$ y el $HO_2\cdot$.

Una vez generado el radical carbono en un ácido graso, éste reacciona con el O_2 para formar un radical peroxilo. El radical peroxilo puede robar un hidrógeno alílico a otro metileno con lo cual se propaga la reacción (Fig. 4). Así una iniciación puede generar muchos lipoperóxidos. El 1O_2 genera endoperóxidos con los ácidos grasos poliinsaturados que se descomponen en presencia de hierro formando radicales alcoxilo que contribuyen a la propagación de la lipoperoxidación. Los lipoperóxidos se pueden reducir mediante glutatión peroxidasas de fosfolípidos o son eliminados a través de las fosfolipasas como la fosfolipasa A_2 , que aumenta durante la tensión oxidativa.

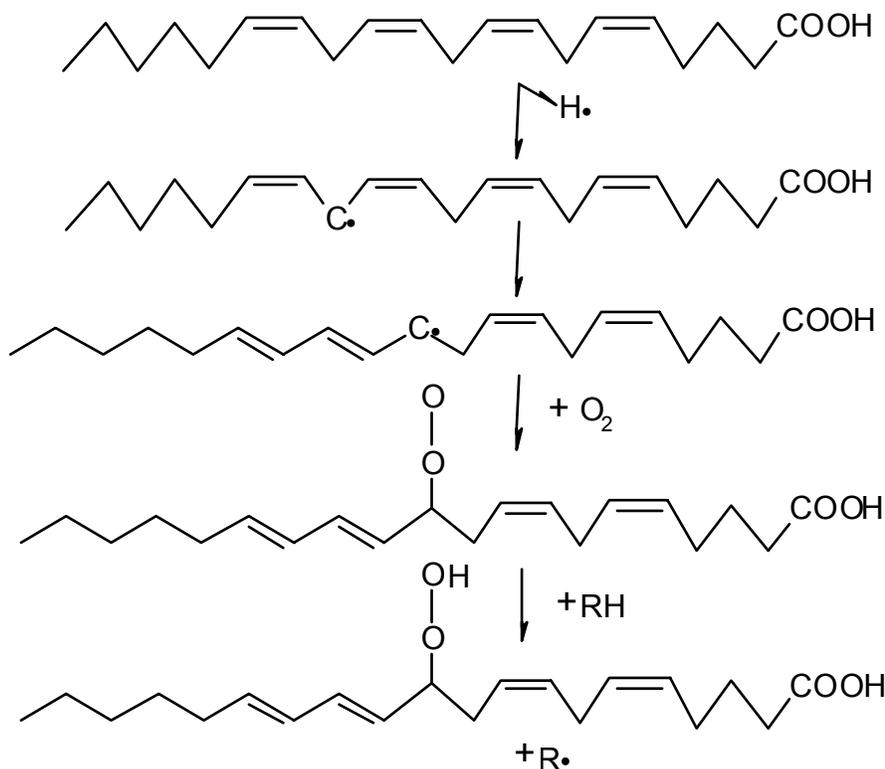


Figura 4. Oxidación de lípidos. Se ejemplifica una posible modificación del ácido araquidónico: a) la abstracción de un hidrógeno alílico genera un radical en un carbono, b) éste puede migrar, con lo cual hay un reacomodo de las dobles ligaduras y c) en presencia del dióxígeno se genera un radical peroxilo que d) se puede apropiarse de un hidrógeno de otro lípido, con lo que se propaga la reacción.

Compuestos antioxidantes

El daño que causan las especies de oxígeno reactivas es contrarrestado en gran medida por los mecanismos antioxidantes celulares y los mecanismos de recambio y reparación. Los mecanismos antioxidantes son muy diversos y en cada organismo, célula o tejido predominan algunos sobre otros. Hay compuestos antioxidantes con varias funciones, enzimas antioxidantes que mantienen en forma reducida dichos

compuestos antioxidantes y enzimas que eliminan el O_2^- y el H_2O_2 evitando así la formación del 1O_2 y del HO^\cdot . A parte de los mecanismos antioxidantes específicos, muchos otros compuestos y enzimas contribuyen de diversas maneras a mantener el estado redox celular.

El hierro es indispensable para muchas enzimas que llevan a cabo reacciones de oxido/reducción o el transporte del O_2 , pero a la vez contribuye a la formación del HO^\cdot . Por ello el **metabolismo del hierro** es crítico y está muy regulado. En bacterias y en hongos el hierro se incorpora directamente como Fe^{2+} o como Fe(III) unido a **sideróforos** y se almacena en la **ferritina**. En *Escherichia coli* y otras bacterias la proteína *fur* unida al Fe^{2+} reprime la síntesis de las proteínas relacionadas con el metabolismo del hierro. La ausencia del gen *fur* causa la acumulación intracelular del hierro y consecuentemente produce una hipersensibilidad al H_2O_2 . En los mamíferos el hierro absorbido en el intestino pasa a la **transferrina** del plasma sanguíneo. La transferrina tiene dos sitios de unión de Fe(III) de gran afinidad que normalmente sólo están ocupados menos del 20%, lo cual garantiza que todo el hierro esté unido. La transferrina interacciona con el receptor de transferrina y, por edocitosis, se forma una vacuola. Al acidificarse el interior de la vacuola el hierro se libera como Fe^{2+} y es captado por la ferritina en el citosol. La ferritina es una proteína de 24 subunidades que conforman una cápsula capaz de almacenar hasta 4,500 iones de metales de transición, la gran mayoría son Fe(III). Además, las células tienen **metalotioneínas** que son proteínas de bajo peso molecular con un alto contenido en cisteína (23–33%) y que son capaces de unir 5–7 iones de diferentes metales de transición. La sobreexpresión de una metalotioneína confiere a la célula una mayor resistencia celular para contender con la tensión oxidativa.

Cuando la concentración del hierro intracelular baja, la aconitasa citoplasmática pierde hierro de su centro $[4Fe-4S]$ y se transforma en una proteína reguladora del hierro (IRP-1). La **IRP-1** se une al ARNm del receptor de transferrina, estabilizándolo y favoreciendo su traducción y a la vez se une al ARNm de la ferritina, y de otras proteínas, impidiendo su traducción. Cuando hay suficiente hierro la IRP-1 se libera como aconitasa, lo cual desestabiliza el ARNm del receptor de transferrina y permite la traducción del ARNm de la ferritina y de otras proteínas, como la sintasa del ácido γ -aminolevulínico, que es la primera enzima de la síntesis del hemo.

El cobre, al igual que el hierro, es esencial y a la vez causa daño generando radicales. La **ceruloplasmina** del suero es una proteína, sintetizada principalmente por el hígado, que tiene seis sitios de unión de gran afinidad por el cobre. Para la incorporación del cobre a la célula, la ceruloplasmina se une a un receptor membranal responsable de su incorporación. Además, en el plasma sanguíneo la ceruloplasmina lleva a cabo una actividad de ferroxidasa ($4Fe^{2+} + O_2 + 4H^+ \rightarrow 4Fe(III) + 2H_2O$) que facilita la incorporación del hierro a la transferrina. Los pacientes que carecen de ceruloplasmina también tienen alteraciones del metabolismo del hierro.

Las hemoproteínas pueden causar daño cuando se encuentran fuera de su sitio fisiológico, por ejemplo por extravasación de la sangre o por lesiones en el músculo. En

presencia de O_2 , las hemoproteínas producen O_2^- y por ende H_2O_2 . El hemo se oxida con el H_2O_2 y se puede liberar junto con el hierro. El hemo, siendo hidrofóbico, se incorpora a las membranas y en presencia de luz genera 1O_2 ; el hierro libre genera $HO\cdot$ y así ambos contribuyen a la lipoperoxidación de las membranas celulares. En el plasma sanguíneo se encuentra una proteína, la **haptoglobina**, que une la hemoglobina. También se encuentra la **hemopexina** que, junto con la albúmina, une el hemo libre para su metabolismo en el hígado. El anillo pirrólico del hemo se rompe con la hemooxigenasa del retículo endoplásmico para producir bilirrubina y luego biliverdina por la acción de la reductasa de biliverdina en el citosol. Hay dos **hemooxigenasas** (HOx): la HOx-2, que es constitutiva, y la HOx-1, que se induce con la tensión oxidativa. La HOx-1 es la proteína del choque con calor HSP32. Se ha considerado que la bilirrubina puede ser un antioxidante pues es un buen desactivador del 1O_2 y de los radicales peroxilo. Una vez conjugada con el ácido glucurónico, la bilirrubina se secreta con la bilis para saponificar en el intestino los lípidos de la ingesta.

El tripéptido (glu-cys-gly) **glutati3n** (GSH) (Fig. 5) se sintetiza continuamente dentro de la célula y se degrada fuera de ella. Es el tiol celular más abundante; se mantiene a una concentración milimolar y es particularmente alta en el cristalino y en los eritrocitos de los mamíferos y en los cloroplastos de las plantas. El glutati3n tiene varias funciones: participa en la formación y ruptura de los puentes disulfuro de las proteínas, contribuye a desechar el H_2O_2 con la peroxidasa de glutati3n, es precursor de las **fitoquelatinas** en las plantas y es cofactor de algunas enzimas (9). Reacciona espontáneamente con el metilglioxal para transformarlo en lactato a través de las glioxalidas. El metilglioxal, que se forma por error, es reactivo y capaz de modificar las proteínas y los ácidos nucleicos. El glutati3n se utiliza también en el metabolismo de los xenobi3ticos a través de las **S-transferasas de glutati3n** que se encuentran en todos los eucariotos mas no en bacterias. Los xenobi3ticos son sustancias extrañas que se incorporan a la célula o que se producen por error o durante la tensión oxidativa, por ejemplo, aldehidos y peróxidos orgánicos. Las S-transferasas de glutati3n son enzimas diméricas pequeñas que conjugan los xenobi3ticos con el glutati3n para desecharlos o degradarlos (10). También metabolizan los peróxidos orgánicos formando alcoholes y disulfuro de glutati3n (GSSG) (reacción de peroxidasa). Hay una gran variedad de S-transferasas de glutati3n, algunas son citos3licas otras son membranales. Las citos3licas son también acarreadoras intracelulares de compuestos hidrof3bicos o potencialmente t3xicos como el hemo.

El glutati3n se mantiene casi todo en forma reducida principalmente a través de la **reductasa de glutati3n**, una flavoproteína que utiliza el NADPH como fuente de electrones (10). En la tensión oxidativa se forma gran cantidad de GSSG, que se secreta y se degrada (11). El glutati3n reacciona con el 1O_2 y con muchos radicales, aunque lo hace lentamente con el O_2^- . El radical tiilo que se forma se une a otro glutati3n y con el O_2 es capaz de formar O_2^- y disulfuro de glutati3n.

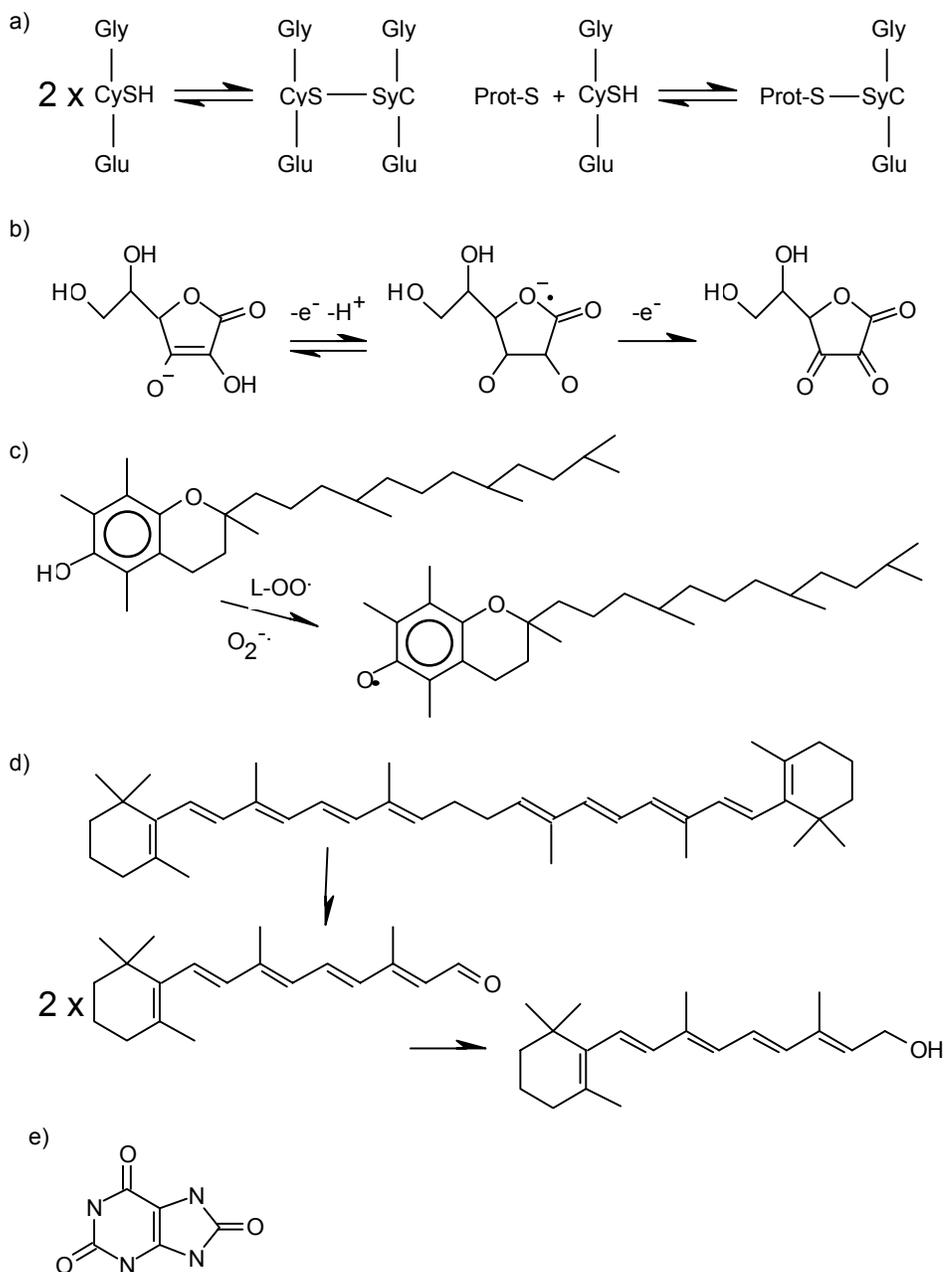


Figura 5. Los principales compuestos antioxidantes celulares: a) el glutati3n que se oxida formando disulfuro de glutati3n y que tambi3n puede formar disulfuros mixtos con las ciste3nas de las prote3nas; b) el ascorbato (vitamina C) acepta un electr3n de un radical (inestable) para formar el radical ascorbilo estable (monodeshidroascorbato) que puede aceptar un segundo electr3n para formar el dideshidroascorbato (inestable) que se degrada o se vuelve a reducir; c) α -tocoferol (vitamina E) en presencia de un radical (lip3dico) forma el radical tocoferilo que se puede reducir con ascorbato; d) el β -caroteno que a trav3s de una dioxigenasa genera dos mol3culas de retinal que se oxidan para formar el retinol (vitamina A); e) el urato proviene del catabolismo de purinas y se acumula en los primates debido a la ausencia de la oxidasa de urato.

Con la tensión oxidativa también aumentan los disulfuros mixtos que se forman entre el glutatión y las cisteínas de las proteínas u otros tioles libres. En estas condiciones se inhibe la síntesis de proteínas y la actividad de muchas proteínas. Con ayuda de algunas chaperonas (HSP) y de la **disulfuroisomerasa de proteínas** algunas proteínas pueden recuperar su conformación original, otras en cambio se degradan. La disulfuroisomerasa también tiene actividad de reductasa de dideshidroascorbato y además participa como las subunidades β de la hidroxilasa de prolina, que usa ascorbato como cofactor. La **tioltransferasa** o **glutarredoxina** también reduce los disulfuros de las proteínas utilizando glutatión y asimismo tiene actividad de reductasa de dideshidroascorbato.

Las plantas y muchos animales producen **ascorbato** (Fig. 5) a partir de la glucosa. En cambio los primates perdieron la última enzima de su biosíntesis, la oxidasa de la L-glucó- γ -lactona. Debido a que el ascorbato es cofactor de varias hidroxilasas, es un compuesto esencial para el hombre por lo que debe obtenerlo en su dieta, so pena de padecer escorbuto. El ascorbato o vitamina C se encuentra en la mayoría de frutas y vegetales. El ascorbato es muy soluble en agua y se encuentra en concentraciones altas en todos los tejidos, especialmente en el ojo y en el pulmón. Tiene dos hidroxilos ionizables que hacen de él un excelente agente reductor. Reduce el Fe(III), inclusive cuando está unido en algunas proteínas, también reduce aunque lentamente el O_2^- ($10^5 M^{-1} s^{-1}$), se utiliza para desechar el H_2O_2 por la peroxidasa de ascorbato, reacciona con el 1O_2 , el ácido hipoclorito, el $ONOO^-$, los radicales peroxilo y el radical tocoferilo. El radical ascorbilo (o monodeshidroascorbato) que se forma es estable y se puede desproporcionar espontáneamente regenerando el ascorbato y el dideshidroascorbato. Este último se descompone en ácido oxálico y ácido treónico o es reabsorbido y reducido por la glutarredoxina y el glutatión. El ascorbato es un excelente antioxidante siempre y cuando no esté en presencia de fierro o de cobre, pues en esas condiciones se genera el HO^\cdot . Los complejos multivitamínicos incluyen muchas veces sales de fierro y ascorbato con lo cual generan HO^\cdot al disolverse.

El **tocoferol** (Fig. 5) o vitamina E es un compuesto esencial que el hombre obtiene de los aceites vegetales. Se absorbe junto con otras grasas formando parte de los quilomicrones. El tocoferol tiene tres carbonos asimétricos por lo que hay ocho estereoisómeros. El más activo de ellos es el RRR- α -tocoferol y en el hígado sólo éste se transfiere a las lipoproteínas de muy baja densidad (12). Éstas, al incorporar triglicéridos, se convierten en lipoproteínas de baja densidad que en el suero sanguíneo transfieren una parte del tocoferol a las lipoproteínas de alta densidad. Las células incorporan el tocoferol de las lipoproteínas a las membranas plasmáticas, sobre todo en los segmentos exteriores de los bastones de la retina. En los organismos fotosintéticos el tocoferol se concentra en las membranas de los tilacoides. Estos sitios nos indican la función antioxidante del tocoferol como desactivador y recolector del 1O_2 . El tocoferol reacciona con los radicales lipoperoxilo ($10^6 M^{-1} s^{-1}$) y el radical tocoferilo producido se puede reducir con el ascorbato ($10^6 M^{-1} s^{-1}$) y de esta manera se limita la propagación de la lipoperoxidación. El tocoferol, al igual que el ascorbato, puede reducir el Fe(III) y el Cu^{2+} por lo que puede ser prooxidante en presencia de estos metales de transición. La falta de tocoferol genera sensibilidad a la tensión oxidativa

que se traduce, por ejemplo, como hemólisis en presencia de H_2O_2 . El niño prematuro tiene poco tocoferol y por ello puede presentar hemólisis.

Muchos de los colores de las plantas y de los animales se deben a los **carotenos**. El hombre obtiene el retinol (vitamina A), que es esencial sobre todo para la visión, a partir del β -caroteno y de otros carotenos (Fig. 5). Los carotenos se parten en dos mediante la acción de una dioxigenasa para generar el aldehído retinal y éste es luego reducido a retinol. No todos los animales incorporan los carotenos. En el hombre los carotenos se concentran particularmente en el tejido adiposo, el hígado, el cuerpo lúteo, la glándula adrenal, la mácula de la retina y los testículos. Debido a las dobles ligaduras coordinadas que tienen son excelentes desactivadores del 1O_2 . En los organismos fotosintéticos sirven para absorber la luz y para desactivar el 1O_2 que se genera en este proceso. En el hombre también pueden tener esa función pues en la piel disminuyen los niveles de carotenos con la exposición a la luz. Los carotenos también reaccionan con los radicales peroxilo y el NO_2 , generando un radical estable que puede ser reducido por el ascorbato.

El hombre perdió la oxidasa de urato por lo que acumula **urato** (Fig. 5) en concentraciones cercanas a 0.5 mM. Los primates y otros animales excretan urato con la orina como producto de la degradación de los compuestos nitrogenados. La oxidasa de urato, al igual que la oxidasa de la L-glucó- γ -lactona en el caso de la síntesis del ascorbato, produce H_2O_2 y la pérdida de estas enzimas pudo haber representado para el hombre una ventaja más que una desventaja. Los genes inactivos de ambas enzimas se detectan en el genoma humano. El urato reacciona con el 1O_2 y con varios radicales generando el radical de urato, que es estable por resonancia electrónica y que se puede reducir con el ascorbato. Además, el urato forma quelatos con los metales de transición que no son reactivos. Debido a ello, se ha pensado que el ácido úrico puede funcionar como antioxidante en el hombre. De hecho en condiciones de tensión oxidativa el urato se oxida en alantoína. Sin embargo, el urato tiene la desventaja de que es poco soluble y, cuando hay una ingesta alta de compuestos nitrogenados que no se eliminan con suficiente rapidez en algunas personas, el urato se puede cristalizar en las articulaciones causando el síndrome de "la gota", además de que también puede formar cálculos renales.

Además de ascorbato, tocoferoles y carotenos, las plantas tienen una gran cantidad de **fenoles** que tienen actividad antioxidante *in vitro* (Fig. 6). Se ha especulado que estos fenoles del vino, del té, del café, etc. pueden tener una función antioxidante en el hombre. Pocos de estos fenoles se absorben en el intestino y aún no está claro su efecto en el hombre.

Las **melaninas** son productos de la polimerización de la dihidroxifenilalanina (Fig. 6), producida por las oxidasas de fenoles, como la tirosinasa, o del dihidroxinaftaleno (Fig. 6) generado por las sintasas de policétidos. Las melaninas son polímeros heterogéneos, insolubles, de elevado peso molecular. Tienen una gran cantidad de electrones desapareados, lo que les permite absorber la luz UV y la visible en todas las longitudes de onda. Por ello tienen un color muy oscuro. Además, son

capaces de reaccionar con cualquier especie reactiva funcionando como oxidantes o reductores. En el hombre las melaninas se forman a partir de la tirosina y se encuentran en el cabello, en el iris y en la sustancia niger en el cerebro. Varias bacterias y hongos son capaces de sintetizar melaninas que depositan en sus paredes celulares. Esto constituye un factor de virulencia de varios hongos patógenos de plantas y de animales.

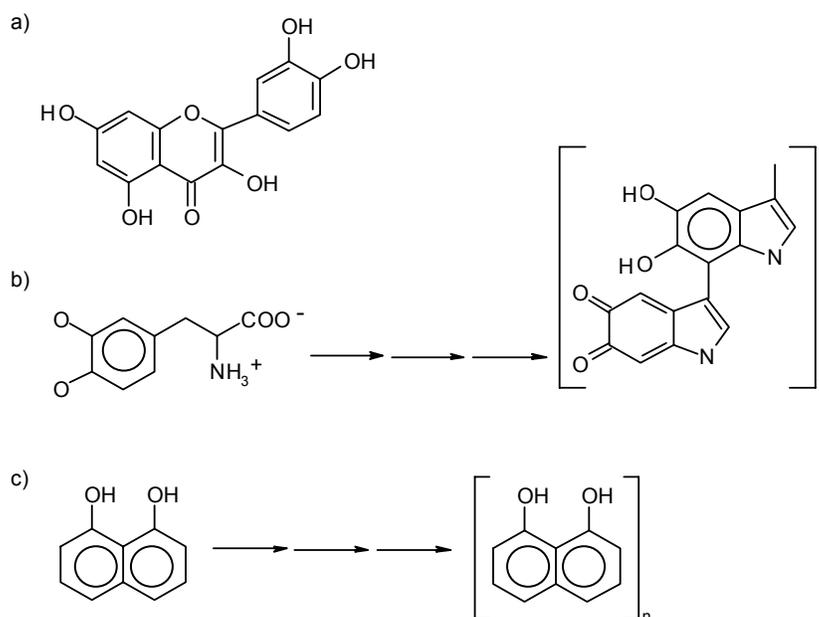


Figura 6. Fenoles como antioxidantes en la dieta y como precursores de las melaninas. a) La cuercetina es un flavonoide pentahidroxiado que está presente en muchas frutas y verduras. Éste y otros flavonoides de los vegetales pueden funcionar como antioxidantes. b) La dihidroxifenilalanina (DOPA) se oxida con la tirosinasa y genera dos productos que se polimerizan para formar una melanina que está presente en los animales y también en algunos hongos. c) El dihidroxinaftaleno (DHN) se forma de un pentacétido que se cicla y se reduce. El dihidroxinaftaleno se polimeriza y forma un tipo de melanina de algunos hongos.

Enzimas antioxidantes

A parte de las sustancias mencionadas, la mayoría de células tienen una batería de enzimas que desechan el O_2^- , el H_2O_2 y el NO^\cdot . El O_2^- sólo puede atravesar las membranas celulares como HO_2^- o a través de poros aniónicos. Es posible que debido a ello se requiera tener una dismutasa de superóxido (SOD) en cada compartimento celular limitado por una membrana. El H_2O_2 se produce principalmente por la dismutación del O_2^- pero también de muchas oxidasas que, tal vez por esa razón, se encuentran confinadas en vesículas, como los peroxisomas, glioxisomas, lisosomas, etc. Así la concentración local del H_2O_2 puede variar entre nanomolar y milimolar o

incluso cerca de 0.5 molar, dependiendo del sitio de su producción y de la célula o el tejido. Como el H_2O_2 es la mayor fuente de $^1\text{O}_2$ y del HO^\cdot , existe una gran redundancia de enzimas que desechan el H_2O_2 y que funcionan a diferentes concentraciones del mismo (Tabla 1). Finalmente, el NO^\cdot puede generar con el O_2 y el O_2^\cdot compuestos más reactivos por lo que es también importante desecharlo.

Tabla 1 Comparación de las constantes cinéticas de algunas enzimas que desechan el H_2O_2 .

Enzima	K_M (mM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_M ($\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)
Peroxirredoxina-Txn ^a	<0.06	0.2 – 10	$10^3 - 10^5$
Glutación peroxidasa ^b	0.025	50	2×10^6
Hemoperoxidasa (pl) ^b	4	0.4 – 40	$10^2 - 10^4$
Hemoperoxidasa (an) ^b	--	--	$1 - 4 \times 10^7$
Catalasa/peroxidasa ^c	13	10^5	10^7
Catalasa ^d	20	9×10^6	4×10^8
	200	5×10^6	2×10^8

Las enzimas menos eficientes son las peroxirredoxinas y las más eficientes son las catalasas; las primeras funcionan a concentraciones muy bajas y las segundas a concentraciones muy altas de H_2O_2 . La diferencia en K_M puede ser de cuatro órdenes de magnitud. Algunas peroxidases tienen una eficiencia intermedia y funcionan a concentraciones intermedias de H_2O_2 .

^a Ref. 18;

^b citado en ref. 18;

^c ref. 28;

^d ref. 30.

Como su nombre lo indica, las dismutasas de superóxido dismutan el O_2^\cdot en H_2O_2 y O_2 y lo hacen de manera muy eficiente ($10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) e independiente del pH. Esta reacción también ocurre espontáneamente pero depende del pH ($10^{5-6} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ a pH fisiológico). Hay varios tipos de dismutasas de superóxido: las enzimas que tienen Cu^{2+} y Zn^{2+} en su sitio activo, que son intracelulares (CuZnSOD) o extracelulares (ECSOD), y las enzimas que tienen Mn(III) (MnSOD) o Fe(III) (FeSOD) en su sitio activo y que son citosólicas o de los organitos celulares. La **CuZnSOD** es un homodímero, abundante, azul verdoso, muy resistente a la desnaturalización, se inhibe con cianuro o con un quelante de cobre como el dietilditiocarbamato. El H_2O_2 inhibe la enzima *in vitro*. En la mayoría de los eucariotas la CuZnSOD es la principal actividad (13-16). Veinte por ciento de los pacientes con esclerosis lateral amiotrófica familiar tienen mutaciones en el gen de la CuZnSOD. En las bacterias la CuZnSOD también está presente en el espacio periplásmico pero la actividad predominante en la bacteria es la MnSOD (15). En las mitocondrias la CuZnSOD se encuentra en el espacio intermembranal y la MnSOD en la matriz (16). El Cu^{2+} de la CuZnSOD, que está sostenido entre cuatro histidinas en un barril aplanado de ocho bandas- β plegadas

antiparalelas, lleva a cabo la transferencia de electrones mientras que el Zn^{2+} tiene un papel estabilizador. El canal que conduce al sitio activo tiene cargas negativas que repelen el O_2^- y lo conducen al interior que tiene cargas positivas. Las **ECSOD** son homotetrámeros mucho más grandes que las enzimas intracelulares. Son glicoproteínas de varios tipos, unas se unen a la superficie celular y otras no.

La **MnSOD** es un homodímero o tetrámero, de color rosa, que se desnaturaliza con detergentes o solventes y que no se inhibe con cianuro ni con el dietilditiocarbamato, ni tampoco con el H_2O_2 . En los eucariotes se encuentra en las mitocondrias, aunque algunos crustáceos sólo tienen esta enzima, tanto en el citosol como en las mitocondrias. *E. coli*, además de MnSOD, tiene otra enzima que une Fe(III) en vez de Mn(III) en su sitio activo. Aunque provienen de genes diferentes, estas dos enzimas son tan parecidas que pueden formar híbridos. En algunas plantas la FeSOD se encuentra en los cloroplastos.

En la última década se ha descubierto una familia de peroxidases que desechan el H_2O_2 y otros peróxidos a través de un sistema de oxidación/reducción de grupos tioles (17, 18). El nombre genérico que se les ha dado es el de **peroxirredoxinas**, aunque a las enzimas en diversos organismos se les ha dado nombres muy variados. Son proteínas pequeñas, ubicuas, que tienen una cisteína conservada en el sitio activo. La unidad funcional es el dímero pero muchas son capaces de agruparse en decámeros de dímeros. Se encuentran en concentraciones relativamente altas dentro de las células, algunas son mitocondriales o cloroplásticas y otras se secretan. En términos generales estas enzimas son activas a bajas concentraciones de peróxidos (<0.1 mM) (18) (Tabla 1). Hay cinco subfamilias de peroxirredoxinas y cuatro de ellas tienen, además de la cisteína reactiva, otra cisteína conservada. Cada organismo tiene varias enzimas que provienen de algunas de estas subfamilias. Así, el hombre y el ratón tienen seis peroxirredoxinas, cuatro de una subfamilia y las otras dos de subfamilias distintas. *E. coli* tiene tres, cada una de distinta subfamilia. *Sacharomyces cerevisiae* tiene siete, cinco de una subfamilia y las otras dos de subfamilias distintas. Algunas peroxirredoxinas se inducen en condiciones oxidantes y las células mutantes sin una peroxirredoxina determinada son sensibles a la tensión oxidativa y en ocasiones también a las especies de nitrógeno reactivo.

La mayoría de la peroxirredoxinas dependen de la **tiorredoxina** como donador de electrones, aunque algunas pueden recibir electrones de otros tioles o de otras proteínas específicas que en una parte son semejantes a la tiorredoxina (18). La tiorredoxina también reduce los puentes disulfuro de otras proteínas. El peróxido, al interactuar con el tiolato de la cisteína del sitio activo genera un sulfénico como intermediario y libera una molécula de agua (o de alcohol, en el caso de los alquilhidroperóxidos). El sulfénico es inestable debido a la vecindad de un sulfhidrilo de la misma subunidad por lo que se genera un puente disulfuro y se libera otra molécula de agua o alcohol. El puente disulfuro se reduce a través de dos disulfuros vecinos de la tiorredoxina (o una proteína semejante). El puente disulfuro generado en la tiorredoxina se reduce a través de dos sulfhidrilos de la **reductasa de tiorredoxina** (19). El puente disulfuro formado en la reductasa de tiorredoxina se reduce con los

electrones provenientes del NADPH a través de una flavina (FAD) unida a esta enzima. En resumen, el peróxido se reduce con los electrones del NADPH a través de una cadena de sulfhidrilos/disulfuros (Fig. 7). La reductasa de tiorredoxina también reduce la isomerasa de disulfuros de proteína.

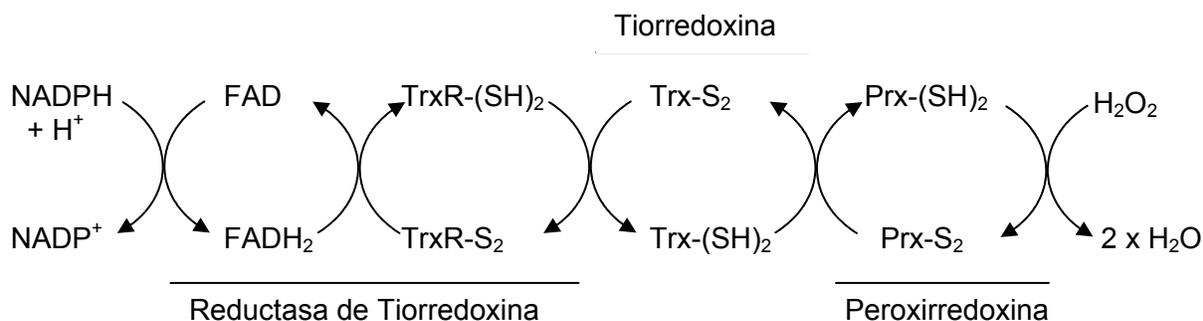


Figura 7. Cadena de oxidoreducción de los tioles vecinos entre varias proteínas. Las peroxirredoxinas (Prx) reducen el H_2O_2 con un par de cisteínas de su sitio activo. La mayoría de estas enzimas utilizan la tiorredoxina (Trx) para volver a reducir el disulfuro formado. La tiorredoxina a la vez requiere de la reductasa de tiorredoxina (TrxR) para lo mismo. Esta última enzima reduce sus cisteínas con los electrones que obtiene del NADPH a través del FAD unido a la enzima.

La **peroxidasa de glutatión** (GPx) reduce los hidroperóxidos utilizando glutatión como agente reductor, aunque las de hidroperóxidos de fosfolípidos pueden utilizar tiorredoxina, glutaredoxina o tioles proteicos como fuente de poder reductor. Se han descrito peroxidases de glutatión en los animales, en las plantas, en los esporozoarios, en algunas algas, hongos y bacterias. *S. cerevisiae* tiene tres genes de peroxidasa de glutatión. Los mamíferos tienen varias peroxidases de glutatión: la citosólica (GPx1), la gastrointestinal (GPx2), la plasmática (GPx3) y la de hidroperóxidos de fosfolípidos (GPx4) (20). Son homotetrámeros con la excepción de la GPx4 que es un monómero de tamaño menor al de las subunidades de las otras glutatión peroxidases. La GPx de hidroperóxidos de fosfolípidos es capaz de actuar sobre los fosfolípidos de las membranas celulares y de las lipoproteínas, además de los hidroperóxidos de timina y de ésteres de colesterol. Además, esta enzima se requiere durante la espermatogénesis para oxidar los tioles de las proteínas que estabilizan la cápsula que contiene las mitocondrias del espermatozoide (21). También se requiere de otra enzima similar pero con un extremo N-terminal distinto y rico en argininas, resultado de un ensamble alternativo de exones ("splicing"). Esta enzima oxida las cisteínas de la protamina que condensa la cromatina del espermatozoide (22). Todas las GPx son capaces de reducir el H_2O_2 y los hidroperóxidos de ácidos grasos; sin embargo, la GPx plasmática también lo hace con lípidos complejos, como el hidroperóxido de fosfatidilcolina o hidroperóxidos en algunas proteínas como la tiorredoxina. La GPx citosólica es la enzima más abundante sobre todo en los eritrocitos, el hígado, los riñones y los pulmones. La GPx plasmática no sólo está en el plasma sanguíneo sino

que en la mayoría de secreciones corporales. Se sintetiza en el riñón y de ahí es liberada a la sangre. La GPx gastrointestinal sólo se encuentra en el epitelio del tracto digestivo y en el hígado.

En los mamíferos estas enzimas tienen la particularidad de tener en su sitio activo una **selenocisteína**, una cisteína en la cual el azufre ha sido reemplazado por el Se. La selenocisteína está codificada por el codón de terminación UGA pero el mecanismo de traducción reconoce una determinada conformación del ARNm e introduce en ese codón un ARNt con una serina transformada enzimáticamente en selenocisteína. El Se está como selenol y reacciona con el H_2O_2 para formar ácido selénico y agua, o alcohol en el caso de los alquilperóxidos. El glutatión reacciona con el ácido selénico para formar otra molécula de agua y una segunda molécula de glutatión reacciona con el glutatión unido para formar disulfuro de glutatión. Hay otras proteínas con selenocisteína como la reductasa de tiorredoxina que tiene selenocisteína como penúltimo aminoácido, las 5-desyodinasas de yodotironina que generan la 3,5,3'-triyodotironina y la proteína P del plasma humano que tiene 10 selenocisteínas por molécula. También se han detectado selenoproteínas en procariotos y recientemente en plantas (23).

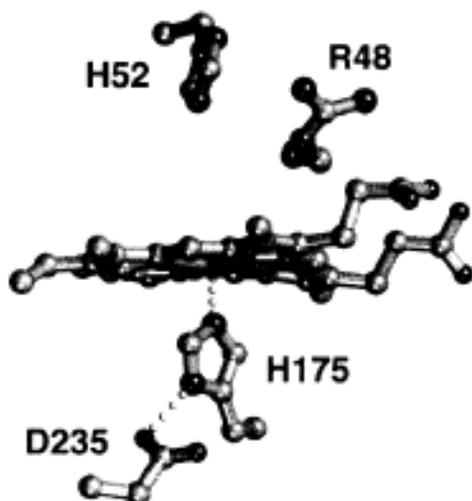
Las hemoperoxidasas se pueden dividir en la superfamilia de los animales, la superfamilia de plantas, hongos y procariotos y en un grupo menor de las haloperoxidasas. Estas enzimas difieren entre sí en su estructura primaria, secundaria y terciaria por lo que se piensa que representan familias de genes diferentes. Las **hemoperoxidasas de animales**, como la peroxidasa de la tiroides, la lactoperoxidasa, la peroxidasa salival, la mieloperoxidasa y la peroxidasa de los eosinófilos son proteínas grandes (>700 aminoácidos), tienen el hemo unido covalentemente y tienen sitios para unir Ca^{2+} (24). La peroxidasa de la tiroides une los átomos de yodo de las hormonas tiroideas. La lactoperoxidasa de la leche junto con la peroxidasa de la saliva son capaces de oxidar iones de tiocianato a hipotiocianato que es tóxico para algunos microorganismos. La mieloperoxidasa se encuentra en las células fagocíticas y genera ácido hipocloroso (hipoclorito) (HOCl) a partir de Cl^- y H_2O_2 y la de los eosinófilos produce ácido hipobromoso. El HOCl y el HOBr contribuyen a matar a los microorganismos fagocitados.

Las **hemoperoxidasas de plantas, hongos y procariotos** tienen similitud en la secuencia de sus aminoácidos, particularmente en sus dominios catalíticos, y en su estructura. Difieren de las enzimas de animales en que éstas son proteínas pequeñas (300 aminoácidos) y su hemo no está unido covalentemente. Sin embargo, las dos familias de hemoperoxidasas tienen una His y una Arg conservadas en el sitio activo y una His que hace un enlace de coordinación con el Fe(III) y un puente de hidrógeno con una Asn o un Asp en el lado proximal (25), lo que constituye un ejemplo de evolución convergente (Fig. 8). La peroxidasa del citocromo *c* de *S. cerevisiae* forma una cavidad con diez hélices- α que contiene el hemo. Esta estructura se conserva en las peroxidases del ascorbato y la peroxidasa de la raíz fuerte. La peroxidasa de ascorbato tiene la función de eliminar el H_2O_2 que se forma en el fotosistema I de las plantas (26). La superfamilia se ha dividido en tres clases con base en sus

características estructurales. La clase I incluye la peroxidasa del citocromo *c* de *S. cerevisiae*, las peroxidasas de ascorbato de las cianobacterias, las algas y las plantas, y las catalasas/peroxidasas de los procariotes y de los hongos. Esta clase de peroxidasas probablemente tenga un origen procarioto. La clase II comprende las peroxidasas extracelulares de los hongos, las peroxidasas de lignina y las peroxidasas de Mn. La clase III incluye las peroxidasas de secreción de las plantas, como la peroxidasa de la raíz fuerte y muchas otras que se secretan. Las clases II y III de las peroxidasas están glicosiladas, tienen puentes disulfuro, tienen un péptido señal y unen calcio. La mayoría de los aminoácidos del sitio activo son invariables; sin embargo, la afinidad y las propiedades cinéticas de estas enzimas son muy diferentes. Algunas son específicas para el sustrato que utilizan, como el citocromo *c* o el ascorbato; otras utilizan un espectro amplio de agentes reductores, como la peroxidasa de la raíz fuerte, que es capaz de oxidar amidas, fenoles, indoles y sulfonatos. La peroxidasa de lignina es capaz de utilizar veratrilol y la peroxidasa de Mn cataliza la oxidación del Mn(II) a Mn(III). El producto de ambas enzimas puede a su vez oxidar y degradar compuestos fenólicos como la lignina. Las plantas pueden tener hasta nueve genes de peroxidasas distintas que se utilizan para diferentes funciones como la lignificación de la pared celular, la suberización de los tejidos lesionados o el catabolismo de algunas hormonas. La peroxidasa de ascorbato es la principal actividad antioxidante de muchos organismos como *Euglena* que carecen de catalasa o de otras peroxidasas. También está presente en otros protistas y en cianobacterias.

Las **catalasas/peroxidasas** son enzimas capaces de llevar a cabo eficientemente tanto la reacción de catalasa como de peroxidasa. La K_m aparente para su actividad de catalasa es diez veces menor que la de las catalasas monofuncionales (27) (Tabla 1). A diferencia de éstas, el grupo hemo de las catalasas/peroxidasas está cerca de la superficie de la enzima por lo que sí puede ser reducido con ditionita. Estas enzimas muestran un pH óptimo para ambas actividades, se inactivan con solventes orgánicos, son más sensibles que las catalasas monofuncionales a la temperatura y son más resistentes a la inhibición con 3-amino-1,2,4-triazol. Las catalasas/peroxidasas están compuestas por dos mitades que son semejantes entre sí y ambas, particularmente la del N-terminal, tienen similitud con la secuencia de aminoácidos de la peroxidasa de citocromo *c* de *S. cerevisiae*. Se piensa que las catalasas/peroxidasas se originaron por la duplicación del gen de una peroxidasa semejante a las de la superfamilia de las plantas (28). Es probable que las catalasas/peroxidasas de los hongos tengan un origen bacteriano (27). No hay similitud entre la secuencia de las catalasas/peroxidasas y las catalasas monofuncionales. Las catalasas/peroxidasas de las plantas, a diferencia de las de bacterias y de hongos, son incapaces de usar como sustratos la *o*-dianisidina y el guaiacol.

peroxidasa del citocromo c



mieloperoxidasa

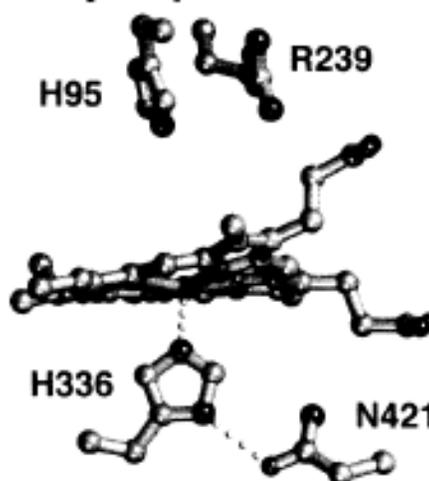


Figura 8. Coevolución en las familias de las hemoperoxidasas. Comparación del sitio activo de la citocromo c peroxidasa de *S. cerevisiae*, representante de la familia de las hemoperoxidasas de plantas, hongos y procariotes, y la mieloperoxidasa, representante de la familia de hemoperoxidasas de los animales. En ambas enzimas se utilizan los mismos aminoácidos para la reacción catalítica aunque éstos provienen de diferentes regiones dentro de la proteína. La imagen se tomó de la figura 2 de la referencia 24.

Se ha encontrado **haloperoxidasas** en algunos hongos, en líquenes y en algas que tienen un vanadato (HVO_4^{2-}) unido covalentemente a una histidina del sitio activo (29). Algunas haloperoxidasas de vanadio tienen también actividad de fosfatasa y se piensa que hayan provenido de un gen para una fosfatasa ácida.

Las **catalasas monofuncionales** dismutan el H_2O_2 en O_2 y H_2O y lo hacen con una gran eficiencia a cualquier pH entre 4 y 11. Son enzimas muy resistentes a agentes desnaturizantes y solventes orgánicos. Se inactivan con 3-amino-1,2,4-triazol y, como todas las hemoproteínas, se inhiben con cianuro y azida (30). Las catalasas tienen un origen común y se encuentran desde las arqueas hasta los mamíferos. En términos generales su secuencia y estructura están conservadas e inclusive en plantas se ha descrito la hibridación entre varias catalasas. Son homotetrámeros u homodímeros de subunidades de ≈ 60 kDa o de ≈ 80 kDa. Hay varios subgrupos de catalasas: uno de plantas, uno de animales, uno de hongos, dos de bacterias y uno de bacterias y hongos en donde se encuentran las catalasas grandes (31). Cada subunidad contiene una ferro-protoporfirina-IX (hemo *b*) o derivados del mismo, como

el hemo *d* o una clorina (7). El hemo por sí solo cataliza la dismutación del H_2O_2 aunque con mucha menor eficiencia que la catalasa. El dominio del barril- β , que incluye la cavidad del hemo, los aminoácidos que lo orientan y el canal que conduce a él, es la parte más conservada de la molécula (32) (Fig. 9). Las catalasas monofuncionales tienen un canal estrecho que conduce a la parte distal del hemo en donde una histidina y una asparagina participan en la reacción junto con el Fe(III) y el hemo. El Fe(III) no tiene enlace de coordinación en la parte distal y en la parte proximal el enlace es con una tirosina muy conservada. El canal estrecho y la falta de coordinación del Fe(III) en el lado distal tienen que ver con la selectividad por el H_2O_2 de estas enzimas, aunque también son capaces de oxidar algunas moléculas pequeñas, como formato, metanol o etanol (actividad de peroxidasa). Al entrar un H_2O_2 al sitio activo toma un electrón del hierro y otro del hemo para generar una molécula de agua y el compuesto I, que consiste en un ferroxilo y un radical porfirínico catiónico. Una segunda molécula de H_2O_2 cede un electrón al ferroxilo y otro al hemo, restituyendo el estado inicial de la enzima y liberando una molécula de dióxigeno y otra de agua. El compuesto I también se forma en las hemoperoxidasas. Pero en estas enzimas la reducción del compuesto I ocurre en dos pasos: un compuesto reductor cede un electrón al compuesto I para formar el compuesto II y con una segunda molécula de reductor lo reduce al estado inicial. Algunas catalasas pequeñas pueden unir NADPH que posiblemente evita la generación del compuesto II inactivo (33). En cambio, las catalasas grandes no pueden unir NADPH debido a que tienen un dominio adicional en el extremo C-terminal similar al de la flavodoxina cuya función se desconoce (32) (Fig. 9).

Muchos microorganismos anaerobios y termofílicos carecen de hemoproteínas pues son incapaces de sintetizar el grupo hemo. Sin embargo, algunos de ellos tienen enzimas con actividad de catalasa. Estas **pseudocatalasas** en vez del grupo hemo tienen dos átomos de Mn en su centro catalítico (34). Son homooligómeros y sus secuencias de aminoácidos no tienen similitud con las otras catalasas.

La mayor parte del $\text{NO}\cdot$ que se produce en los tejidos de los mamíferos se une a la hemoglobina o a la mioglobina. Sin embargo, muchos microorganismos y también las plantas tienen hemoglobinas. La función de algunas de estas proteínas es la de unir O_2 y posiblemente liberarlo conforme se vaya requiriendo, como la leghemoglobina que rodea los nódulos en donde las especies de *Rhizobium* en simbiosis con la planta llevan a cabo la fijación del nitrógeno atmosférico. Sin embargo, recientemente se ha visto que unas hemoglobinas que tienen FAD unido, las **flavohemoglobinas**, se inducen con el $\text{NO}\cdot$ además de con el O_2 . Estas proteínas sirven posiblemente para desechar el $\text{NO}\cdot$ (35). El FAD de estas proteínas recibe los electrones del NADH para reducir 2O_2 en 2O_2^- y éstos se combinan con $2 \text{NO}\cdot$ para formar 2NO_3^- , en vez de 2ONOO^- que se formarían de manera espontánea.

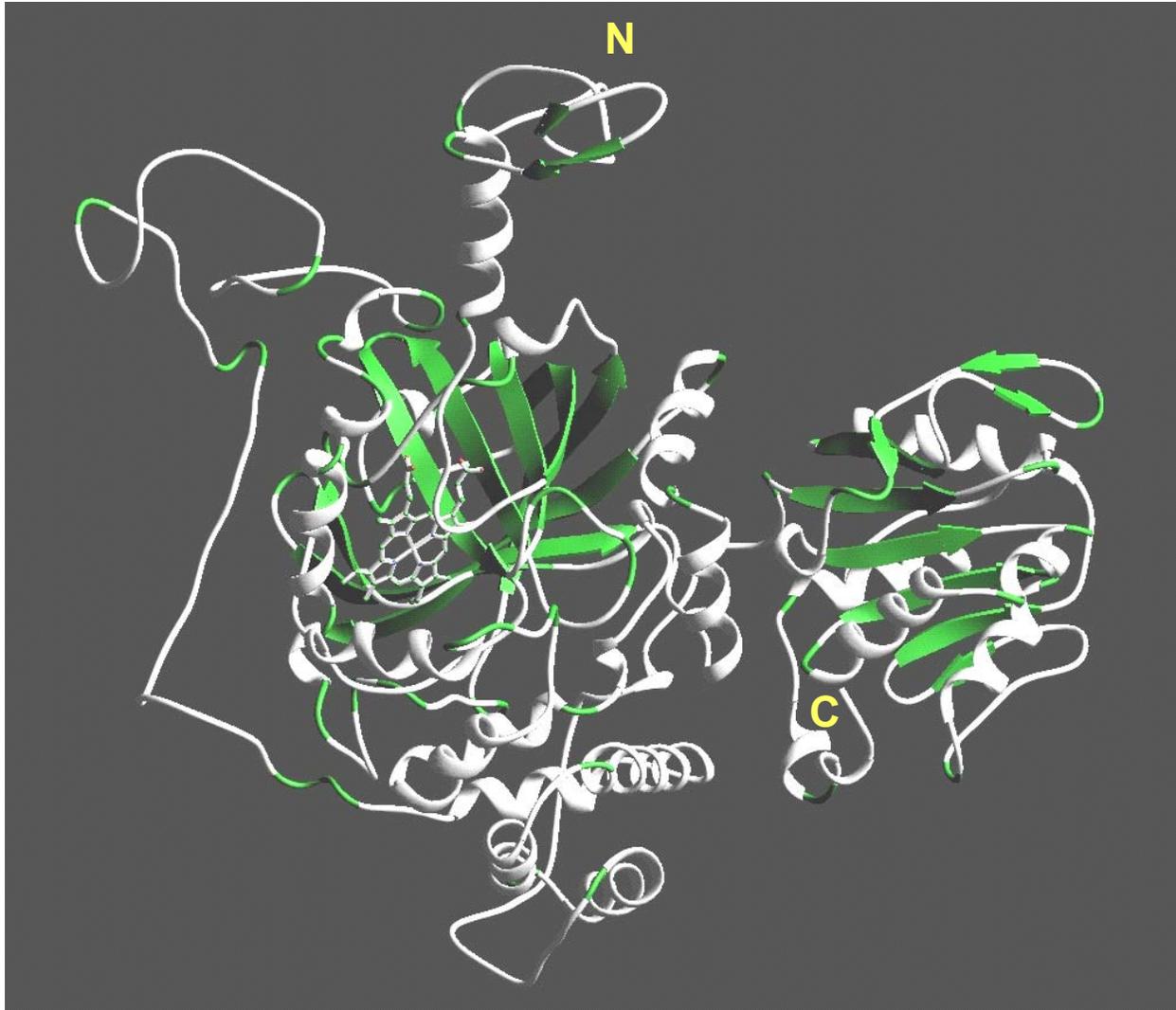


Figura 9. Estructura cristalográfica del monómero de la catalasa-1 de *N. crassa*. La estructura tiene una resolución de 1.75 Å. En la imagen se aprecia el amino terminal (N), un asa envolvente, la cavidad del hemo y el dominio del carboxilo terminal (C) que es semejante al dominio de la flavodoxina. Las catalasas pequeñas no tienen este último dominio. Tomado de Díaz A, Rudiño E, Arreola R, Horjales E y Hansberg W, manuscrito en preparación.

Las enzimas que producen especies de oxígeno reactivas

En las células, las especies de oxígeno y nitrógeno reactivas están generando continuamente productos de oxidación y de nitratación que se pueden detectar en los sitios que se producen o como productos que se desechan. Esto se debe en parte a que no se puede evitar totalmente la generación del HO \cdot y el $^1\text{O}_2$ ni prever el sitio en donde se van a producir. Pero también la evidencia apunta cada vez más a que las especies de oxígeno y nitrógeno reactivas tienen funciones específicas. Tal es el caso

de la participación del H_2O_2 en la síntesis de la hormona tiroidea y en la maduración y capacitación de los espermatozoides; el NO^\cdot en la vasodilatación en los mamíferos; en la formación de la envoltura de fertilización en el erizo de mar; en la formación de lignina y el entrecruzamiento de los componentes de la pared celular en los sitios de invasión de los microorganismos en el caso de las plantas. Por otro lado, las especies de oxígeno reactivas generan mutaciones y éstas son la base del proceso evolutivo.

Los organismos no sólo tienen enzimas para desechar las especies de oxígeno y nitrógeno reactivas sino que también tienen enzimas que producen O_2^\cdot y NO^\cdot y ácidos hipohalogenosos, además de las oxidasas que producen H_2O_2 . La **oxidasa de NADPH** es una enzima que se encuentra en muchas células y que produce 2O_2^\cdot a partir de 2O_2 y NADPH como donador de electrones. Las enzimas que más se han estudiado son las que se activan cuando algún microorganismo invade el organismo, como la responsable de la llamada explosión oxidativa en los leucocitos de los mamíferos y en las plantas (36). Sin embargo, las oxidasas de NADPH también se encuentran en otras células como los fibroblastos, las células del músculo liso vascular, los condrocitos y en las células tiroideas, en donde se genera H_2O_2 para la yodinación de la hormona tiroidea. Se han detectado oxidasas de NADPH en peces e insectos. En el genoma de *N. crassa* se encuentran dos $p91^{\text{phox}}$ (www.genome.wi.mit.edu) y se ha aislado y cancelado un gen de una oxidasa de NADPH en *Aspergillus nidulans* (J. Aguirre, comunicación personal).

La enfermedad granulomatosa crónica es un padecimiento hereditario en el cual los pacientes carecen de la actividad de oxidasa de NADPH, por lo que son muy susceptibles a padecer infecciones microbianas. El estudio de estos pacientes ha revelado una buena parte de lo que se sabe de la enzima de los leucocitos (36). Ante un determinado estímulo (aniones anfífilicos, como el ácido araquidónico, los lipopolisacáridos, el péptido bacteriano formil-Met-Leu-Phe-Lys, la menadiona, el leucotrieno B₄, los ésteres de forbol y el ácido fosfatídico), la enzima se activa cuando las subunidades citosólicas $p47^{\text{phox}}$ y $p67^{\text{phox}}$ se ensamblan con las subunidades membranales $p91^{\text{phox}}$ y $p22^{\text{phox}}$ que conforman el citocromo b_{558} . Para que la subunidad $p67^{\text{phox}}$ citosólica se pueda ensamblar con el citocromo b_{558} membranal, la proteína GTP-Rac1 (o Rac2) debe desplazar a la proteína $p40^{\text{phox}}$ en su unión con la $p67^{\text{phox}}$. La unión de la $p67^{\text{phox}}$ a Rac es regulada por fosforilación que ocasiona la exposición de un dominio de unión SH3 en $p67^{\text{phox}}$. La subunidad citosólica $p47^{\text{phox}}$ también requiere que se fosforile para unirse a la subunidad $p22^{\text{phox}}$ membranal a través de un dominio SH3. Tanto Rac como $p47^{\text{phox}}$ sirven como acarreadores de $p67^{\text{phox}}$ a la membrana (37). Cuando Rac está prenilado y se incorpora a la membrana ya no se requiere $p47^{\text{phox}}$. La activación depende de la cinasa de proteína C (PKC) y de una fosfatasa de tirosina y también de la presencia de iones Mg^{2+} y Ca^{2+} y de calmodulina. La subunidad membranal $p91^{\text{phox}}$ tiene un sitio de unión para el NADPH, para una flavina y para dos hemos. El NADPH cede electrones a la flavina y de ahí se piensa que los electrones pasan a los hemos y finalmente al O_2 . Como hay un transporte de electrones hacia afuera de la célula, para equilibrar las cargas se requiere acoplar la actividad de la oxidasa de NADPH con un canal de protones de la misma enzima localizado en $p91^{\text{phox}}$. Cuando se activa esta enzima hay un incremento en el flujo de la

vía de las pentosas para producir suficiente NADPH. Hay dos familias de NADPH oxidasas: la familia NOX, cuyas proteínas tienen 560-580 aminoácidos, y la familia DUOX, que son mucho más grandes, de 1550 aminoácidos. La oxidasa de NADPH de las células endoteliales (NOX1 y NOX4) genera mucho menos O_2^- que la de las células fagocíticas y el mecanismo de activación es diferente ya que la enzima está ensamblada y unida al citoesqueleto (38). Recientemente se ha descrito otra oxidasa de NADPH (NOX5), que se presenta en dos formas por un ensamble alternativo ("splicing"), una de ellas es específica de los espermatozoides y la otra del bazo y los nódulos linfáticos. Esta enzima se activa con calcio y es también un canal de protones (39). En las plantas la NADPH oxidasa se activa con la invasión de un microorganismo (40) y al parecer no requiere la activación de proteínas citosólicas (41).

Las células fagocíticas no solamente generan O_2^- a través de la oxidasa de NADPH sino que simultáneamente la sintasa del óxido nítrico produce $NO\cdot$ y la mieloperoxidasa sintetiza HOCl a partir del Cl^- y el H_2O_2 y, en los eosinófilos, la bromoperoxidasa produce ácido hipobromoso. El O_2^- junto con el $NO\cdot$ pueden generar $ONOO^-$ y los ácidos hipohalogenosos son capaces de descomponer el peróxido de hidrógeno y formar 1O_2 . Este coctel de oxidantes inicialmente está dirigido contra el microorganismo fagocitado pero muchas veces acaba por afectar a los propios fagocitos y a las células vecinas.

En algunos casos se ha observado que la enzima deshidrogenasa de xantina, que cataboliza la xantina en hipoxantina y luego en urato, se modifica en sus grupos sulfhidrilos y se proteoliza convirtiéndose en una **oxidasa de xantina** (42). La oxidasa en vez del NAD^+ utiliza como aceptor de electrones el O_2 para formar O_2^- . Esta transformación enzimática se ha detectado en los experimentos de isquemia y reperfusión (hipoxia(anoxia)/ reoxigenación) y explica en parte las especies de oxígeno reactivas que se forman durante la reoxigenación.

La **sintasa del óxido nítrico** (NOS) genera óxido nítrico a partir del grupo guanidino de la arginina. En presencia de 2 O_2 y de 2 NADPH, la enzima transforma la arginina en citrulina y $NO\cdot$. Los mamíferos tienen tres isoenzimas, dos de ellas son relativamente constitutivas y otra es inducible. Todas requieren de la calmodulina para su activación pero sólo las primeras dependen de la concentración de Ca^{2+} (43). Las células fagocíticas activadas producen una gran cantidad de $NO\cdot$. En los vasos sanguíneos el $NO\cdot$ liberado por el endotelio vascular es dos o tres órdenes menor que el de los macrófagos. Este $NO\cdot$ se difunde y se une al hemo de la ciclasa de guanilato del músculo liso vascular. La enzima se activa produciendo GMP cíclico, el cual induce una disminución en los niveles de Ca^{2+} de los miocitos. Los bajos niveles de Ca^{2+} producen una relajación de las fibras musculares que se traduce macroscópicamente en una vasodilatación. El efecto de la nitroglicerina y de otros nitróxidos, que se han usado desde hace un siglo para la angina de pecho, es precisamente la vasodilatación de las arterias coronarias a través de la producción del $NO\cdot$.

Las especies de oxígeno reactivas en la proliferación y muerte celular y en la senectud de los organismos

El efecto metabólico causado por la unión de la insulina con su receptor membranal se puede obtener con cantidades pequeñas de H_2O_2 . Concentraciones bajas de H_2O_2 (1 μM) causan un aumento de la proliferación celular en células en cultivo. En cambio, concentraciones más altas de H_2O_2 (100 μM) detienen el ciclo celular. Estos cambios son reversibles e involucran la oxidación de puentes de disulfuro, la liberación de Ca^{2+} intracelular y la activación de cinasas de proteínas. Concentraciones aún más altas pueden causar la muerte celular por apoptosis en algunos cultivos celulares y aún más altas la muerte por necrosis.

La concentración extracelular del **Ca^{2+} libre** en los mamíferos es de 1 mM y la concentración citosólica del Ca^{2+} libre es de $\approx 0.1 \mu\text{M}$. La mayor parte del Ca^{2+} celular está secuestrado en el retículo endoplásmico, en las mitocondrias o unido a proteínas (anexina VI). Los transportadores de Ca^{2+} en estos organitos y en la membrana plasmática mantienen el nivel bajo de Ca^{2+} citosólico utilizando energía. La unión de algunas moléculas con sus receptores membranales, así como la tensión oxidativa moderada, produce un aumento transitorio del Ca^{2+} libre, lo cual genera una cascada de señales intracelulares (44). La unión de un efector con su receptor puede activar una proteína G trimérica y ésta a la vez activar la fosfolipasa C. El receptor también puede ser una cinasa de proteína en tirosina/serina o estar acoplado a una cinasa de proteína que activa a otra fosfolipasa C. Las fosfolipasas C actúan sobre el fosfofosfatidilinositol de la membrana celular generando trifosfato de inositol (IP_3) y diacilglicerol (DAG). El trifosfato de inositol activa los canales de Ca^{2+} del retículo endoplásmico que liberan el Ca^{2+} . El diacilglicerol activa la cinasa de proteína C (PKC) que, en presencia del Ca^{2+} , fosforila algunas serinas y treoninas de ciertas proteínas. El Ca^{2+} también se une a la calmodulina y le produce un cambio conformacional que permite su unión a otras proteínas lo que causa la activación de algunas cinasas de proteína, las NOS y la oxidasa de NADPH. El Ca^{2+} también activa la fosfolipasa A_2 que libera ácido araquidónico de las membranas. Todo ello contribuye a regular una respuesta metabólica a nivel de la transcripción de genes y la traducción de ARNm que se puede manifestar, por ejemplo, en proliferación celular o en la detención del ciclo celular. El trifosfato de inositol y el diacilglicerol se degradan rápidamente y las fosfatasas restituyen el estado inicial de las proteínas con lo cual la célula puede recibir otras señales.

El receptor cinasa de proteína puede estar asociado también con una proteína G pequeña, como Rac (Rac-1 y Rac-2), que a la vez desencadena una cascada de fosforilación que finalmente fosforila y activa un factor de transcripción. Las fosfatasas tienen una cisteína en su sitio activo que requieren para unir el fosfato. Debido a que la actividad de las fosfatasas es mucho mayor que la de las cinasas, es posible que se necesiten las especies de oxígeno reactivas para inhibir de manera transitoria las fosfatasas y así se pueda llevar a cabo la cascada de fosforilación. Rac-1 tiene varias funciones relacionadas con las especies de oxígeno reactivas: se requiere para activar la oxidasa de NADPH, conduce a la activación de la cinasa del N-terminal de c-Jun

(JNK) que activa los factores de transcripción en los que participa c-Jun, conduce a la activación del NF- κ B y activa la fosfatasa A₂ (45, 46). La sobreexpresión de algunas peroxirredoxinas o de la catalasa anula la cascada de fosforilación que desencadena la unión del factor de crecimiento epidermal (EGF) y del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) con sus receptores específicos (17, 45, 46).

Las células animales expuestas a una concentración de oxígeno elevada o a una tensión oxidativa transcriben los genes de las proteínas del choque con calor, las llamadas proteínas reguladas por glucosa, la hemoxigenasa-1, la colagenasa, algunas moléculas de adhesión (ICAM-1) y algunas citocinas (TNF, IL-2, IL-6, IL-8), además de la catalasa, la glutatión peroxidasa, la tioredoxina y a veces la MnSOD. Los factores de transcripción activados durante la tensión oxidativa son el NF- κ B, el AP-1 y el AP-2 (47, 48). La actividad del NF- κ B (48, 49) y del AP-1 (50), al igual que el factor de transcripción en bacterias OxyR (51), depende del estado redox de una o dos cisteínas críticas. En el caso del NF- κ B la tioredoxina puede reducir una cisteína para que el factor se pueda unir al ADN (48). La endonucleasa que repara los sitios sin base (sitios AP) (APE/HAP-1) es al mismo tiempo el factor redox Ref-1 que también reduce las cisteínas de AP-1, NF- κ B, Erg-1 y p53 para que éstos se puedan unir al ADN (52). Asimismo se ha descrito la regulación de algunos canales de Ca²⁺ y de K⁺ por el estado redox del GSH/GSSG (53). La tensión oxidativa también activa la expresión de p21 que determina la detención del ciclo celular.

Cuando hay **hipoxia** se inducen muchos genes que, en este caso, están relacionados con el metabolismo del carbono y del hierro y con la proliferación celular y la generación de vasos sanguíneos. El factor de transcripción inducible por hipoxia (HIF), que es responsable de la expresión de estos genes, está regulado tanto a nivel de su degradación como de su activación por una hidroxilasa de prolina y otra de asparagina que sirven como sensores de oxígeno: cuando falta oxígeno no llevan a cabo la hidroxilación del HIF por lo cual éste se activa y no se degrada (54). La tensión oxidativa a través de Rac-1 también activa dicho factor (55), posiblemente inactivando la hidroxilasa de prolina que requiere ascorbato y hierro para su actividad (56).

La **apoptosis** es un proceso de muerte celular ordenado que no afecta a las células vecinas. La activación del proceso es debida a una tensión oxidativa muy acentuada o prolongada. Cuando el Ca²⁺ citosólico aumenta de manera prolongada, las mitocondrias se llenan de Ca²⁺. El ácido araquidónico liberado por la fosfolipasa A₂ desacopla las mitocondrias, éstas se hinchan y comienzan a liberar compuestos mitocondriales, entre ellos el citocromo c. En un determinado momento se pierde el control de la permeabilidad mitocondrial y se libera el Ca²⁺ de las mitocondrias junto con otros compuestos. La ciclosporina A, al bloquear el poro de la transición de la permeabilidad, evita que se pierda dicho control. Bcl-2 forma canales mitocondriales que tienden a mantener el potencial de membrana y además sujeta a la proteasa (Apaf-1) unida a la caspasa 3. Cuando Bax, otra proteína que forma canales, se incorpora a la membrana mitocondrial se propicia el colapso del potencial de membrana y de la permeabilidad mitocondrial. La familia de proteínas de Bcl-2 consta de ocho proteínas antiapoptóticas y nueve proapoptóticas. Con la salida del citocromo

c, la cadena respiratoria ya no puede reducir el O_2 en $2 H_2O$ sino que sólo produce O_2^- . El citocromo c y el ATP propician la activación de Aptf-1 y el procesamiento del zimógeno de la caspasa-3. El citocromo c y el ATP también activan la caspasa-9 (Apaf-3) (57). El Ca^{2+} además activa otra proteasa, la calpaína, que degrada las proteínas de unión de la actina con la membrana celular con lo cual se disocian los microfilamentos. El resultado de esta acción es la formación de globos membranales (blebs) que incluso se desprenden de la célula y cuya ruptura puede causar una necrosis celular. La actividad de la calpaína puede transformar la deshidrogenasa de xantina en oxidasa y generar aún más O_2^- . El O_2^- puede causar la liberación de hierro de los centros [Fe-S] y así causar un mayor daño oxidativo al formar con el H_2O_2 el $HO\cdot$. El aumento del Ca^{2+} , al activar las sintasas del óxido nítrico y la oxidasa de NADPH puede propiciar las condiciones para la formación del $ONOO^-$ y con ello para la nitratación de los compuestos celulares. Asimismo el Ca^{2+} activa la polimerasa de ADP-ribosa, que rápidamente puede agotar las pozas de NAD^+ y de ATP celulares. Durante el proceso apoptótico el glutatión se oxida y se pierde. La apoptosis se puede suprimir con antioxidantes como el tocoferol, la N-acetil cisteína, o la sobreexpresión de la catalasa, una peroxirredoxina o una tioredoxina (58). Sin embargo, una vez activadas las caspasas y la endonucleasa cromosomal que fragmenta el ADN, la célula está condenada a la apoptosis.

No todas las alteraciones que ocurren en la célula causadas por el oxígeno y sus derivados se pueden corregir o desechar. Lo imprevisible del sitio en donde se generan una oxidación o reducción de un compuesto celular, el gran número de posibles radicales secundarios que se pueden producir, las diferentes uniones covalentes entre distintos compuestos celulares, la gran variedad de los productos de degradación de los compuestos oxidados y los aductos que pueden generar con otros compuestos celulares, hace que sea imposible desechar todos los compuestos oxidados y algunos, invariablemente, se van acumulando en las células. Un ejemplo de la acumulación de productos oxidados es la lipofuchina que se deposita en los tejidos de los viejos. Es posible que la acumulación de productos oxidados sea la causa del proceso de **envejecimiento**. Está claro que hay mayor cantidad de compuestos oxidados en las células de un animal viejo que en un animal joven (59). Lo que no está claro es cómo estos productos causan los síntomas de la vejez. La sobreexpresión de la CuZnSOD junto con la catalasa en *Drosophila melanogaster* incrementan la longevidad de las moscas un 30%. En cambio, las mutantes de *Drosophila* sin CuZnSOD viven menos que las normales (60). Las mutantes longevas de *Caenorhabditis elegans* tienen un tasa metabólica menor que los nemátodos normales (60). La longevidad tiene que ver con la tasa de consumo del O_2 tanto a nivel de las especies como del individuo, a mayor consumo más rápido se envejece y menor lapso de vida se tiene. Por ello la restricción calórica incrementa la vida hasta en un 30–40% en todas las especies estudiadas.

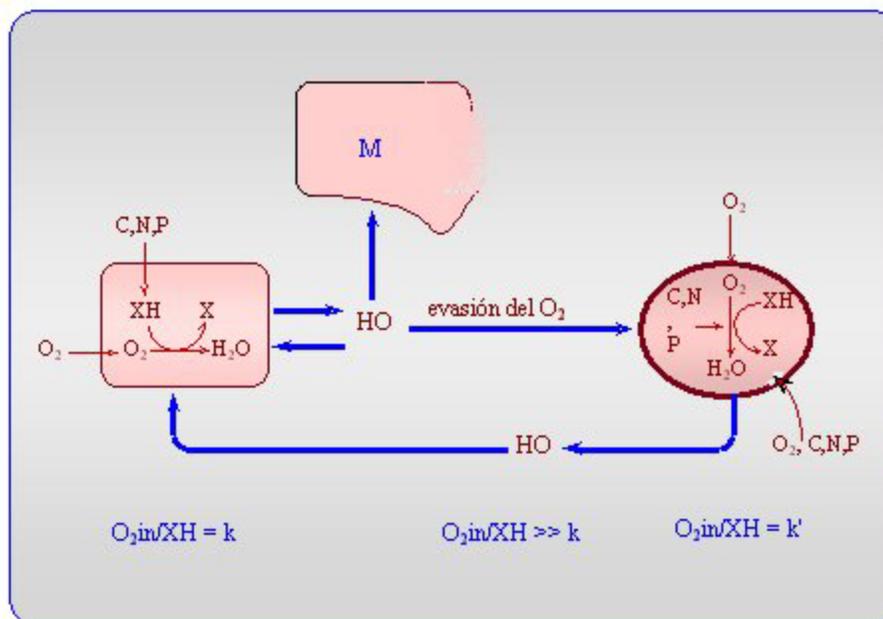


Figura 10. Esquema de la diferenciación celular como respuesta a un estado hiperoxidante. El O_2 entra a la célula por difusión y es reducido casi todo a H_2O , generando energía. Para ello requiere de nutrientes (C,N,P) que junto con la energía se traducen en crecimiento. Mientras se mantenga un equilibrio entre la entrada del O_2 y su reducción (k), el estado de crecimiento es estable. Cuando la célula no puede reducir todo el oxígeno que entra, se genera un estado hiperoxidante inestable (HO), (k aumenta). De este estado la célula puede regresar al estado de crecimiento, si tiene con qué reducir el O_2 , si no, echa a andar mecanismos que evitan o reducen la entrada del O_2 hasta lograr un nuevo equilibrio (k'). En el primer caso la célula se adapta a una condición más oxidante, en el segundo se diferencia. Si no logra ni uno ni otro estado, la célula muere (M). Cuando se rompen las barreras del estado diferenciado y entra el O_2 , se genera un estado hiperoxidante que la célula contrarresta reduciendo el O_2 con los nutrientes que entran junto con el O_2 y así puede regresar al estado de crecimiento. El esquema es una modificación de la figura 1 de la referencia 61.

Las especies de oxígeno reactivas en la diferenciación celular

La tensión oxidativa no sólo regula la proliferación celular, la adaptación a condiciones más oxidantes, la apoptosis y la necrosis de las células sino que tiene un papel fundamental en los procesos de diferenciación celular. Utilizando el ciclo de vida asexual de *N. crassa* para el estudio de la diferenciación celular, hemos observado que, al inicio de cada transición morfogénica, ocurre un estado hiperoxidante en el cual se generan especies de oxígeno reactivas por arriba de la capacidad celular para contender con ellas. Pensamos que la diferenciación celular es una respuesta al estado hiperoxidante y que los mecanismos de diferenciación celular son mecanismos de evasión del oxígeno (61, 62) (Fig. 10). Evidencias del estado hiperoxidante son la

oxidación masiva de proteínas y su degradación (63), la oxidación específica de enzimas con el HO[•] (4, 5, 64), la oxidación de las catalasas por el ¹O₂ (7, 8, 26, 65), la pérdida del poder reductor celular y la excreción del disulfuro de glutatión (11, 66), la quimioluminiscencia espontánea dependiente del O₂ y la inhibición de ésta y de la diferenciación celular con antioxidantes (67). Recientemente hemos obtenido una mutante de *N. crassa* sin el gen de la catalasa-3. Tal como esperábamos, esta cepa crece normalmente pero, en condiciones de tensión, tiene una mayor propensión que la cepa silvestre para entrar en el proceso de esporulación y forma seis veces más micelio aéreo y conidios que la cepa silvestre.

Agradecimientos: Agradezco a Teresa Pastor la revisión cuidadosa del texto.

Referencias:

Como sería demasiado extenso dar las citas específicas sobre la información resumida en esta revisión, se recomienda la consulta del libro de Halliwell B y Gutteridge JMC (1999). *Free Radicals in Biology and Medicine*, 3^a edición, Oxford University Press, Oxford, de donde se sacó la mayor parte de la información básica. Asimismo, se buscó dar artículos de revisión o representativos del avance para cada una de las secciones. Para un breve resumen y la metodología relacionada con el campo se recomienda la consulta de los libros de *Methods in Enzymology* editados por Lester Packer, volúmenes 105, 186, 233, 234 y 319.

1. Lledías F y Hansberg W (2000). Catalase modification as a marker for singlet oxygen. *Methods Enzymol.* 319:110-119.
2. Marnett LJ y Plataras JP (2001). Endogenous DNA damage and mutation. *Trends in Genetics* 17:214-221.
3. Pleschke JM, Kleczkowska HE, Strohm M y Althaus FR (2000). Poly(ADP-ribose) binds to specific domains in DNA damage checkpoint proteins. *J. Biol Chem.* 275:40974-40980.
4. Aguirre J y Hansberg W (1986). Oxidation of *Neurospora crassa* glutamine synthetase. *J. Bacteriol.* 166:1040-1045.
5. Aguirre J, Rodríguez R y Hansberg W (1989). Oxidation of *Neurospora crassa* NADP-specific glutamate dehydrogenase by activated oxygen species. *J. Bacteriol.* 171:6243-6250.
6. Davies MJ y Dean RT (1997). *Radical-mediated protein oxidation*. Oxford University Press, Oxford.
7. Lledías F, Rangel P y Hansberg W (1998). Oxidation of catalase by singlet oxygen. *J. Biol. Chem.* 273:10630-10637.
8. Lledías F y Hansberg W. (2000). Oxidation of human catalase by singlet oxygen in myeloid leukemia cells. *Photochem. Photobiol.* 70:887-892.
9. Mullineaux PM y Creissen GP (1997). Glutathione reductase: regulation and role in oxidative stress. En: *Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant*

- defenses. Scandalios JG. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. pp. 667-713.
10. Sies H y Ketterer B (1988). Glutathion conjugation. Academic Press, London
 11. Toledo I, Noronha-Dutra AA y Hansberg W (1991). Loss of NAD(P)-reducing power and glutathione disulfide excretion at the start of induction of aerial growth in *Neurospora crassa*. J. Bacteriol. 173:3243-3249.
 12. Brigelius-Flohé R y Traber MG (1999). Vitamin E: function and metabolism. FASEB J. 13:1145-1155.
 13. Gralla EB (1997). Superoxide dismutase: studies in the yeast *Sacharomyces cerevisiae*. En: Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defenses. Scandalios JG. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. pp. 495-525.
 14. Scandalios JG (1997). Molecular genetics of superoxide dismutase in plants. En: Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defenses. Scandalios JG. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. pp.527-568.
 15. Touati D (1997). Superoxide dismutase in bacteria and pathogen protists. En: Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defenses. Scandalios JG. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. pp. 447-493.
 16. Okado-Matsumoto A y Fridovich I (2001). Subcellular distribution of superoxide dismutases (SOD) in rat liver: Cu,Zn-SOD in mitochondria. J. Biol. Chem. 276:38388-38393.
 17. Jin DY y Jeang KT (2000). Peroxiredoxins in cell signaling and HIV infection. En: Antioxidant and redox regulation of genes. Sen ChK, Sies H y Baeuerle PA. Academic Press, San Diego. pp. 381-407.
 18. Hoffmann B, Hecht HJ y Flohé L (2002). Peroxiredoxins. Biol. Chem. 383:347-364.
 19. Arnér ES y Holmgren A (2000). Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. Eur. J. Biochem. 267:6102-6109.
 20. Brigelius-Flohé R (1999). Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. Free Radic. Biol. Med. 27:951-965.
 21. Maiorino M y Ursini F (2002). Oxidative stress, spermatogenesis and fertility. Biol. Chem. 383:589-575.
 22. Pfeifer H, Conrad M, Roethlein D, Kyriakopoulos A, Brielmeier M, Bornkamm GW y Behne D (2001). Identification of a specific sperm nuclei selenoenzyme necessary for protamine thiol cross-linking during sperm maturation. FASEB J 15:1236-1238.
 23. Fu LH, Wang XF, Eyal Y, She YM, Donald LJ, Standing KG y Ben-Hayyim G (2002). A selenoprotein in the plant kingdom: Mass spectrometry confirms that an opal codon (UGA) encodes selenocysteine in *Chlamydomonas reinhardtii* glutathione peroxidase. J. Biol. Chem. 277:25983-25991.
 24. Taurog A (1999). Molecular evolution of thyroid peroxidase. Biochemie 81:557-562.
 25. Smith AT y Veitch NC (1998). Substrate binding and catalysis in heme peroxidases. Curr. Opin. Chem. Biol. 2:269-278.
 26. Asada K (1997). The role of ascorbate peroxidase and monodehydroascorbate reductase in H₂O₂ scavenging in plants. En: Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defenses. Scandalios JG. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. pp. 715-735.

27. Peraza L y Hansberg W (2002). *Neurospora crassa* catalases, singlet oxygen and cell differentiation. *Biol. Chem.* 383:589-575.
28. Zámocky M, Janecek S y Koller F (2000). Common phylogeny of catalase-peroxidases and ascorbate peroxidases. *Gene* 256:169-182.
29. Isupov MN, Dalby AR, Brindley AA, Izumi Y, Tanabe T, Murshudov GN y Littlechild, JA (2000). Crystal structure of dodecameric vanadium-dependent bromoperoxidase from the red algae *Corallina officinalis*. *J. Mol. Biol.* 299:1035-1049.
30. Díaz A, Rangel P, Montes de Oca Y, Lledías F y Hansberg W (2001). Molecular and kinetic study of catalase-1, a durable large catalase of *Neurospora crassa*. *Free Rad. Biol. Med.* 31:1323-1333.
31. Klotz MG, Klassen GR y Loewen PC (1997). Phylogenetic relationships among prokaryotic and eukaryotic catalases. *Mol. Biol. Evol.* 14:951-958.
32. Bravo J, Fita I, Gouet P, Jouve HM, Melik-Adamyán W y Murshudov GN (1997). Structure of catalases. En: *Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defenses*. Scandalios JG. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. pp. 407-445.
33. Putnam CD, Arvai AS, Bourne Y y Tainer JA (2000). Active and inhibited human catalase structures: ligand and NADPH binding and catalytic mechanism. *J. Mol. Biol.* 296:295-309.
34. Beyer WF Jr y Fridovich I (1985). Pseudocatalase from *Lactobacillus plantarum*: evidence for a homopentameric structure containing two atoms of manganese per subunit. *Biochemistry* 24:6460-6467.
35. Gardner AM y Gardner PR (2002). Flavohemoglobin detoxifies nitric oxide in aerobic, but not anaerobic, *Escherichia coli*. Evidence for a novel inducible anaerobic nitric oxide-scavenging activity. *J. Biol. Chem.* 277:8166-8171.
36. Babior BM, Benna JE, Chanock SJ y Smith RM (1997). The NADPH oxidase of leukocytes: the respiratory burst oxidase. En: *Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defenses*. Scandalios JG. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. pp. 737-783.
37. Gorzalczyń Y, Alloul N, Sigal N, Weinbaum C y Pick, E (2002). A Prenylated p67phox-Rac1 Chimera Elicits NADPH-dependent Superoxide Production by Phagocyte Membranes in the Absence of an Activator and of p47phox. *J. Biol. Chem.* 277:18605-18610.
38. Li JM y Shah AM (2002). Intracellular localization and pre-assembly of the NADPH oxidase complex in cultured endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 277:19952-19960.
39. Banfi B, Molnár G, Maturana A, Steger K, Hegedűs B, Demaurex N y Krause KH (2001). A Ca²⁺-activated NADPH oxidase in testis, spleen, and lymph nodes. *J. Biol. Chem.* 276:37594-37601.
40. Torres MA, Dangl JL y Jones JD (2002). Arabidopsis gp91phox homologues AtrbohD and AtrbohF are required for accumulation of reactive oxygen intermediates in the plant defense response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 99:517-522.
41. Sagi M y Fluhr R (2001). Superoxide production by plant homologues of the gp91(phox) NADPH oxidase. Modulation of activity by calcium and by tobacco mosaic virus infection. *Plant Physiol.* 126:1281-1290.

42. Enroth C, Eger BT, Okamoto K, Nishino T y Pai EF (2000). Crystal structures of bovine milk xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase: structure-based mechanism of conversion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:10723-10728.
43. Colasanti M, Persichini T, Cavalieri E, Fabrizi C, Mariotto S, Menegazzi M, Lauro GM y Suzuki H (1999). Rapid inactivation of NOS-I by lipopolysaccharide plus interferon-gamma- induced tyrosine phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 274:9915-9917.
44. Girón-Calle J y Forman HJ (2000). Cell Ca^{2+} in signal transduction: modulation in oxidative stress. En: *Antioxidant and redox regulation of genes*. Sen ChK, Sies H y Baeuerle PA. Academic Press, San Diego. pp. 105-127.
45. Finkel T (1998). Oxygen radicals and signaling. *Curr. Opin. Cell Biol.* 10:248-253.
46. Hassanain HH y Goldschmidt-Clermont PJ (2000). Rac, superoxide, and signal transduction. En: *Antioxidant and redox regulation of genes*. Sen ChK, Sies H y Baeuerle PA. Academic Press, San Diego. pp. 47-79.
47. Klotz LO, Briviba K y Sies, H (2000). Signaling by singlet oxygen in biological systems. En: *Antioxidant and redox regulation of genes*. Sen ChK, Sies H y Baeuerle PA. Academic Press, San Diego. pp. 3-20.
48. Okamoto T, Tetsuka T, Yoshida S y Kawabe T (2000). Redox regulation of NF- κ B. En: *Antioxidant and redox regulation of genes*. Sen ChK, Sies H y Baeuerle PA. Academic Press, San Diego. pp. 203-219.
49. Pineda-Molina E, Klatt P, Vázquez J, Marina A, García de Lacoba M, Pérez-Sala D y Lamas S (2001). Glutathionylation of the p50 subunit of NF-kappaB: a mechanism for redox-induced inhibition of DNA binding. *Biochemistry* 40:14134-14142.
50. Toone WM, Morgan BA y Jones N (2001). Redox control of AP-1-like factors in yeast and beyond. *Oncogene* 20:2336-2346.
51. Choi H, Kim S, Mukhopadhyay P, Cho S, Woo J, Storz G y Ryu S (2001). Structural basis of the redox switch in the OxyR transcription factor. *Cell* 105:103-113.
52. Fritz G y Kaina B (1999). Phosphorylation of the DNA repair protein APE/REF-1 by CKII affects redox regulation of AP-1. *Oncogene* 18:1033-1040.
53. Koliward SK, Brezezinska AK y Elliot SJ (2000). Redox regulation of ion channels. En: *Antioxidant and redox regulation of genes*. Sen ChK, Sies H y Baeuerle PA. Academic Press, San Diego. pp. 81-104.
54. Lando D, Peet DJ, Whelan DA, Gorman JJ y Whitelaw ML (2002). Asparagine hydroxylation of the HIF transactivation domain: a hypoxic switch. *Science* 295:858-861.
55. Hirota K y Semenza GL (2001). Rac1 activity is required for the activation of hypoxia-inducible factor-1. *J. Biol. Chem.* 276:21166-21172.
56. Bruick RK y McKnight SL (2001). A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF. *Science* 294:1337-1340.
57. Jiang X y Wang X (2000). Cytochrome c promotes caspase-9 activation by inducing nucleotide binding to Apaf-1. *J. Biol. Chem.* 275:31199-31203.
58. Sen ChK (2000). Oxidants and antioxidants in apoptosis: role of Bcl-2. En: *Antioxidant and redox regulation of genes*. Sen ChK, Sies H y Baeuerle PA. Academic Press, San Diego. pp. 221-243.

59. Beckman KB y Ames BN (1997). Oxidants, antioxidants, and aging. En: Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defenses. Scandalios JG. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. pp. 201-246.
60. Orr WC y Sohal RS (2000). Oxidative stress as a governing factor in physiological aging. En: Antioxidant and redox regulation of genes. Sen ChK, Sies H y Baeuerle PA. Academic Press, San Diego. pp. 517-530.
61. Hansberg W y Aguirre J. (1990). Hyperoxidant states cause microbial cell differentiation by cell insulation from dioxygen. J. Teoret. Biol. 142:201-221.
62. Hansberg W (1996). A hyperoxidant state at the start of each developmental stage during *Neurospora crassa* conidiation. Ciência e Cultura 48:68-74.
63. Toledo I y Hansberg W (1990). Protein oxidation related to morphogenesis in *Neurospora crassa*. Exp. Mycol. 14:184-189.
64. Toledo I, Aguirre J y Hansberg W (1994). Enzyme inactivation related to a hyperoxidant state during conidiation of *Neurospora crassa*. Microbiology 140:2391-2397.
65. Lledías F, Rangel P y Hansberg W (1999). Singlet oxygen is part of a hyperoxidant state generated during spore germination. Free Radic. Biol. Med. 26:1396-1404.
66. Toledo I, Rangel P y Hansberg W (1995). Redox imbalance at the start of each morphogenetic step of *Neurospora crassa* conidiation. Arch. Biochem. Biophys. 319:519-524.
67. Hansberg W, de Groot H y Sies, H. (1994). Reactive oxygen species associated with cell differentiation in *Neurospora crassa*. Free Radic. Biol. Med. 14:287-293.
68. Hansberg W (1999). La biología del dioxígeno en singulete. TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas, FES Zaragoza, UNAM 2:47-55.