

Estrès oxidatiu i defensa antioxidant durant l'exercici

Estrés oxidativo y defensa antioxidante durante el ejercicio

Carmen Romero García

Departamento de Bioquímica. Universidad Complutense. Madrid.

Introducció

Toxicitat de l'oxigen

Potser la primera qüestió a què podem recórrer per explicar la toxicitat de l'oxigen, és que aquest és capaç d'inhibir enzims cel·lulars. Tanmateix, ja el 1954 Rebecca Gershman i Daniel L. Gilbert proposaven que la inhibició d'enzims i, generalment, la majoria de danys atribuïts a l'oxigen, són deguts a un increment en la producció de radicals lliures derivats de l'oxigen.

Radicals lliures d'oxigen

Podem definir "radical lliure" com qualsevol molècula que és capaç d'existir independentment i que conté un o més electrons no aparellats en llurs orbitals més externs; un electró es troba no aparellat quan apareix sol en un orbital. La majoria de molècules biològiques no són radicals i contenen únicament electrons aparellats.

Un electró en un orbital pot tenir dues direccions possibles de spin. Utilitzant la tècnica de ressonància de spin electrònic es poden detectar radicals, ja que aquesta tècnica mesura canvis d'energia que tenen lloc quan un electró canvia la seva direcció de spin (Cammack, 1987). Com que els electrons són generalment més estables quan apareixen aparellats, els radicals són generalment més reactius que les espècies no radicals, tot i que hi ha una variació considerable quant a la seva reactivitat.

Els radicals poden reaccionar amb altres molècules a través de nombroses vies (Slater, 1984). Si

Introducción

Toxicidad del oxígeno

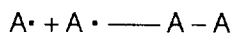
Quizás la primera cuestión a la que podemos recurrir para explicar la toxicidad del oxígeno, es que éste es capaz de inhibir enzimas celulares. Sin embargo, ya en 1954 Rebecca Gershman y Daniel L. Gilbert proponen que la inhibición de enzimas y en general la mayoría de daños atribuidos al oxígeno son debidos a un incremento en la producción de radicales libres derivados de oxígeno.

Radicales libres de oxígeno

Podemos definir "radical libre" como cualquier molécula que es capaz de existir independientemente y que contiene uno o más electrones no apareados en sus orbitales más externos, un electrón se encuentra no apareado cuando aparece solo en un orbital. La mayoría de las moléculas biológicas no son radicales y contienen únicamente electrones apareados.

Un electrón en un orbital puede tener dos direcciones posibles de spin. Utilizando la técnica de resonancia de spin electrónico pueden detectarse radicales, ya que esta técnica mide cambios de energía que ocurren cuando un electrón cambia su dirección de spin (Cammack, 1987). Como los electrones son en general más estables cuando aparecen apareados, los radicales son en general más reactivos que las especies no radicales, aunque existe una considerable variación en cuanto a su reactividad.

dos radicals es troben poden combinar els seus electrons no aparellats (simbolitzat per \cdot) i unir-se covalentment.



Un radical pot donar el seu electró no aparellat o acceptar un electró d'una molècula. Si un radical dóna o pren un electró d'una espècie no radical, aquesta es transforma en un radical lliure. Una característica de les reaccions dels radicals lliures és que donen lloc a reaccions en cadena.

Els radicals lliures d'oxigen són el radical hidroxil ($\cdot\text{OH}$), radical superòxid (O_2) i peròxid d'hidroxil (H_2O_2). Durant molts anys s'ha estudiat el paper de les reaccions dels radicals lliures en el dany cel·lular. Quan un teixit és exposat, per exemple, a radiació gamma, l'energia és absorbida per l'aigua cel·lular i desencadena la següent reacció: $\text{H} - \text{O} - \text{H} \longrightarrow \text{estat intermedi} \longrightarrow \cdot\text{H} + \cdot\text{OH}$

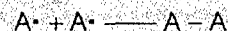
$\cdot\text{OH}$ és el radical hidroxil i és el radical lliure més reactiu que coneixem; és capaç de danyar la majoria de les molècules que formen part de les cèl·lules (Hamiwell i Gutteridge, 1985). El radical hidroxil és capaç de danyar la majoria de les molècules que formen part de les cèl·lules (Hamiwell i Gutteridge, 1985). El radical hidroxil és tan reactiu que solament existeix com a tal durant pocs microsegons i es combina ràpidament amb molècules veïnes tot començant una sèrie de reaccions de propagació. És capaç d'atacar el DNA provocant alteracions químiques de les bases que poden arribar a mutacions (Aruoma et al., 1989). La reparació imperfecta d'aquests danys pot desencadenar l'activació d'oncògens i carcinogènesis (Breimer, 1988). Hi ha diferents sistemes implicats en la reparació del DNA; generalment, els mecanismes que reparen danys causats per radical hidroxil ho fan mitjançant "excisió"; un DNA glicosilat eliminaria la base danyada i, posteriorment, un DNA endonucleasa reconeix el lloc danyat i el repara.

La generació de radicals hidroxil és el principal mecanisme pel qual són atacades les cèl·lules malignes utilitzant radioteràpia.

El dany biològic causat per $\cdot\text{OH}$ més ben caracteritzat són la sèrie de reaccions anomenades peroxidació lipídica, i que apareix esquematitzada a la Figura 1. La peroxidació de fosfolípids de membrana, concretament d'àcids grassos poliinsaturats, dóna lloc a l'acumulació d'hidroperòxids lipídics en les membranes que alteren el seu funcionament (Simson i Lucchesi, 1987). A més, aquests hidroperòxids lipídics donen lloc a una sèrie de productes altament citotòxics, la majoria aldehyds (Esterbaner et al., 1988), que poden causar dany a proteïnes i enzims de membrana i inactivar receptors (Dean et al., 1986).

Un altre dels radicals lliures d' O_2 és el radical superòxid, que es forma per addició d'un electró extra a una molècula d'oxigen $\text{O}_2 + e^- \longrightarrow \text{O}_2^{\cdot-}$

Los radicales pueden reaccionar con otras moléculas a través de numerosas vías (Slater, 1984). Si dos radicales se encuentran pueden combinar sus electrones no apareados (simbolizado por \cdot) y unirse covalentemente.



Un radical puede donar su electrón no apareado o aceptar un electrón de otra molécula. Si un radical dona o toma un electrón de una especie no radical, ésta se transforma en un radical libre. Una característica de las reacciones de los radicales libres es que dan lugar a reacciones en cadena.

Los radicales libres de oxígeno son el radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$), radical superóxido (O_2), y peróxido de hidroxilo (H_2O_2). Durante muchos años se ha estudiado el papel de las reacciones de los radicales libres en el daño celular. Cuando un tejido es expuesto, por ejemplo, a radiación gamma, la energía es absorbida por el agua celular y desencadena la siguiente reacción: $\text{H} - \text{O} - \text{H} \longrightarrow \text{estado intermedi} \longrightarrow \cdot\text{H} + \cdot\text{OH}$

$\cdot\text{OH}$ es el radical hidroxilo y es el radical libre más reactivo que se conoce, es capaz de dañar a la mayoría de las moléculas que forman parte de las células (Hamiwell y Gutteridge, 1985). El radical hidroxilo es tan reactivo que solamente existe como tal durante pocos microsegundos combinándose rápidamente con moléculas vecinas y comenzando una serie de reacciones de propagación. Es capaz de atacar al DNA provocando alteraciones químicas de las bases que pueden llegar a mutaciones (Aruoma et al., 1989). La reparación imperfecta de tales daños puede desencadenar la activación de oncogenes y carcinogènesis (Breimer, 1988). Existen diferentes sistemas implicados en la reparación del DNA, en general los mecanismos que reparan daños causados por radical hidroxilo lo hacen mediante "excisión", una DNA glicosilasa eliminaría la base dañada y posteriormente una DNA endonucleasa reconoce el sitio dañado y lo repara.

La generación de radicales hidroxilo es el principal mecanismo por el cual son atacadas las células malignas utilizando radioterapia.

El daño biológico causado por $\cdot\text{OH}$ mejor caracterizado son la serie de reacciones denominadas como peroxidación lipídica, y que aparece esquematizada en la figura 1. La peroxidación de fosfolípidos de membrana, en concreto de ácidos grasos poliinsaturados da lugar a la acumulación de hidroperóxidos lipídicos en las membranas que alteran su funcionamiento (Simson y Lucchesi, 1987). Además estos hidroperóxidos lipídicos dan lugar a una serie de productos altamente citotóxicos, la mayoría aldehydos (Esterbaner et al., 1988), que pueden causar daño a proteínas y enzimas de membrana e inactivar receptores (Dean et al., 1986).

Otro de los radicales libres de O_2 , es el radical

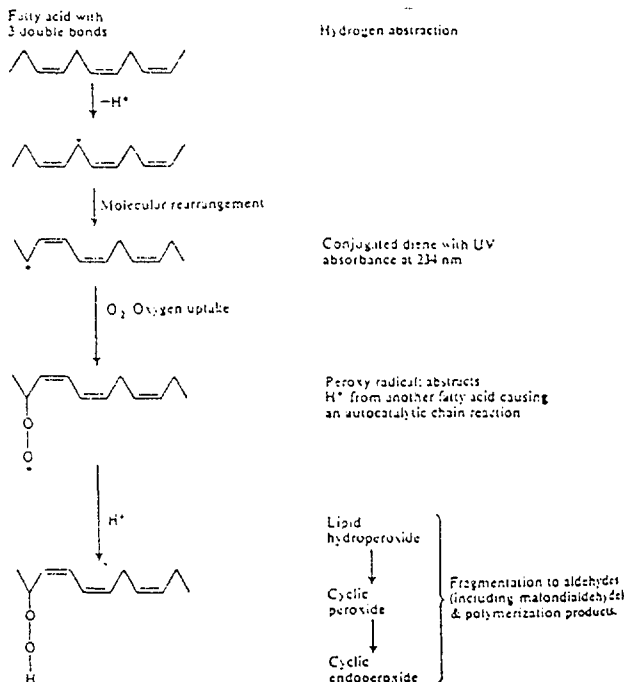
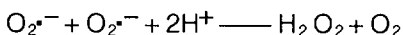


Figura 1. Representació de les reaccions d'iniciació i propagació de peroxidació d'un àcid gras amb tres dobles enllaços.

Figura 1. Representación de las reacciones de iniciación y propagación de peroxidación de un ácido graso con tres dobles enlaces.

(radical superòxid). Començà a ser molt estudiat arran del descobriment de l'enzim superòxid dismutasa (Fridovich, 1974), que elimina aquest radical catalitzant la següent reacció:

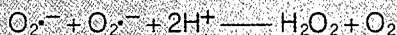


És lògic pensar que en l'organisme hi ha mecanismes de defensa antioxidants, no solament superòxids dismutasa (SOD), sinó també altres que descriuen més endavant, sobretot perquè durant el metabolisme cel·lular es produeixen radicals lliures, com és el cas de la cadena de transport electrònic mitocondrial, en la qual alguns electrons passen directament a l'O₂ reduint-lo a O₂^{·-} (Fridovich, 1974, 1983) (Figura 2). També es formen radicals lliures en l'antioxidació de compostos orgànics. Hi ha un gran nombre d'enzims que redueixen oxigen a O₂^{·-} que s'allibera en solució lliure. A la Taula I es descriuen alguns d'aquests enzims.

Part de la producció d'O₂^{·-} in vivo és funcional, cèl·lules fagocitiques activades generen radical superòxid com ha estat demostrat per a monòcits, neutròfils, eosinòfils i macròfacs (Curnutte i Babior, 1987). La producció de radicals lliures és important en processos fagocitics d'eliminació de bacteris.

El superòxid dismutasa elimina radical superòxid convertint-lo en peròxid d'hidrogen i oxigen. Però

superòxid, que se forma per adició de un electró extra a una molècula de oxigen O₂ + e⁻ → O₂^{·-} (radical superòxid). Començà a ser molt estudiat a raiz del descobriment de la enzima superòxid dismutasa (Fridovich, 1974), que elimina este radical catalitzando la siguiente reacció:



Es lògic pensar que en el organisme existan mecanismes de defensa antioxidants, no sólo superòxid dismutasa (SOD), també otros que describiremos más adelante, sobre todo, porque durante el metabolismo celular se producen radicales libres, tal es el caso de la cadena de transporte electrónico mitocondrial, en la que algunos electrones pasan directamente al O₂ reduciéndolo a O₂^{·-} (Fridovich 1974, 1983) (Figura 2). También se forman radicales libres en la autoxidación de compuestos orgánicos. Existen un gran número de enzimas que reducen oxígeno a O₂^{·-} que se libera en solución libre. En la tabla I se describen algunas de estas enzimas.

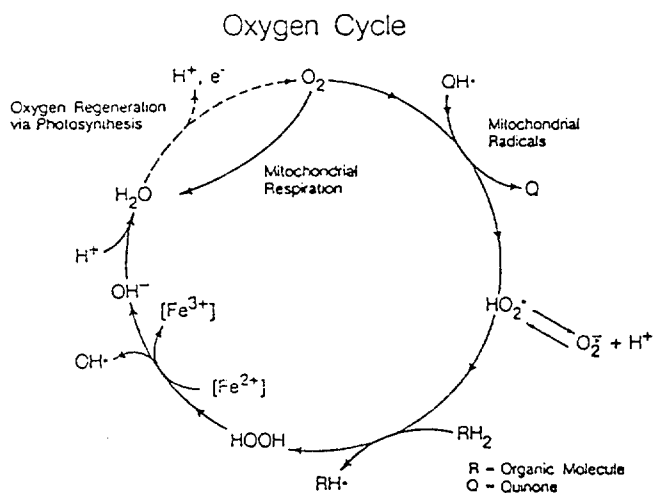


Figura 2. Reaccions cel·lulars que generen radicals lliures d'oxigen. La ubiquinona mitocondrial de la cadena de transport electrònic en l'estat de semiquinona reacciona amb oxigen per formar radical superòxid. La superòxid dismutasa converteix el radical superòxid a peròxid d'hidrogen, que més tard pot ser eliminat per l'acció de l'enzim glutatió peroxidasa. Alternativament les reaccions de Fenton catalitzades per Fe poden descompondre hidroperòxids per formar radical hidròxil.

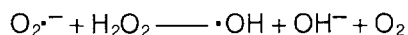
Figura 2. Reacciones celulares que generan radicales libres de oxígeno. La ubiquinona mitocondrial de la cadena de transporte electrónico en el estado de semiquinona reacciona con oxígeno para formar radical superóxido. La superóxido dismutasa convierte el radical superóxido a peróxido de hidrógeno que más tarde puede ser eliminado por la acción de la enzima glutatión peroxidasa. Alternativamente las reacciones de Fenton catalizadas por Fe pueden descomponer hidroperóxidos para formar radical hidroxilo.

Enzyme	Location	Comments
Peroxidases (nonspecific)	Plants and bacteria	O_2^- produced during the oxidase reaction (see Section 3.1.1).
Cellobiose oxidase	White-rot fungus <i>Sporotrichum pulverulentum</i>	Contains FAD and a b-type cytochrome. Oxidizes a range of disaccharides, O_2^- is primary reduced oxygen product.
Xanthine oxidase	Intestine, ischaemic tissues (Chapter 8)	See Section 3.5.1. Forms both O_2^- and H_2O_2
Nitropropane dioxygenase	<i>Hansenula mrakii</i> (a yeast)	Catalyses oxidation of 2-nitropropane into acetone. O_2^- produced and involved in the catalytic mechanism. SOD inhibits the oxidation.
Indoleamine dioxygenase	Most animal tissues, especially small intestine, not liver. Activity of enzyme in lung increases during virus infection or after injection of bacterial endotoxin (30–100 fold) but is not increased by exposure to elevated oxygen concentrations.	<p>Cleaves the indole ring of tryptophan and several related compounds such as serotonin</p> <p>O_2^- produced and involved in the catalytic mechanism, SOD inhibits the oxidation. Inhibition of the SOD in isolated rabbit intestine cells by diethyldithiocarbamate increased tryptophan degradation, as did addition of xanthine.</p>
Tryptophan dioxygenase	Liver	Same reaction as above but specific for tryptophan.
Galactose oxidase	Fungi	Copper enzyme. O_2^- produced and involved in the catalytic mechanism. Oxidizes a $-CH_2OH$ group of the sugar galactose to $-CHO$.
Aldehyde oxidase	Liver	Contains molybdenum, iron. Produces free O_2^- . Broad substrate specificity.

Taula I. Enzims que generen radical superòxid.

Tabla I. Enzimas que generan radical superóxido.

el peròxid d'hidrogen també pot ser tòxic per a cèl.lules. La incubació de cèl.lules amb peròxid d'hidrogen causa danys en el DNA, la membrana i provoca l'alliberació de Ca^{2+} de les cèl.lules, de manera que alguns enzims proteolítics dependents de calci poden ser activats (Halliwell, 1987). Part del dany pot estar mediat per una reacció entre H_2O_2 amb el radical superòxid en presència de ferro per formar radicals altament reactius, radical hidroxil.



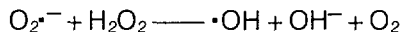
D'altra banda, molts metalls de transició tenen un nombre d'oxidació variable; per exemple, ferro com Fe^{2+} o Fe^{3+} i coure com Cu^+ o Cu^{2+} . Aquests

Parte de la producción de $O_2^{\cdot-}$ in vivo es funcional, células fagocíticas activadas generan radical superóxido como ha sido demostrado para monocitos, neutrófilos, eosinófilos y macrófagos (Curnutte y Babior, 1987). La producción de radicales libres es importante en procesos fagocíticos de eliminación de bacterias.

La superóxido dismutasa elimina radical superóxido convirtiéndolo en peróxido de hidrógeno y oxígeno. Pero el peróxido de hidrógeno también puede ser tóxico para las células. La incubación de células con peróxido de hidrógeno causó daños en el DNA, membrana y provocó la liberación de Ca^{2+} de las células de forma que algunas enzimas pro-

ions metàl·lics són bons promotors de reaccions de formació de radicals lliures (Hill, 1981), estant d'aquesta manera també implicats en peroxidació lipídica a través de dues vies:

Reaccions d'iniciació



Però no solament es poden formar radicals lliures a través de reaccions no enzimàtiques; també hi ha enzims, ciclooxigenases i lipooxigenases que produeixen peròxids orgànics. Quan s'afegeixen ions metàl·lics a sistemes lipídics que ja contenen traces de peròxids, la seva acció principal és descompondre aquests peròxids en radicals peroxil i alcoxil, que són capaços de segrestar hidrogen i perpetuar les reaccions de peroxidació lipídica (Cutteridge, 1988).

De tot l'anterior podríem concloure que els radicals lliures d'oxigen, H_2O_2 , $\cdot OH$ i $O_2^{\cdot-}$ són altament reactius i capaços d'interaccionar amb àcids nucleics, proteïnes i membranes causant disfunció en processos biològics i, per tant, dany cel·lular i tissular (Proctor, 1984).

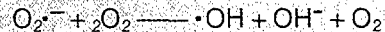
Atès que tant en el camp cel·lular com tissular cal un control de reaccions oxidatives associades amb la producció d'energia, biosíntesi, defensa contra infeccions i toxicitat química (ozó i NO_2 són els dos oxidants més importants en l'ambient i també poden danyar lípids de membrana via peroxidació lipídica), aquest control està mediat per un sistema de defensa antioxidant present en totes les cèl·lules i format per molècules capaces d'actuar com a segrestants de radicals lliures. Aquests sistemes antioxidants es poden classificar en dos grups:

1. *Enzimàtics*.
Superòxid dismutasa.
Catalasa.
Glutació peroxidasa.
2. *No enzimàtics*.
Vitamina E (α -tocoferol).
Àcid ascòrbic.
Àcid úric.

Superòxid dismutasa

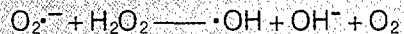
L'enzim superòxid dismutasa (SOD) catalitza la reducció del radical superòxid. Aquest enzim ha estat trobat en tots els organismes que consumeixen oxigen i és una metal·loproteïna. Una forma de SOD dependent de Cu/Zn es troba en el citosol (Cu/Zn-SOD) i un SOD dependent de Mn en la matriu mitocondrial (Mn-SOD) de cèl·lules eucariotes. Un tercer isoenzim extracel·lular (EC-SOD) ha estat aïllat i purificat en pulmó humà i sembla que és el SOD principal en fluids extracel·lulars humans; és una glicoproteïna tetramèrica, hidrofòbica que conté quatre àtoms de coure i quatre de zinc i difereix de Cu/Zn-SOD en propietats antigèniques i composició d'aminoàcids.

teolíticas dependientes de calcio pueden ser activadas (Hallivell, 1987). Parte del daño puede estar mediado por una reacción entre H_2O_2 con el radical superóxido en presencia de hierro para formar radicales altamente reactivos, radical hidroxilo.



Por otro lado, muchos metales de transición tienen un número de oxidación variable, por ejemplo, hierro como Fe^{2+} y cobre como Cu^+ o Cu^{2+} . Estos iones metálicos son buenos promotores de reacciones de formación de radicales libres (Hill, 1981), estando de esta forma también implicados en peroxidación lipídica a través de dos vías:

Reacciones de iniciación



Pero no solamente pueden formarse radicales libres a través de reacciones no enzimáticas, también existen enzimas, ciclooxigenasas y lipooxigenasas que producen peróxidos orgánicos. Cuando se añaden iones metálicos a sistemas lipídicos, que ya contienen trazas de peróxidos su principal acción es descomponer estos peróxidos en radicales peroxil y alcoxil que son capaces de secuestrar hidrógeno y perpetuar las reacciones de peroxidación lipídica (Gutteridge, 1988).

De todo lo anterior podríamos concluir que los radicales libres de oxígeno, H_2O_2 , $\cdot OH$ y $O_2^{\cdot-}$ son altamente reactivos y capaces de interaccionar con ácidos nucleicos, proteínas y membranas causando disfunción en procesos biológicos y por tanto daño a nivel celular y tisular (Proctor, 1984).

Puesto que tanto a nivel celular como tisular es necesario un control de reacciones oxidativas asociadas con la producción de energía, biosíntesis, defensa contra infecciones y toxicidad química (ozono y NO_2 son los dos oxidantes más importantes en el ambiente y también pueden dañar lípidos de membrana via peroxidación lipídica), este control está mediado por un sistema de defensa antioxidante presente en todas las células y formando por moléculas capaces de actuar como secuestrantes de radicales libres. Estos sistemas antioxidantes pueden clasificarse en dos grupos:

1. *Enzimáticos*
Superóxido dismutasa
Catalasa
Glutacion peroxidasa
2. *No enzimáticos*
Vitamina E (α -tocoferol)
Acido ascórbico
Acido úrico

Superóxido dismutasa

La enzima superóxido dismutasa (SOD) cataliza la reducción del radical superóxido. Esta enzima

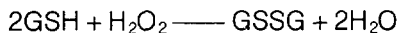
Catalasa

Localitzada principalment en peroxisomes, catalitza la reducció de peròxid d'hidrogen a aigua.

Glutació peroxidasa

És l'enzim més important en l'eliminació de peròxid d'hidrogen, probablement perquè està localitzat en els mateixos orgànuls subcel·lulars que SOD. Fou descobert en cèl·lules roges sanguínies, on inhibeix la descomposició oxidativa d'hemoglobina (Mills, G.C., 1957). Existeix en dues formes: un enzim tetramèric dependent de seleni (Se-GSHPx) (Rotruck et al., 1973) i una forma demèrica independent de seleni (non-Se-GSHPx). El non-Se-GSHPx catalitza la degradació de peròxids orgànics, però no inorgànics (Laurence et al., 1976). El glutació peroxidasa dependent de seleni està localitzat en el citosol i en la matriu mitocondrial; el seleni és essencial per a la seva activitat catalítica, i a més de catalitzar la reducció de H_2O_2 , catalitza la reducció d'hidroperòxids orgànics als seus alcohols corresponents (Cortesi et al., 1972).

El glutatió peroxidasa elimina peròxid d'hidrogen acoblat a glutatió reduït (GSH) que passarà a estar oxidat:



Aquests enzim sembla que està implicat a protegir la cèl·lula contra peroxidació lipídica (Sunde et al., 1980); sembla que Se-GSHPx pot reduir hidroperòxids d'àcids grassos però no hidroperòxids lipídics units a la membrana, i això suggereix que l'alliberació prèvia d'aquests hidroperòxids de la membrana per l'acció d'una fosfolipasa és un requisit previ perquè aquest enzim pugui actuar.

Catalasa i peroxidasa controlen el nivell cel·lular de peròxid d'hidrogen i regulen el to d'hidroperòxids de la cèl·lula. El nivell d'activitat peroxidasa cel·lular sembla que està mantingut per un balanç entre diversos enzims que usen peròxids com a substrat.

Quant als sistemes antioxidants no enzimàtics, la vitamina E (α -tocoferol) és considerat el principal inhibidor fisiològic de peroxidació lipídica de biomembranes (Burton G.W., 1983). És altament lipífil i està integrat en les membranes biològiques, protegint-les per la seva capacitat d'inhibir les reaccions de peroxidació d'àcids grassos poliinsaturats.

El α -tocoferol, malgrat la seva estructura hidrofòbica, posseeix un OH que li permet combinar-se amb radicals peroxil i alcoxil generats durant peroxidació lipídica (Fig. 3), posant fi a una sèrie de reaccions de propagació de peroxidació. A la vegada, el α -tocoferol es converteix en un nou radical tocoferol- $O\cdot$, però aquest radical és molt poc reactiu i no és capaç de reaccionar amb àcids grassos adjacents.

ha sido encontrada en todos los organismos que consumen oxígeno y es una metaloproteína. Una forma de SOD dependiente de Cu/Zn se encuentra en el citosol (Cu/Zn-SOD) y una SOD dependiente de Mn en la matriz mitocondrial (Mn-SOD) de células eucariotas. Una tercera isoenzima extracelular (EC-SOD) ha sido aislada y purificada en pulmón humano y parece ser la principal SOD en fluidos extracelulares humanos, es una glicoproteína tetramérica, hidrofóbica que contiene cuatro átomos de cobre y cuatro de zinc, y difiere de Cu/Zn-SOD en propiedades antigénicas y composición de aminoácidos.

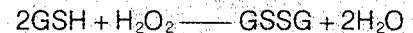
Catalasa

Localizada principalmente en peroxisomas, cataliza la reducción de peróxido de hidrógeno a agua.

Glutation peroxidasa

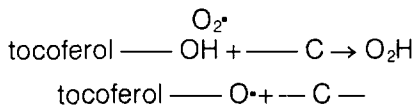
Es la enzima más importante en la eliminación de peróxido de hidrógeno, probablemente porque está localizada en los mismos orgánulos subcelulares que SOD. Fue descubierta en células rojas sanguíneas donde inhibe la descomposición oxidativa de hemoglobina (Mills G.C., 1957). Existe en dos formas: una enzima tetramérica dependiente de selenio (Se-GSHPx) (Rotruck et al., 1973) y una forma demérica independiente de selenio (non-Se-GSHPx). La non-Se-GSHPx cataliza la degradación de peróxidos orgánicos, pero no inorgánicos (Laurence et al., 1976). La glutatión peroxidasa dependiente de selenio está localizada en el citosol y en la matriz mitocondrial, el selenio es esencial para su actividad catalítica y además de catalizar la reducción de H_2O_2 , cataliza la reducción de hidroperóxidos orgánicos a sus correspondientes alcoholes (Cortesi et al., 1972).

La glutatión peroxidasa elimina peróxido de hidrógeno acoplada a glutatión reducido (GSH) que pasará a estar oxidado:



Esta enzima parece estar implicada en proteger la célula contra peroxidación lipídica (Sunde et al., 1980), parece que Se-GSHPx puede reducir hidroperóxidos de ácidos grasos pero no hidroperóxidos lipídicos unidos a la membrana, sugiriendo esto que la liberación previa de estos hidroperóxidos de la membrana por la acción de una fosfolipasa es requisito previo para que pueda actuar esta enzima.

Catalasa y peroxidasa controlan el nivel celular de peróxido de hidrógeno y regulan el tono de hidroperóxidos de la célula. El nivel de actividad peroxidasa celular parece estar mantenido por un balance entre varias enzimas que usan peróxidos como sustrato.



A més, hi han evidències (Mc Cay, 1985) que el radical tocoferol pot migrar a la superfície de la membrana i convertir-se novament en α -tocoferol a través d'una reacció amb àcid ascòrbic (vitamina C).

El paper antioxidant de la vitamina C està basat en la reacció amb radicals peroxil aquosos, mitjançant una reacció similar a la mostrada per a la vitamina E, però en aquest cas el producte de la reacció és el radical ascorbil. Per tant, la vitamina C pot actuar com antioxidant per ella mateixa i, a més, com co-antioxidant interaccionant amb vitamina E (Doba et al., 1985).

Els dos, vitamina C i α -tocoferol, minimitzen les conseqüències de peroxidació lipídica en lipoproteïnes i en membranes biològiques.

Hi ha altres compostos que també poden actuar com antioxidants in vivo, àcid úric i bilirubina; ambdós són importants com antioxidants solubles en aigua implicats en l'atrapament de radicals peroxil, tot i que encara no ha estat elucidada la seva importància fisiològica.

Finalment, cal fer esment a l'efecte antioxidant de B-carotens, explicat per la seva capacitat de segragar oxigen molecular (Krinsky, N.Y., 1979) i participar en reaccions de radicals lliures.

A la taula II apareix els antioxidants més importants en sistemes de membrana, fluids extracel·lulars i compartiments aquosos.

<i>In cellular system</i>	<i>In extracellular</i>
<i>membranes:</i>	<i>fluids:</i>
Vitamin E	Caeruloplasmin
Ubiquinones	Transferrin
<i>Aqueous compartments:</i>	Lactoferrin
Ferritin	Albumin
Vitamin C	Haptoglobin
Glutathione	Superoxide
Superoxide dismutase	dismutase (trace)
Catalase	Uric acid
Glutathione peroxidase	Vitamin C
Glutathione-S-transferase	

Taula II. Antioxidants.

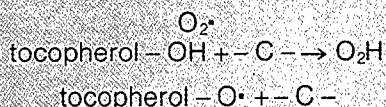
Tabla II. Antioxidantes.

Exercici i estrès oxidatiu

Un concepte que ha estat introduït fa poc és que el metabolisme incrementat associat amb l'exercici pot portar a la producció d'oxidants tenint efectes desfavorables sobre l'organisme (Davies et al., 1982; Packer, 1986a, b, 1987). El que sí que sembla

En cuanto a los sistemas antioxidantes no enzimáticos la Vitamina E (α -tocoferol) es considerado el principal inhibidor fisiológico de peroxidación lipídica de biomembranas (Burton G.W., 1983). Es altamente lipofílico y está integrado en las membranas biológicas, protegiéndolas por su capacidad de inhibir las reacciones de peroxidación de ácidos grasos poliinsaturados.

El α -tocoferol a pesar de su estructura hidrofóbica posee un grupo OH que le permite combinarse con radicales peroxil y alkoxil generados durante peroxidación lipídica (Fig. 3), poniendo fin a una serie de reacciones de propagación de peroxidación. A su vez el α -tocoferol se convierte en un nuevo radical tocoferol-O \cdot , pero este radical es muy poco reactivo y no es capaz de reaccionar con ácidos grasos adyacentes.



Además, existen evidencias (Mc Cay, 1985) de que el radical tocoferol puede migrar a la superficie de la membrana y convertirse de nuevo en α -tocoferol a través de una reacción con ácido ascórbico (vitamina C).

El papel antioxidante de la vitamina C está basado en la reacción con radicales peroxil acuosos mediante una reacción similar a la mostrada para la vitamina E, pero en este caso el producto de la reacción es el radical ascorbil. Por tanto, la vitamina C puede actuar como antioxidante por sí misma y además como co-antioxidante interaccionando con vitamina E (Doba et al., 1985).

Ambos, vitamina C y α -tocoferol minimizan las consecuencias de peroxidación lipídica en lipoproteïnes y en membranas biológicas.

Existen otros compuestos que también pueden actuar como antioxidants in vivo, ácido úrico y bilirrubina, ambos son importantes como antioxidantes solubles en agua implicados en el atrapamiento de radicales peroxil, aunque todavía no ha sido elucidada su importancia fisiológica.

Por último hacer mención al efecto antioxidante de β -carotenos que se explica por su capacidad de secuestrar oxígeno molecular (Krinsky N.Y., 1979) y participar en reacciones de radicales libres.

En la Tabla II aparecen los antioxidants más importantes en sistemas de membrana, fluidos extracel·lulars i compartiments aquosos.

Ejercicio y estrés oxidativo

Un concepto que ha sido introducido recientemente es que el metabolismo incrementado asociado con el ejercicio puede llevar a la producción de oxidantes teniendo efectos desfavorables sobre

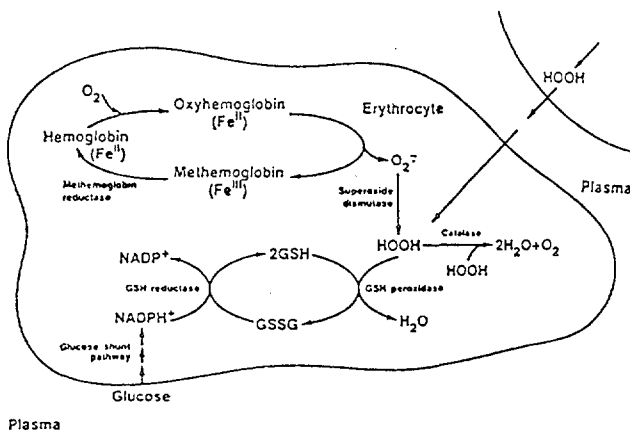
que és clar és que, associat a l'exercici, genera un estrès oxidatiu.

Durant l'exercici el consum d' O_2 es veu augmentat i sembla lògic pensar que més $O_2^{\cdot-}$ i H_2O_2 es formi in vivo, ja que, com hem dit abans, $O_2^{\cdot-}$ pot ser un producte de la cadena de transport electrònic mitocondrial.

A la figura 4 podem veure que l'estrès oxidatiu associat a l'exercici implica, en darrera instància, canvis en el sistema glutatió de sang humana. El sistema glutatió és molt important en el metabolisme cel·lular; la majoria de les cèl·lules utilitzen una gran part del seu poder reductor per mantenir grans quantitats de glutatió en la seva forma reduïda, de manera que més del 95% de glutatió es troba en la seva forma reduïda durant el metabolisme cel·lular normal. El glutatió, en la seva forma reduïda, és molt important perquè està acoblat a l'enzim glutatió peroxidasa per descompondre hidroperòxids orgànics i inorgànics, que podrien originar un dany cel·lular i tissular.

En base a tot l'anterior, el sistema glutatió s'ha utilitzat com a paràmetre en l'estudi de la producció de radicals lliures associat a l'exercici. En individus ben entrenats es mesurà com variaven els nivells de glutatió reduït durant l'exercici (Gohil et al., 1988).

Aquests subjectes feren exercici fins arribar al 65% del seu VO_2 màx. Durant els 15 min. inicials d'exercici, els seus nivells de glutatió en sang canviaren dramàticament; un 60% de glutatió reduït passà a estar oxidat: els nivells de glutatió oxidat es mantingueren 90 min. després de cessar l'exercici; tanmateix, en poques hores els nivells de glutatió reduït tornaren a ser normals. L'oxidació de glutatió indica que durant l'exercici s'estan formant espècies oxidants, ja que la reacció de glutatió amb hidroperòxids causa la seva oxidació.



Plasma

Figura 4. Vies de formació de radicals lliures d'oxigen que provoquen l'oxidació de glutatió.

Figura 4. Vias de formación de radicales libres de oxígeno que provocan la oxidación de glutatión.

el organisme (Davies et al., 1982; Packer 1986a, b, 1987). Lo que sí parece que está claro es que asociado al ejercicio se genera un estrés oxidativo.

Daño asociado al ejercicio

Durante el ejercicio el consumo de O_2 se ve aumentado y parece lógico pensar que más $O_2^{\cdot-}$ y H_2O_2 se forme in vivo, ya que como hemos mencionado anteriormente $O_2^{\cdot-}$ puede ser un producto de la cadena de transporte electrónico mitocondrial.

En la figura 4 podemos ver que el estrés oxidativo asociado al ejercicio implica en última instancia cambios en el sistema glutatió de sangre humana. El sistema glutatió es muy importante en el metabolismo celular, la mayoría de las células utilizan gran parte de su poder reductor en mantener grandes cantidades de glutatió en su forma reducida, de forma que más del 95% de glutatió se encuentra en su forma reducida durante el metabolismo celular normal. El glutatió en su forma reducida es muy importante porque está acoplado a la enzima glutatió peroxidasa para descomponer hidroperóxidos orgánicos e inorgánicos, que podrían originar un daño a nivel celular y tisular.

En base a todo lo anterior, el sistema glutatió se ha utilizado como parámetro en el estudio de la producción de radicales libres asociado al ejercicio.

En individuos bien entrenados se midió cómo variaban los niveles de glutatió reducido durante el ejercicio (Gohil et al., 1988). Estos sujetos hicieron ejercicio hasta llegar al 65% de su VO_2 máx. Durante los 15 min. iniciales de ejercicio, sus niveles de glutatió en sangre cambiaron dramáticamente, un 60% de glutatió oxidado se mantuvieron 90 min. después de cesar el ejercicio, sin embargo en unas pocas horas los niveles de glutatió reducido volvieron a ser normales. La oxidación de glutatió indica que durante el ejercicio se están formando especies oxidantes, ya que la reacción de glutatió con hidroperóxidos causa su oxidación.

Todo esto sugiere que como consecuencia del ejercicio se está produciendo un aumento en los niveles de glutatió sanguíneo que estaría protegiendo al organismo del estrés oxidativo provocado por el ejercicio.

En estudios con animales también se ha encontrado que glutatió es oxidado durante el ejercicio en músculo esquelético particularmente durante un ejercicio exhaustivo, que causa oxidación de glutatió reducido no solamente en tejido muscular, también en otros tejidos como hígado.

Puesto que está claro que se genera durante el ejercicio un estrés oxidativo, Alessio et al., 1988 a señalan la importancia del estudio del efecto a nivel de peroxidación lipídica del ejercicio, pero haciendo entre ejercicio de elevada intensidad (de ahora en adelante lo denominaremos HI) y ejercicio de intensidad moderada (MI).

Tot això suggereix que, com a conseqüència de l'exercici, s'està produint un augment en els nivells de glutació sanguíni que estaria protegint l'organisme de l'estrès oxidatiu provocat per l'exercici.

En estudis amb animals també s'ha trobat que el glutació és oxidat durant l'exercici en el múscul esquelètic, particularment durant un exercici exhaustiu, que causa oxidació de glutació reduït no solament en el teixit muscular sinó també en altres teixits com el fetge.

Ja que és clar que es genera durant l'exercici un estrès oxidatiu, Alessio et al. (1988a) assenyalen la importància de l'estudi de l'efecte a nivell de peroxidació lipídica de l'exercici, però fent distinció entre exercici d'elevada intensitat (d'ara endavant l'anomenarem HI) i exercici d'intensitat moderada (MI).

L'exercici d'elevada intensitat provoca un clar augment de peroxidació lipídica en l'organisme i un augment d'estrès oxidatiu en el múscul, que implicaria la producció de peròxids i aldehids que serien tòxics per a les cèl·lules (Kanter et al., 1988; Davies et al., 1982).

Quan s'estudia la influència de l'exercici HI i MI en l'estrès oxidatiu, mesurant dos paràmetres diferents malonildihaldehid (MDA) i hidroperòxids lipídics (LH) en el múscul sol, les fibres blanques i roges, es veié un increment del 90% en nivells de MDA en fibres blanques i del 62% en fibres roges durant l'exercici MI. L'augment en els nivells de MDA durant l'exercici HI fou de 157, 167 i 83% en fibres blanques, roges i múscul sol respectivament. Els valors de LH en fibres roges i blanques augmentaren un 33% després de l'exercici HI.

Tots els resultats posen de manifest que l'exercici d'intensitat provoca un augment en peroxidació lipídica tant en fibres roges com blanques del múscul, en un grau que dependrà tant del tipus de fibra muscular com de la intensitat de l'exercici. Importància dels sistemes protectors. Activació mediada per l'entrenament.

Hi ha estudis que demostren una inducció d'activitat antioxidant associada a l'exercici (Higuchi et al., 1985; Jenkius et al., 1980), cosa per la qual s'ha proposat que l'entrenament podria actuar activant determinats sistemes antioxidants. En animals entrenats els nivells de malonildihaldehid (MDA) mesurats són més baixos que en els seus respectius controls sedentaris (Alessio et al., 1988b).

La vitamina E (α -tocoferol) és un dels principals antioxidants de la cèl·lula, capaç de detenir les reaccions de propagació que s'esdevenen durant la peroxidació lipídica. Seria molt interessant l'estudi de la resposta de la vitamina E durant l'exercici i l'entrenament (Quintanilha, 1983; Gojil K., 1986; Packer, 1986a; Aikawa et al., 1984).

En una sèrie d'experiments en els quals s'utilitzaren animals que havien estat durament entrenats, es pogué mesurar un gran increment en la biogè-

El ejercicio de elevada intensidad provoca un claro aumento de peroxidación lipídica en el organismo y un aumento de estrés oxidativo en el músculo, que implicaría la producción de peróxidos y aldehidos que serían tóxicos para las células (Kanter et al., 1988; Davies et al., 1982).

Cuando se estudió la influencia del ejercicio HI y MI en el estrés oxidativo, midiendo 2 parámetros diferentes malonildihaldehido (MDA) y hidroperóxidos lipídicos (LH) en el músculo sóleo, fibras blancas y rojas, se vio un incremento del 90% en niveles de MDA en fibras blancas y del 62% en fibras rojas durante el ejercicio MI. El aumento en los niveles de MDA durante el ejercicio HI fue de 157, 167 y 83% en fibras blancas, rojas y músculo sóleo respectivamente. Los valores de LH en fibras rojas y blancas aumentaron un 33% después del ejercicio HI.

Todos estos resultados ponen de manifiesto que el ejercicio de diferente intensidad está provocando un aumento en peroxidación lipídica tanto en fibras rojas como blancas del músculo, en un grado que va a depender tanto del tipo de fibra muscular como de la intensidad del ejercicio.

Importancia de los sistemas protectores. Activación mediada por el entrenamiento

Existen estudios que demuestran una inducción de actividad antioxidante asociada al ejercicio (Higuchi et al., 1985; Jenkius et al., 1980), por lo que se ha propuesto que el entrenamiento podría actuar activando determinados sistemas antioxidantes. En animales entrenados, los niveles de malonildihaldehido (MDA) medidos son más bajos que en sus respectivos controles sedentarios (Alessio et al., 1988b).

La vitamina E (α -tocoferol) es uno de los principales antioxidantes de la célula, capaz de detener las reacciones de propagación que acontecen durante peroxidación lipídica. Sería muy interesante el estudio de la respuesta de la vitamina E durante el ejercicio y el entrenamiento (Quintanilha, 1983; Gojil K., 1986; Packer, 1986a; Aikawa et al., 1984).

En una serie de experimentos en los que se utilizaron animales que habían sido duramente entrenados, se pudo medir un gran incremento en la biogénesis de mitocondria en músculo esquelético rojo y una disminución en el contenido en Vitamina E (Davies et al., 1981).

La dieta que recibieron estos animales contenía una cantidad de Vitamina E considerada como normal (40 IU/Kg peso). El aumento mitocondrial pudo evaluarse en músculo midiendo niveles incrementados de enzimas específicas asociadas con la membrana interna mitocondrial, citocromo-c reductasa y ubiquinona. La comparación de los cambios en el contenido de vitamina E con respecto al de ubiquinona, detectó una disminución espectacular en los animales sometidos a un duro entrenamien-

nesi de mitocondri en el múscul esquelètic roig i una disminució en el contingut en vitamina E (Davies et al., 1981).

La dieta que reberen aquests animals contenia una quantitat de vitamina E considerada com a normal (40 IU/Kg pes). L'augment mitocondrial es pogué avaluar en el múscul mesurant nivells incrementats d'enzims específics associats amb la membrana interna mitocondrial, citocrom-c reductasa i ubiquinona. La comparació dels canvis en el contingut de vitamina E en relació amb el d'ubiquinona detectà una disminució espectacular en els animals sotmesos a un dur entrenament (Gohil et al., 1987). Totes aquestes dades suggereixen que el contingut en vitamina E mitocondrial està disminuït com a conseqüència de l'entrenament i que potser una dieta amb un contingut més elevat de vitamina E seria requerida durant l'exercici regular.

Tanmateix, tot i que el contingut en vitamina E disminueix per efecte de l'exercici en mitocondris de múscul—efecte que podríem considerar adaptatiu—, d'aquesta manera la peroxidació lipídica de biomembranes seria inhibida per vitamina E. Quintanilha i Packer troben que l'entrenament comporta una resposta adaptativa quant a mecanismes de defensa antioxidant, nivells incrementats de glutació peroxidasa, glutació reductasa, catalasa i SOD en múscul esquelètic i de cor de rata.

L'exercici perllongat, especialment en individus no entrenats, sembla que pot provocar dany muscular. Contràriament, en individus entrenats sembla que hi ha una resposta adaptativa; en el plasma d'atletes entrenats es mesuraren les concentracions més elevades de ceruloplasmina, que forma part de la defensa antioxidant extracel·lular, que en el plasma de controls normals.

Actualment encara hi ha una gran polèmica sobre si la formació d'oxidants durant l'exercici és conseqüència del dany muscular o si és una de les causes del dany.

to (Gohil et al., 1987). Todos estos datos sugieren que el contenido en vitamina E mitocondrial está disminuido a consecuencia del entrenamiento y que quizás una dieta con un contenido más elevado de vitamina E sería requerida durante el ejercicio regular.

Sin embargo, aunque el contenido en vitamina E disminuye por efecto del ejercicio en mitocondrias de músculo, efecto que podría considerarse adaptativo, de esta forma la peroxidación lipídica de biomembranas estaría siendo inhibida por vitamina E. Quintanilha y Packer encuentran que el entrenamiento conlleva una respuesta adaptativa en cuanto a mecanismos de defensa antioxidante, niveles incrementados de glutación peroxidasa, glutación reductasa, catalasa y SOD en músculo esquelético y de corazón de rata.

El ejercicio prolongado, especialmente en individuos no entrenados parece que puede provocar daño muscular. Por el contrario en individuos entrenados parece existir una respuesta adaptativa, en el plasma de atletas entrenados se midieron concentraciones más elevadas de ceruloplasmina que forma parte de la defensa antioxidante extracelular que en el plasma de controles normales.

Actualmente todavía existe una gran polémica sobre si la formación de oxidantes durante el ejercicio es consecuencia del daño muscular o si es una de las causas del daño.

Bibliografia

AIKAWA, K.M.; QUINTANILHA, A.T.; de LUMEN, B.; BROOKS, G.A.; PACKER, L.: *Biosci. Rep.* 4: 253-257. 1984.
ALESSIO, H.M.; GOLDFARB, A.H.; GUTTER, R.G.: *Am. J. Physiol.* 255 (Cell Physiol. 24): c874-c877. 1988.
ALLESIO, H.M.; GOLDFARB, A.H.: *J. Appl. Physiol.* 64: 1.333-1.336. 1988.
ARUOMA, O.I.; HALLIWELL, B.; LAUGHTON, M.J.; QUINLAN, J.G.J.; GUTTERIDGE, J.M.C.: *Biochem. J.* 258: 617-620. 1989.
BREIMAR, L.H.: *Br. J. Cancer* 57:6-18. 1988.
CAMMACK, R.: *The Biochemistry of Plants. Volum I* 3. Nova York: Academic Press pp. 229-257. 1987.

CORTESI, R.; PRIVETT, O.S.: *Lipids* 7: 715-721. 1972.
CORNUITTE, J.T.; BABIOR, B.M.: *Adv. Hum. Genet.* 16: 229-245. 1987.
DAVIES, K.J.A.; PACKER, L.; BROOKS, G.A.: *Arch. Biochem. Biophys.* 209: 538-553. 1981.
DAVIES, K.J.A.; QUINTANILHA, A.T.; BROOKS, G.A.; PACKER, L.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 107: 1.198-1.205. 1982.
DEAN, R.T.; THOMAS, S.M.; GARNER, A.: *Biochem. J.* 240: 489-494. 1986.
DOBA, T.; BURTON, G.W.; INGOLD, K.U.: *Biochem. Biophys. Acta* 835: 298. 1985.
ESTERBAUER, H.; ZOLLNER, H.; SCHAUR, R.J.: *ISI Atlas*

- Sci. Biochem. I: 311-315. 1988.
- FRIDOVICH, I.: *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 23: 239-257. 1983.
- FRIDOVICH, I.: *Adv. Enzymol.* 41: 35-48. 1974.
- GOHIL, K.; PACKER, L.; de LUMEN, B.; BROOKS, G.A.; TERBLANCHE, S.E.: *J. Appl. Physiol.* 60: 1.986-1.991. 1986.
- GOHIL, K.; ROTHFUSS, L.; LANG, J.; PACKER, L.: *J. Appl. Physiol.* 63: 1.638-1.641. 1987.
- GOHIL, K.; VIGUIE, C.; STANLEY, W.; BROOKS, G.A.; PACKER, L.: *J. Appl. Physiol.* 64: 115-119. 1988.
- GUTTERIDGE, J.M.C.: *A: Oxygen Radicals and Tissue Injury* (ed. B. Halliwell), Kansas; Allen Press. pp. 9-19. 1988.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C.: *Free Radicals in Biology and Medicine* Oxford: Clarendon Press. 1985.
- HALLIWELL, B.: *Faseb, J. I.* 358-364. 1987.
- HIGUCHI, M.; CARTIER, L.J.; CHEU, M.; HOLLOSZY, J.O.: *J. Gerontol.* 40: 281-286. 1985.
- HILL, H.A.O.: *Phil. Trans. R. Soc. Lond. Ser. B.* 294, 119-128. 1981.
- JENKINS, R.R.; NEWSHAM, D.: *EXperientia Basel* 36: 843. 1980.
- KANTER, M.M.; LESMES, G.R.; KAMINSKY, L.A.; NEQUIN, N.: *Eur. J. Appl. Physiol.* 57: 60-63. 1988.
- KIRKWOOD, S.P.; PACKER, L.; BROOKS, G.A.: *Arch. Biochem. Biophys.* 255: 80-88. 1987.
- KRINSKY, N.I.: *Pure and Appl. Chem.* 51: 649. 1979.
- MARKLUND, S.L.: *Clin. Invest.* 74: 1.398-1-403. 1984.
- MILLS, G.C.: *J. Biol. Chem* 229: 189-197. 1957.
- QUINTANILHA, A.T.; PACKER, L.: *Biology og Vitamin E. A: Porter, R. Whelan (eds.) Proc Ciba Found Symp*, 7-10. març, Pitman, pp. 56-69. 1983.
- PACKER, L.: *Med. Biol.* 62: 105-109. 1986a.
- PACKER, L.: A benzi G., Packer, L., Siliprandi, N. (Eds.). *Biochemical aspects of physical exercise.* Elsevier, Amsterdam, pp. 101-123. 1986b.
- PACKER, L.: A: Benzi G. (ed.) *Advances in myochemistry.* Proc 2n ISM Congr., Roma, Itàlia. Libbey, Londres, pp. 37.50. 1987.
- PROCTOR, P.H.; REYNOLDS, E.S.: *Physiol. Chem. Phys. Med. NMR* 16: 175-195. 1984.
- ROTRUCK, J.T.; POPE, A.L.; GANTHER, H.E.; SWANSON, A.B.; HAFEMAN, D.G.; HOEKSTRA, W.G.: *Science* 179: 588-590. 1973.
- SUNDE, R.A.; HOEKSTRA, W.G.: *Nutr. Rev.* 38: 265-273. 1980.