

Estrés oxidativo, enfermedades y tratamientos antioxidantes

J.I. ELEJALDE GUERRA

Servicio de Medicina Interna del Hospital de Navarra.

OXIDATIVE STRESS, DISEASES AND ANTIOXIDANT TREATMENT

RESUMEN

La oxidación es un proceso bioquímico de pérdida de electrones siempre asociado a otro de captación que llamamos reducción. Esta oxidación es fundamental para la vida pues participa en los procesos de obtención de la energía celular. Sin embargo cuando existe un exceso de oxidación aparece el estrés oxidativo que es una realidad compleja en todos los niveles biológicos que no se puede medir ni definir con un solo parámetro. Hay una multitud de enfermedades que se han relacionado con el estrés oxidativo y la generación de radicales libres. Por esto, terapias antioxidantes y dietas ricas (como la dieta mediterránea) o enriquecidas con antioxidantes parecen prevenir o al menos disminuir el deterioro funcional orgánico originado por un exceso de estrés oxidativo.

PALABRAS CLAVE: Oxidación. Redox. Antioxidante. Radical libre. Estrés oxidativo.

ABSTRACT

Oxidation is a biochemical process of loss of electrons associated with another of reception called reduction. This process is capital for life, because it takes part in the production of cellular energy. Oxidative stress appears when oxidation is excessive. This reality is complex in all biological levels, and cannot be measured or defined by a single parameter. A great number of diseases have been related to oxidative stress and generation of free radicals. For this reason, antioxidant therapies and diets (such as mediterranean diet) rich or enriched with antioxidants seem to prevent or at least to attenuate the organic deterioration originated by an excessive oxidative stress.

KEY WORDS: Oxidation. Redox. Antioxidant. Free radical. Oxidative stress.

Elejalde Guerra JI. Estrés oxidativo, enfermedades y tratamientos antioxidantes. An Med Interna (Madrid) 2001; 18: 326-335.

En bioquímica se considera oxidación a todo proceso en el que ocurre pérdida de electrones, captación de oxígeno o una cesión de hidrógeno (deshidrogenación) y reducción a aquel otro en el cual se captan electrones o se pierden oxígenos. Todo proceso de oxidación va siempre acompañado de otro de reducción. Son reacción de óxido-reducción o reacciones redox entre pares conjugados (1,2).

En la naturaleza casi todo es oxidado por el oxígeno: las grasas se vuelven rancias, la goma pierde elasticidad, el papel amarillea, etc. Además estas reacciones de óxido-reducción son muy importantes en bioquímica, puesto que los seres vivos obtienen la mayor parte de su energía libre a partir de ellas: en la fotosíntesis la energía solar impulsa la reducción del CO₂ y la oxidación del H₂O formando carbohidratos y O₂, y en el metabolismo aeróbico, realizado por los eucariotas y muchos procariotas, tiene lugar un proceso inverso a la fotosíntesis, que permite almacenar la energía libre producida en la oxidación de los carbohidratos y de otros compuestos orgánicos, en forma de ATP (1,2).

Pero este oxígeno que es imprescindible para la vida, puede ser también fuente de enfermedad a través de una producción incontrolada de radicales libres de oxígeno (RLO) que dañan las macromoléculas (lípidos, proteínas, hidratos de carbono y ácidos nucleicos) y alteran los procesos celulares (funcionalidad de las membranas, producción de enzimas, respiración celular, inducción génica, etc.) (3).

Un exceso de RL (moléculas o porciones de ellas, que presentan al menos un electrón desapareado en su orbital más externo y son extraordinariamente reactivos) rompen el equilibrio produciendo el llamado estrés oxidativo. Se producen durante las reacciones metabólicas, mientras las células del organismo transforman los alimentos en energía especialmente en situaciones de hiperoxia, ejercicio intenso e isquemia y también por exposición a determinados agentes externos como las radiaciones ionizantes o luz ultravioleta, polución ambiental, humo del tabaco, etc (4,5). De los RLO inorgánicos los más importantes son el oxígeno molecular O₂, el radi-

Trabajo aceptado: 5 de Octubre de 2000

Correspondencia: J.I. Elejalde Guerra. C/ del Lago 9, 3º A. 31016 Pamplona.

cal-anión superóxido (O_2^-), el radical hidroxilo (HO^\bullet) y su precursor inmediato el peróxido de hidrógeno (H_2O_2). De los secundarios u orgánicos, el radical peroxilo (ROO^\bullet), el hidroperóxido orgánico ($ROOH$) y los lípidos peroxidados (5-9)

En el otro lado de la balanza –que debe mantenerse en equilibrio– están los antioxidantes (sustancias con capacidad para oponerse a la acción del oxígeno y de ciertas especies oxidantes, independientemente de su mecanismo). Hay sistemas enzimáticos antioxidantes capaces de metabolizar los RL generados en los procesos redox celulares (la catalasa de los peroxisomas, la glutatión peroxidasa y la superóxido dismutasa), también hay multitud de antioxidantes no enzimáticos. Los llamados rastrillos de radicales (*radical scavengers*) son especies químicas cuya posibilidad antioxidante reside en su capacidad para destruir directamente los RL (el glutatión, la vitamina C o ácido ascórbico y la vitamina E o alfa tocoferol son los principales). Las proteasas celulares son las encargadas de la eliminación de las proteínas alteradas oxidativamente, que son a su vez fuente generadora de más RLO y finalmente los llamados antioxidantes terciarios se encargan de reparar las biomoléculas dañadas por los RLO (5,10-15).

¿SE PUEDE MEDIR LA OXIDACIÓN?

El estado redox a nivel subcelular, de las células, los tejidos y los organismos es una realidad compleja que no se puede medir ni definir con un solo parámetro aislado (15). No hay métodos estandarizados para medir el estatus de estrés oxidativo (OSS) en humanos o sea ninguno de los llamados biomarcadores del estrés oxidativo (BOSS) consiguen de forma aislada una valoración precisa y definitiva del estrés oxidativo que pueda ser directamente aplicado a la clínica humana (16-20).

A causa de lo anteriormente expuesto no puede resultar extraño que se hayan utilizado una gran diversidad de métodos en la aproximación a esta realidad del estado redox en el organismo humano (16-20). En la tabla I mostramos un resumen de las más importantes.

Hay que tener en cuenta que la mayoría de estas determinaciones pueden variar en función de muchos factores como son el ritmo circadiano, la fase postprandial, el tiempo, la temperatura y otras condiciones de procesamiento. Asimismo las distintas mediciones podrían ser distintas en distintos órganos.

Es posible que cuando se disponga de métodos más precisos para la medición del estrés oxidativo, éste se podrá utilizar en la práctica clínica como un factor de riesgo para determinadas patologías (16).

ENFERMEDADES, PROCESOS DEGENERATIVOS Y ESTRÉS OXIDATIVO

Hay una serie de procesos patológicos atribuibles razonablemente al ataque de RL, al menos estarían implicados en algunas de sus fases o secuencias bioquímicas (6).

Son muchos los procesos patológicos implicados, así como múltiples los descubrimientos llevados a cabo por diferentes grupos de investigación, por ello sólo es posible recoger unos breves comentarios de algunos de estos procesos patológicos más significativos:

1. *El envejecimiento*: es difícil diferenciar entre lo que son procesos propios del envejecimiento o procesos patológicos

que se desarrollan preferentemente durante el envejecimiento. El envejecimiento y la muerte pueden ser el resultado de la activación de genes específicos en un momento determinado del ciclo celular (apoptosis). La teoría de los RLO del envejecimiento supone que este resulta de la acumulación de lesiones orgánicas debidas a RLO (10,82-86). También se ha detectado una menor actividad proteolítica que en las células jóvenes (86), una disminución de las concentraciones de antioxidantes e inactivación de las enzimas detoxificadoras de RLO (87) y una acumulación de proteínas oxidadas no degradadas (88).

2. *La aterosclerosis*: la formación de la placa arteriosclerótica se inicia con la captación de lipoproteínas de baja densidad (LDL) por los macrófagos que se transforman así en células espumosas. Estas células son captadas por el endotelio mediante moléculas de adhesión y se acumulan en el espacio subendotelial, donde inducen la migración de células musculares, su proliferación e hipertrofia (89,90). En determinadas condiciones oxidativas las lipoproteínas se fragmentan y se alteran determinados residuos de aminoácidos de la apoproteína de la LDL (86). Estas LDL oxidadas o productos liberados de ellas, van a tener mayor poder aterogénico ya que son captadas más avidamente por los macrófagos, son citotóxicas para el endotelio y estimulan la producción de factores vasoactivos, de adhesión, trombóticos y de proliferación de células musculares lisas de la vasculatura, iniciando o extendiendo la lesión aterosclerótica (10,90-93). Se ha demostrado una estrecha relación entre RLO y lipoproteínas de baja densidad (LDL) y se sabe que su aumento tiene un conocido valor predictivo directo en la aparición de aterosclerosis (94,95). Muchos factores de riesgo de la aterosclerosis ampliamente identificados, como pueden ser la hipertensión, hipercolesterolemia y tabaquismo, pueden actuar induciendo un desequilibrio entre prooxidación y antioxidación (95).

3. *Cáncer*: el desarrollo tumoral es un proceso altamente complejo caracterizado por la presencia de necrosis celular del tejido sano, crecimiento incontrolado de las células cancerosas, neovascularización del área afectada para asegurar el aporte de oxígeno y nutrientes al tumor, entre otros muchos fenómenos. Se ha sugerido la implicación de los RL en el desarrollo tumoral (96). El humo del tabaco es el causante del cáncer de pulmón: además de la nicotina y del alquitrán, en el que se encuentran RL en abundancia, que atacan los tejidos y destruyen las sustancias protectoras presentes en ellos, tenemos óxidos radicalarios de nitrógeno que forman con las proteínas carcinógenas como las nitrosaminas (6). Los RL estimulan el crecimiento de las células musculares lisas, lo que sugiere un papel del estrés oxidativo en la neovascularización tumoral o angiogénesis (97). También se ha observado la activación de algunos genes tempranos que podrían participar en el control de la transcripción de factores de crecimiento necesarios para el desarrollo tumoral. Tampoco hay que olvidar que la transformación oncogénica viene condicionada por la presencia de genes mutados u oncogenes que controlan funciones celulares clave, y esto también puede influenciarse por el estado redox celular (98). Se han detectado niveles disminuidos de enzimas antioxidantes en diversos tipos de células tumorales (99) así como alteraciones en el estado de los tioles celulares (25). La vitamina C y otros rastrillos de los radicales tendrán efecto anticarcinógeno (100) y será importante introducir estrategias antioxidantes para complementar tratamientos anticancerosos.

TABLA I

APROXIMACIONES A LA MEDICIÓN DEL ESTADO REDOX

Potenciales de pares REDOX: (tioles celulares, núcleos prostéticos de enzimas de la cadena respiratoria etc.)	Votimetría ²¹⁻²⁴ Titulaciones electroquímicas + Técnicas espectroscópicas:	Absorción óptica Resonancia magnética (NMR) ^{22,25-27} Magnética circular dicrósmica (MCD) Resonancia paramagnética de electron (EPR) ²⁶⁻³¹ Resonancia Raman ^{32,33,36}
Detección inespecífica de los RLO	Titulaciones microcolorimétricas ^{31,32} Cristalografía de rayos X ²² Mediciones espectrofotométricas o electroquímicas con luz ultravioleta/luz visible ^{27,36} Quimioluminiscencia ^{16,37,38} Espectrofotometría ultravioleta ³⁷ Resonancia espectroscópica de spin electrón (ESR) ^{16,25,38-44}	
Detección específica de los RLO ^{16,37,38} Marcadores de estrés oxidativo	1. <i>Medida indirecta de lesiones oxidativas</i> —Productos de la peroxidación lipídica ⁴⁵ —Descenso PUFA ⁴⁹ —Productos de glucoxidación (pentosidina, nepsilon-lisina, pirralina) ^{51,64} —Productos proteicos oxidados (espectrofotometría, colorimetría) ^{16,38,64} —Fosfatidilcolina hidroperóxido ⁵⁰ —Productos de oxidación del DNA ^{16,38} —Aumento de la expresión del RNA mensajero del colágeno y de citokinas fibrogénicas 2. <i>Niveles de sustancias antioxidantes</i> 3. <i>Relación reducido/oxidado</i>	El malondialdehído (MDA) ^{38,45-60} El 8-Iso-Prostaglandin-F2a ^{58,61,62} Ácido tiobarbitúrico (TBARS) ^{38,63-65} 4-hidroxi-nonenal (4-HNE) ^{38,45,57,65,66} Productos de oxidación de las LDL (LDL-BDC) ^{38,67} Hexanal ⁶⁰ Etano y pentano en el aire exhalado ⁶⁶⁻⁷⁰
Otros	Estado antioxidante total del suero (EAT) ^{5,38,45,78} Cociente arterial de cuerpos cetónicos (acetoacetato/hidroxiacetato) ^{79,80} Técnicas ópticas (fluorometría redox ocular) ⁸¹ Anticuerpos anti-LDL y anti-DNA oxidados ³⁸	Enzimáticos ^{49,50,53,55,57,59,63,72} No enzimáticos ^{49,59,63,73} Coenzima Q10 ⁷⁴ NADPH mitocondrial por radiometría o microfluorometría ^{75,76} Glutación (GHS/GSSG) por multitud de procedimientos: químicos y enzimáticos, citometría de flujo, electroforesis capilar, espectrofotometría, espectrofluorometría, electroquímicos y espectroscopia de absorción de rayos X de sulfuro ^{25,47,48,55,59,60,66,72,77}

4. *La catarata senil*: el cristalino está sujeto al constante bombardeo de radiaciones diversas causantes de procesos químicos irreversibles, que con el tiempo, por acumulación, producen una creciente opacificación del cristalino; es decir, la catarata (101). Los RL generados en el cristalino producen entrecruzamiento, desnaturalización, degradación de sus proteínas y otros efectos, formándose gránulos microscópicos de composición compleja por apolotonamiento desordenado de moléculas, que crecen en tamaño y cantidad, produciendo inicialmente el efecto Tindall, y finalmente la total opacificación del cristalino (102).

5. *Insuficiencia renal aguda (IRA), crónica (IRC) y diálisis*: el daño tubular por isquemia/reperfusión está, al menos en parte, ocasionado por el aumento del estrés oxidativo de la IRA (103). Los RLO producen la activación de la enzima xantina-oxidasa y de los neutrófilos, mecanismos importantes del daño renal por isquemia/reperfusión. El NO (óxido nítrico) parece aumentar en la fase isquémica y los RLO en la de reperfusión, por lo que el balance NO/RLO condicionará la magnitud del daño, así como los donantes de NO tendrán un potencial papel citoprotector frente a la acción de los RLO (104). En las nefritis por formación de inmunocomplejos, se estimula a los leucocitos polimorfonucleares y a los macrófagos a producir radicales aniones superóxido. Los RLO van a jugar un importante papel en el desarrollo del daño renal y en la formación de la proteinuria (50). La pérdida de nefronas conduce a una mayor producción de RLO (57). El aumento de la peroxidación de lípidos de la membrana de los glóbulos rojos está consistentemente documentada en pacientes con IRC, lo cual es un reflejo del aumento del estrés oxidativo por los RLO (49,53,59,104,105).

Los pacientes en hemodiálisis por IRC, tienen un aumento del estrés oxidativo, por una inadecuada eliminación de los RLO continuamente generados (63,72,105,106). El contacto entre la membrana dializadora y los componentes séricos y los polimorfonucleares, produce una activación del complemento, producción de citokinas y de RLO. Esta situación lleva a la peroxidación lipídica, una desnaturalización de proteínas, daño de las células endoteliales, y a un continuo estrés oxidativo (72,106). En el caso de la diálisis peritoneal también encontramos un aumento del estrés oxidativo, que se pone de manifiesto por unos niveles plasmáticos disminuidos de selenio y de actividad de GHX (63). Pero este estrés oxidativo parece ser menos intenso que en el caso de la hemodiálisis (55) y a su vez más que en los pacientes con IRC no incluidos en programas de diálisis (64).

En los pacientes trasplantados de riñón también hay evidencia de aumento de oxidación de LDL. Este hecho facilita la progresión de la aterosclerosis, contribuyendo al rechazo agudo (107) y crónico vascular del órgano trasplantado (108). La nefrotoxicidad de algunos fármacos habitualmente utilizados, como la gentamicina (109), daunorubicina y la ciclosporina (110) y la de otros compuestos como el mercurio, parece mediado por un aumento del estrés oxidativo.

Parece demostrado que las profundas alteraciones en el sistema redox extracelular que ocurren en la IRC y en la hemodialisis pueden ser una explicación adecuada para las complicaciones cardiovasculares de estos pacientes (111).

6. *Tóxicos que alteran el estado redox*: El daño celular inducido por algunos tóxicos a nivel renal como el paraquat (47) se manifiesta con un aumento de los marcadores de estrés oxidativo (estado del glutatión y aumento de MDA) y una disminución del metabolismo tubular renal (consumo de oxígeno

y transporte de distintos compuestos) en relación con una alteración de la cadena de transferencia de electrones mitocondriales que produciría una reducción de las funciones metabólicas, todo ello originado por un aumento de formación de RLO. Se demuestra una inhibición de la bomba Na/K-ATPasa por la disminución de consumo de oxígeno basal y el sensible a ouabain. Con otros tóxicos que también interfieren con el ciclo redox aumentando la producción de RLO, como el rhein (ácido 4,5-dihydroxiantraquinone-2-carboxílico) (48), se ha estudiado su hepatotoxicidad. Los hallazgos indican una alteración de la membrana mitocondrial (con disminución del potencial de membrana), una deplección de glutatión, una alteración de la homeostasis del calcio con importante elevación de los niveles intracelulares, oxidación lipídica detectada por aumento de los niveles de MDA y una deplección del ATP que pueden llevar a la muerte celular.

7. *Diabetes mellitus*: los altos niveles de glucosa característicos de la diabetes inducirían la glicosilación no enzimática de proteínas. Esta glicosilación no enzimática altera la estructura y la función de las proteínas (112). Es sabido que la autooxidación de azúcares genera especies de RLO. A concentraciones altas de glucosa, típicas de estados diabéticos, la producción de RLO se incrementa en presencia de metales de transición (102). Pero el aumento de estrés oxidativo descrito en los diabéticos, no está únicamente relacionado con la aceleración en la producción de RLO, sino también por la disminución de antioxidantes (113). La vía del poliol es un posible mecanismo por el que la hiperglucemia puede alterar la función y la estructura de las células afectadas por las complicaciones diabéticas. La activación de la vía del poliol disminuiría el NADPH y los niveles de glutatión, aumentando de esta manera el estrés oxidativo (114).

8. *Hipertensión arterial (HTA)*: la HTA puede ser considerada como un conjunto de resultados sistémicos de las lesiones (vasculares, parenquimatosas, etc.) producidas por los RLO. Probablemente los antioxidantes y rastillos de RLO sean una nueva expectativa de tratamiento, implicando en ello acciones terapéuticas que actúen beneficiosamente sobre las manifestaciones presentes en la anatomía patológica (fibrosis, hipertrofia) y en la bioquímica (inhibición de la bomba $\text{Na}^+\text{-K}^+$, inestabilización de membranas, lesiones sobre DNA, etc.) de la HTA, moderando y/o evitando las complicaciones clínicas (síndrome X) y realizando al mismo tiempo cardio-nefro-neuro-retino-protección (115). En la HTA se ha encontrado aumento de la peroxidación de lípidos, tanto en plasma como en las membranas celulares, así como un aumento en la cantidad total de lípidos y una disminución de la capacidad antioxidante (90,116). La HTA predispone a acelerar la aterosclerosis, al menos en parte a causa de la sinergia entre elevación de presión sanguínea y otros estímulos aterogénicos que inducen estrés oxidativo en los vasos arteriales (117).

9. *Cirrosis, insuficiencia hepática y hepatopatía alcohólica*: tradicionalmente se consideraba que la presión portal en las enfermedades hepáticas estaba determinada solamente por la alteración de la arquitectura hepática y por el flujo sanguíneo esplácnico. Pero al ser documentada una hipertensión portal reversible en hepatitis alcohólica y en el fallo hepático agudo, era necesaria la intervención de mediadores vasoactivos para explicar el mecanismo de esta hipertensión portal aguda y también el por qué los pacientes con cirrosis desarrollaban hemorragia aguda por varices en periodos de descompensación hepática. Uno de estos mediadores puede ser el 8-iso-PGF_{2a}, un

producto de la peroxidación lipídica por los RLO, que ha demostrado elevar la presión portal en ratas cirróticas (118). Extrapolándolo a pacientes con cirrosis, la peroxidación lipídica secundaria al daño hepático por alcohol, sepsis u otras enfermedades hepáticas pueden producir un aumento agudo de la presión portal (a través del 8-iso-PGF2a y/u otros mediadores) tal y como se observa en el daño hepático agudo. Esta elevación de la presión portal se pudo bloquear con SQ29548 un antagonista del receptor de tromboxanos (61). El daño hepático inducido por alcohol está relacionado, al menos en parte, a un estrés oxidativo causado por la producción de RLO y/o a un descenso de los antioxidantes (119).

10. *Otros procesos implicados:* reoxigenación o reperfusión (52,120,121), desmielinización (122), distrofia muscular, artritis e inflamación (10,88,123), enfisema pulmonar (124), amiloidosis, colagenosis, conectivopatías (LES, esclerodermia, enfermedad de Wegener), colitis ulcerosa, demencia senil, dermatitis de contacto, displasia broncopulmonar, enfermedad de Alzheimer, distrés respiratorio del adulto, mutaciones, lipofuscinosis, enfermedad de Parkinson, EPOC, fibroplasia retrorenal, Kawshior-kor, isquemia cerebral e hística, glomerulonefritis, miocardiopatías, insuficiencia cardíaca (56), muerte súbita cardíaca, porfirias, úlcera péptica, Síndromes de ataxia-teleangiectasia, de Down, de Bloom, de Dubin-Johnson-Sprinz, VIH (78,125) etc.

LAS TERAPIAS ANTIOXIDANTES

Terapias antioxidantes y dietas ricas o enriquecidas en antioxidantes, parecen prevenir o al menos disminuir el deterioro funcional orgánico originado por un exceso de estrés oxidativo (11,49,50,53,54,57,58,68,72,100,104,105,126-152). Pese a todos estos estudios con resultados positivos también existen otro grupo de ellos en que la intervención a base de antioxidantes no ha resultado eficaz (153-160). Estos resultados no concluyentes o contradictorios (161-167) se pueden deber a múltiples causas: inicio precoz o tardío de la intervención, intervenciones poblacionales o en grupos reducidos con riesgo aumentado, mezcla de intervenciones profilácticas con curativas así como prevención primaria y secundaria de diversas enfermedades, dosis insuficientes, utilización de un solo antioxidante o una combinación de dos o más, evaluación con parámetros concretos de laboratorio, con variables biológicas o clínicas, estudios experimentales sobre tejidos concretos, animales o humanos etc. Todos los autores coinciden en destacar la necesidad de grandes estudios clínicos para aclarar el papel de los antioxidantes en la salud humana. La eficacia de las terapias antioxidantes dependerá de definir que enfermedades, circunstancias y condiciones son las propicias para que estos tratamientos sean exitosos. Mientras se definen vamos a ver algunos de los resultados de los que disponemos en este momento sobre las principales terapias antioxidantes:

1. *Selenio:* parece clara la relación de niveles bajos de selenio y ciertos tipos de cáncer como los de colon, recto, próstata, mama, leucocitos, piel e hígado (130). Por este motivo los suplementos de selenio son particularmente recomendables en los individuos de alto riesgo tumoral. Asimismo se ha relacionado la carencia de selenio en algunas localizaciones geográficas con una miocardiopatía endémica como en niños de la provincia de Keshan de la República Popular China. Tras una intervención con suplementos de selenio en la dieta, se redujo completamente la incidencia de la enfermedad

(168). En este mismo sentido, la elevada incidencia de enfermedad coronaria arteriosclerótica en Karelia (Finlandia), la enorme incidencia de asma en los niños de Nueva Zelanda y por otro lado la longevidad de los habitantes de Norfolk (niveles más elevados de selenio de toda Inglaterra) y la máxima longevidad del área mediterránea que se da en Málaga (España), indican que factores de índole nutricional relacionados con el estrés oxidativo y los antioxidantes (selenio, vitaminas A,C,E, etc.) pueden influir de modo negativo en unas zonas y de modo positivo en otras (112).

2. *Betacaroteno:* es uno de los 50 carotenoides con actividad de vitamina A (se transforma en 2 moléculas de ésta en el intestino) metabolizándose ambos a retinoides. Existen estudios contradictorios respecto al papel de este antioxidante (161,163). Cuando se observa la relación entre consumo de betacaroteno e IAM se encuentra que los individuos que consumían mayor cantidad tenía menor riesgo de IAM sobre todo a expensas de los fumadores (135,138). Asimismo a los consumidores de dietas con más carotenoides se les observa un riesgo menor de cáncer de pulmón (146). En cambio en ensayos clínicos con suplementos en prevención primaria y secundaria de enfermedades cardiovasculares y cánceres no se han encontrado resultados positivos e incluso se han visto resultados deletéreos en subpoblaciones de alto riesgo (154-157).

3. *La vitamina C:* es hidrosoluble, elimina los RL y regenera la capacidad antioxidante de la vitamina E y activa ciertas enzimas. Además destruye eficazmente las nitrosaminas a través de procesos radicalarios y se le atribuye un efecto anticarcinógeno frente al humo del tabaco por concentrarse en los alvéolos pulmonares (100) y de inhibición de la invasión tumoral (147). También en este caso hay resultados contradictorios. Mientras que en algunos estudios se ha encontrado una mortalidad coronaria cardíaca y global en relación inversa a la toma de vitamina C (137) en otros en cambio no hay diferencias según su consumo (135). Un metaanálisis sobre los ensayos clínicos realizados en la prevención de enfermedades cardiovasculares no se encontró ningún efecto beneficioso (158).

4. *La vitamina E:* existen ocho tocoferoles con actividad de vitamina E siendo el α -tocoferol el más activo y ampliamente distribuido. La vitamina E aumenta la resistencia de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) a la oxidación y a la incorporación por macrófagos que las haría más aterogénicas que las LDL nativas (127,128). De esta manera la vitamina E podría ser un factor potencialmente terapéutico en la formación espontánea de ateromatosis (126). Diversos estudios han demostrado una correlación inversa entre niveles de vitamina E y eventos cardiovasculares negativos (149,150), otros en cambio no (159). Los estudios de cohortes que estudian la relación entre la ingestión de vitamina E y la enfermedad cardiovascular encuentran que el riesgo coronario disminuye al aumentar la ingesta de vitamina E, aunque unos encuentran el beneficio con la vitamina E ingerida con la dieta (142,151) y otros precisan de los suplementos para alcanzar la eficacia (135,136,152).

Respecto a los ensayos clínicos en prevención primaria no se han mostrado eficaces en la reducción de la incidencia de cánceres ni de cardiopatía isquémica (155), tampoco en pacientes de alto riesgo (153). En prevención secundaria los resultados fueron pobres o inexistentes (143,156,160).

En pacientes con insuficiencia cardíaca tanto la vitamina E como la coenzima Q10 han obtenido algunos resultados clínicos favorables y una disminución de los marcadores de estrés oxidativo en plasma (131,132).

En el daño hepático por alcohol y su progresión de esteatosis a hepatitis y cirrosis, la vitamina E tiene un importante papel en modificar la inducción del estrés oxidativo y su expresión habitual en forma de aumento de la peroxidación lipídica (119).

5. *Otros procesos, otros antioxidantes:* algunos fármacos eficaces en el tratamiento de la insuficiencia cardíaca pueden tener importantes efectos antioxidantes como ocurre con el carvedilol (57,133,139) y los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (134). Un hipolipemiante con efecto antioxidante, el probucol, se ha mostrado efectivo en reducir la tasa de reestenosis tras angioplastia coronaria con balón (144).

Una dieta con bajas cantidades de proteínas y suplementada con vitaminas A, C y E y amino y ketoácidos parece tener buenos resultados protectores contra la peroxidación de los lípidos de la membrana eritrocitaria (49) y consiguientemente preservar la función renal en pacientes con IRC (53). El aceite de pescado tiene efectos beneficiosos similares al de la administración de suplementos de vitamina E en pacientes en hemodiálisis (105).

Recientemente se ha demostrado la eficacia de la N-acetilcisteína oral en prevenir el deterioro de la función renal por contrastes en pacientes con insuficiencia renal crónica (145). Los antioxidantes han sido utilizados con éxito en el control del dolor de origen inflamatorio como en la pancreatitis (148). También la melatonina ofrece unas interesantes posibilidades en un futuro como terapia antioxidante (169).

6. *El estilo de vida y la dieta mediterránea:* la realización de una actividad física de forma aguda puede producir efectos potencialmente desfavorables sobre la salud cardiovascular con aumento de la producción de los RL, aumento de la susceptibilidad de las LDL a la oxidación y tendencia a la hipercoagulabilidad. Estos efectos serán diferentes según la duración, la intensidad y la regularidad de la actividad física. En cambio la práctica regular de actividad física parece que aumenta la actividad de los sistemas antioxidantes endógenos, disminuye la susceptibilidad de las LDL a la oxidación, mantiene el equilibrio hemostático disminuyendo la hipercoagulabilidad y aumentando la fibrinólisis y finalmente aumenta el diámetro de la luz arterial y su capacidad de vasodilatación. Por lo tanto a nivel de salud pública se debe recomendar la práctica regular de actividad física tanto en la prevención primaria como secundaria de las enfermedades cardiovasculares (170).

La dieta mediterránea o la dieta Roma-Tokio (171) ofrecen mayores posibilidades para un correcto equilibrio entre oxidantes y antioxidantes que la dieta centro-europea-escandinava, por los siguientes motivos: mayor consumo de alimentos verdes, con altos contenidos antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos (vitamina C), menor consumo de grasas saturadas (aceite de oliva frente a mantequillas), menor consumo de conservas, con la pérdida de las sustancias antioxidantes naturales del alimento fresco, menor consumo de ahumados y cerveza negra (nitrosaminas) y, posibilidad de la presencia del vino en la alimentación mediterránea, cuyo etanol en cantida-

des adecuadas funcionará como antioxidante no enzimático. Este tipo de dieta se ha mostrado eficaz en prolongar la supervivencia (172), la prevención primaria (173) y secundaria (174) de enfermedades cardiovasculares, el cáncer (172) etc.

El beneficio del aceite de oliva no se correlaciona con las cifras de colesterol total, LDL, ni HDL, pero sí se correlacionan con aumentos de los niveles de ácidos grasos n-3, ácido oleico, vitaminas C y E y disminución del ácido linoleico como resultado de una mayor ingestión de ácido linoléico y ácido oleico. Las grasas monoinsaturadas como el aceite de oliva son más resistentes a la oxidación que las saturadas y las poliinsaturadas. También hay evidencias de que los compuestos fenólicos de la fracción no grasa del aceite de oliva virgen tienen efectos antioxidantes protegiendo de la autooxidación (175).

El consumo de una dieta mediterránea rica en aceite de oliva, además de mejorar el índice aterogénico (colesterol total/colesterol HDL), aumenta la resistencia a la oxidación de las LDL en comparación con una dieta pobre en grasa. Esto le confiere un efecto protector en las enfermedades cardiovasculares (176).

Los efectos positivos atribuidos al vino (especialmente al vino tinto) parecen radicar en los productos fenólicos (flavonoides) contenidos en él, que inhiben la susceptibilidad de las LDL a oxidarse y las funciones de las plaquetas. El etanol a dosis bajas tiene efectos antioxidantes. El vino tinto reduce el colesterol LDL. El consumo moderado de alcohol reduce los riesgos de padecer infarto agudo de miocardio y después de haberlo padecido también (171,177).

Por todo esto, debido a que nuestras defensas endógenas antioxidantes no parecen ser completamente efectivas, parece razonable proponer una dieta rica en antioxidantes o, como ya se está experimentando, una suplementación exógena de antioxidantes. Así una dieta rica en frutas, nueces, cereales y vegetales, y una ingesta de pequeñas cantidades de vino tinto, parece proteger de numerosas enfermedades (5,162)

En resumen podemos decir que los radicales libres y el estrés oxidativo que provocan están claramente involucrados en la etiopatogenia de diversas enfermedades, algunas de ellas de gran importancia en la población como la arteroesclerosis, el cáncer, la hipertensión arterial etc. La recomendación de un estilo de vida sano con ejercicio regular y una dieta basada en los productos de la dieta mediterránea (ricos en antioxidantes) parece eficaz para prolongar la supervivencia y reducir ciertas patologías. Respecto a los tratamientos antioxidantes existen en la literatura resultados contradictorios, son necesarios más estudios para definir las enfermedades, el momento y el tipo de la intervención, el perfil del paciente, los antioxidantes y sus dosis adecuadas para que estos tratamientos sean claramente exitosos.

AGRADECIMIENTOS

Mi más sincero agradecimiento al Profesor D. Miguel Andrés López por su ayuda incondicional y estímulo constante, gracias a los cuales este trabajo y otros muchos han sido posibles.

Bibliografía

1. Reacciones químicas. Chang R. En: Química 4ª ed. Mc Graw-Hill-Interamericana 1992; 104-117.
2. Voet D. Bioquímica. Omega, Barcelona 1992; 439-453.
3. Roche E, Romero-Alvira D. Introducción a la bioquímica y citotoxicidad del desequilibrio oxidativo. II) Alteraciones oxidativas en las

macromoléculas biológicas. En: Romero-Alvira D, Roche E. Cardiología, estrés oxidativo, nutrición y biología molecular. Bases y aplicaciones sobre el estrés oxidativo, aspectos nutricionales y de la biología molecular en cardiología. ENE Ediciones 1997; 91-104.

4. Roche E, Romero-Alvira D. Introducción a la bioquímica y citotoxicidad

- del desequilibrio oxidativo. I) Especies activas del oxígeno. En: Romero-Alvira D, Roche E. *Cardiología, estrés oxidativo, nutrición y biología molecular. Bases y aplicaciones sobre el estrés oxidativo, aspectos nutricionales y de la biología molecular en cardiología*. ENE Ediciones 1997; 55-88.
5. Veiga E, Aguilar JA, Clavo B, Llanes L. Radicales libres, formación y daño celular. El sistema antioxidante como protector frente a los radicales libres. *Análisis Clínicos* 1997; 22: 201-216.
 6. Ballester M. Antioxidantes, radicales libres y salud. Un enfoque químico-orgánico-físico. *Med Clin (Barc)* 1996; 107: 509-515.
 7. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free radicals in biology and medicine* (2ª ed). Oxford: Oxford Clarendon Press 1989.
 8. Slater TF. Free radical mediated tissue damage. *Nutrition* 1987; 87: 46-50.
 9. Pryor WA. Free radical and lipid peroxidation. En: frei B editor. *Natural antioxidant in human health and disease*. Nueva York: Academic Press, 1994; 1-24.
 10. Wolff SP, Garner A, Dean RT. Free radicals, lipids and protein degradation. *Trends Biochem Sci* 1986;11: 27-31.
 11. Romero-Alvira D, Villalba MP, Mur M, Cabeza F, Guerrero L, Simail E et al. Importancia de los antioxidantes en la alimentación humana. *Med Clin (Bar)* 1990; 94: 69-75.
 12. Scandalios JG. *The molecular biology of free radical scavenging systems*. Clairview, NY, USA: Cold Spring Harbor Press 1992.
 13. Ballester M, Riera J, Castañer J, Casurellas M. The reduction of inert free radicals with ascorbic acid. The reaction with perchlorotriphenylmethylradical. *Tetrahedron Lett* 1978; 643-644.
 14. Davies KJA. Intracellular proteolytic systems may function as secondary antioxidant defences: as hypothesis. *J Free Rad Biol Med* 1986; 2: 155-173.
 15. Roche E, Romero-Alvira D. Introducción a la bioquímica y citotoxicidad del desequilibrio oxidativo. III) Sistemas de defensa y reparación. En: Romero-Alvira D, Roche E. *Cardiología, estrés oxidativo, nutrición y biología molecular. Bases y aplicaciones sobre el estrés oxidativo, aspectos nutricionales y de la biología molecular en cardiología*. ENE Ediciones 1997: 105-123.
 16. Pryor WA, Godber SS. Non invasive measures of oxidative stress status in humans. *Free Radic Biol Med* 1991; 10: 177-84.
 17. Pryor WA. Oxidative stress status: OSS, BOSS and "WILD BILL" DONOVAN. *Free Radic Biol Med* 1999; 27: 1135-1136.
 18. Pryor WA. Oxidative stress status - The second set. *Free Radic Biol Med* 2000; 28: 503-504.
 19. Pryor WA. Oxidative stress status - The third set. *Free Radic Biol Med* 2000; 28: 837.
 20. Pryor WA. Forum on oxidative stress status (OSS) and its measurement. *Free Radic Biol Med* 2000; 29:387
 21. Wang J, Lin Y, Eremenko AV, Kurochkin IN, Mineyeva MF. Affinity biosensors based on preconcentration/voltammetric analysis. Detection of phenothiazine drugs at Langmuir-Blodgett films of tyrosine hydroxylase. *Anal-Chem* 1993; 65: 513-6.
 22. Rivera M, Seetharaman R, Girdhar D, Wirtz M, Zhang X, White S. The reduction potential of cytochrome b5 is modulated by its exposed heme edge. *Biochemistry* 1998; 37: 1485-94.
 23. Chevion S, Roberts MA, Chevion M. The use of cyclic voltammetry for the evaluation of antioxidant capacity. *Free Radic Biol Med* 2000; 28: 860-870.
 24. Kohen R, Vellaichamy E, Hrbac J, Gati I, Tirosh O. Quantification of the overall reactive oxygen species scavenging capacity of biological fluids and tissues. *Free Radic Biol Med* 2000; 28: 871-879.
 25. Livesey JC, Golden RN, Shankland EG, Grunbaum Z, Wyman M, Krohn KA. Magnetic resonance spectroscopic measurement of cellular thiol reduction-oxidation state. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1992; 22: 755-7.
 26. Vanderkooi IM, Erecinska M, Silver IA. Oxygen in mammalian tissue: methods of measurement and affinities of various reactions. *Am J Physiol* 1991; 260: 1131-50.
 27. Caldeira J, Palma PN, Regall M, Lampreia J, Calvete J, Schafer W, Legal J, Moura I, Moura JJ. Primary sequence, oxidation-reduction potentials and tertiary structure prediction of Desulfovibrio desulfuricans ATCC 27774 flavodoxin. *Eur J Biochem* 1994; 220: 987-95.
 28. Fuchs J, Nitschmann WH, Parker L. The antipsoriasis compound anthralin influences bioenergetic parameters and redox properties of energy transducing membranes. *J Invest Dermatol* 1990; 94: 71-76.
 29. Park JB, Fan CL, Hoffman BM, Adams MW. Potentiometric and electron nuclear double resonance properties of the two spin forms of the 4-Fe-4S + cluster in the novel ferredoxin from the hyperthermophilic archaeobacterium *Pyrococcus furiosus*. *J Biol Chem* 1991; 226: 19351-6.
 30. Kay CJ, Solomonson LP, Barber MJ. Oxidation-reduction potentials of flavin and Mo-pterin centers in assimilatory nitrate reductase: variation with pH. *Biochemistry* 1990; 29:10823-8.
 31. Kay CJ, Barber MJ. Measurement of oxidation-reduction midpoint potentials by room temperature electron paramagnetic resonance potentiometry. *Anal Biochem* 1990; 184:11-5.
 32. Harmon PA, Hendler RW, Friauf WS, Levin IW. Combination of potentiometry and resonance Raman spectroscopy for the analysis of a redox protein. *Anal Biochem* 1995; 224: 309-314.
 33. Harmon PA, Hendler RW, Levin IW. Resonance Raman and optical spectroscopic monitoring of heme a redox states cytochrome c oxidase during potentiometric titrations. *Biochemistry* 1994; 33: 699-707.
 35. Harmon PA, Hendler RW, Friauf WS, Levin IW. Combination of potentiometry and resonance Raman spectroscopy for the analysis of a redox protein. *Anal Biochem* 1995; 224: 309-314.
 36. Millis CD, Cai DY, Stankovich MT, Tien M. Oxidation-reduction potentials and ionization states of extracellular peroxidases from the lignin-degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochemistry* 1989; 28: 8484-9.
 37. Weber GF. The measurements of oxygen-derived free radicals and related substances in medicine. *J Clin Chem Clin Biochem* 1990; 28:569-603.
 38. Favier A. Le stress oxydant: intérêt de sa mise en évidence en biologie médicale et problème posés par le choix d'un marqueur. *Ann Biol Clin* 1997; 55: 9-16.
 39. Betbesé AJ, Pérez M, Bak E, Ballús J, Ney A, Mancebo J. Efectos gasométricos y hemodinámicos de la inhalación de óxido nítrico en pacientes con síndrome de distres respiratorio agudo. *Med Clin (Barc)* 1996; 107: 201-206.
 40. Roselaar SE, Nazhat NB, Winyard PG, Jones P, Cunningham J, Blake DR. Detection of oxidants in uremic plasma by electron spin resonance spectroscopy. *Kidney Int* 1995; 48: 199-206.
 41. Parivar F, Narasimhan PT, Ross B. Renal corticomedullary metabolite gradients during graded arterial occlusion: a localized 31P magnetic resonance spectroscopy study. *J Am Soc Nephrol* 1991; 2: 200-11.
 42. Weber GF. The measurements of oxygen-derived free radicals and related substances in medicine. *J Clin Chem Clin Biochem* 1990; 28:569-603.
 43. Togashi H, Shinzawa H, Matsuo T, Takeda Y, Takahashi T, Aoyama M, Oikawa K, Kamada H. Analysis of hepatic oxidative stress status by electron spin resonance spectroscopy and imaging. *Free Radic Biol Med* 2000; 28: 846-853.
 44. Miura Y, Ozawa T. Noninvasive study of radiation-induced oxidative damage using in vivo electron spin resonance. *Free Radic Biol Med* 2000; 28: 854-859.
 45. Díaz J, Serrano E, Acosta F, Leal M, Alomso de Vega JM, Martínez P, Jimenez R, Carbonell LF. ¿Participan los radicales libres en los procesos de peroxidación lipídica?. *Análisis Clínicos* 1998; 23: 149-154.
 46. Daschner M, Lenhartz H, Botticher D, Schaefer F, Wollschlager M, Mehls O, Leichsenring M. Influence of dialysis on plasma lipid peroxidation products and antioxidant levels. *Kidney Int* 1996; 50: 1268-1272.
 47. Molck AM, Friis C. The cytotoxic effect of paraquat to isolated renal proximal tubular segments from rabbits. *Toxicology* 1997; 122:123-132.
 48. Bironaite D, Ollinger K. The hepatotoxicity of rhein involves impairment of mitochondrial functions. *Chem Biol Interac* 1997; 103: 35-50.
 49. Peuchant E, Delmas-Beauvieux MC, Dubourg L, Thomas MJ, Perromat A, Aparicio M, Clerc M, Combe C. Antioxidant effects of a supplemented very low protein diet in chronic renal failure. *Free Rad Biol Med* 1997; 22: 313-320.
 50. Sanaka T, Nakano Y, Nishimura H, Shinobe M, Higuchi C, Omata M, Nihei H, Sugino N. Therapeutic effect of a newly developed antioxidative agent (OPC-15161) on the experimental immune complex nephritis. *Nephron* 1997; 76: 315-322.
 51. Horie K, Miyata T, Maeda K, Miyata S, Sugiyama S, Sakai H, Strihou CY, Monnier VM, Witztum JL, Kurokawa K. Immunohistochemical colocalization of glycoxidation products and lipid peroxidation products in diabetic renal glomerular lesions. Implications for glycoxidative stress in the pathogenesis of diabetic nephropathy. *J Clin Invest* 1997; 100: 2995-3004.
 52. Gerritsen WB, Aarts LP, Morshuis WJ, Haas FJ. Indices of oxidative stress in urina of patients undergoing coronary artery bypass grafting. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1997; 35: 737-742.

53. Ongajooth L, Ongajooth S, Likidilid A, Chantachun Y, Shayakul C, Nilwarangkur S. Role of lipid peroxidation, trace elements and antioxidants enzymes in chronic renal disease patients. *J Med Assoc Thai* 1996; 79: 791-800.
54. Young MR, Young IS, Johnston SR, Rowland BJ. Lipid peroxidation assessment of free radical production following release of obstructive uropathy. *J Urol* 1996; 156: 1828-1832.
55. Martin MC, del Canto E, Barrero MJ. Oxidative stress and enzyme activity in ambulatory renal patients undergoing continuous peritoneal dialysis. *Ren Fail* 1998; 20: 117-124.
56. Heart failure. *Lancet* 1998; 352: si 36- si 38.
57. Van den Braden C, Gabriels M, Vemecq J, Vaneden Houte K, Verbeelen D. Carvedilol protects against glomerulosclerosis in rat remnant kidney without general changes in antioxidant enzyme status. A comparative study of two beta-blocking drugs, carvedilol and propranolol. *Nepron* 1997; 77: 319-324.
58. Lee HS, Jeong JY, Kim YS, Zhang YZ, Chung HK. Dietary antioxidant inhibits lipoprotein oxidation and renal injury in experimental focal segmental glomerulosclerosis. *Kidney Int* 1997; 51: 1151-1159.
59. Ong-awyooh L, Ong-aiyooh S, Tiensong K, Nilwarangkur S. Reduced free radical scavengers and chronic renal failure. *J Med Assoc Thai* 1997; 80(2): 101-108.
60. Daschner M, Lenhartz H, Boticher D, Schaefer F, Wollschlager M, Mehls O, Leichsering M. Influence of dialysis on plasma lipid peroxidation products and antioxidants levels. *Kidney Int* 1996; 50: 1268-1272.
61. Marley R, Harry D, Anand R, Frenando B, Davies S, Moore K. 8-Isoprostaglandin F2a, a product of lipid peroxidation increases portal pressure in normal and cirrhotic rats. *Gastroenterology* 1997; 112:208-213.
62. Roberts LJ, Dorrow JD. Measurement of F2-isoprostanes as an index of oxidative stress in vivo. *Free Radic Biol Med* 2000; 28: 505-513.
63. Bonnefont-Rousselot D, Jaudon MC, Issad B, Cacoub P, Congy F, Jarrel C, Delattre J, Jacobs C. Antioxidants status of elderly chronic renal patients treated by continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Nephrol Dial Transplant* 1997; 12: 1399-1405.
64. Witko-Sarsat V, Friedlander M, Capeillere C, Nguyen T, Nguyen AT, Zingraff J, Jungers P, Descamps B. Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. *Kidney Int* 1996; 49: 1304-1313.
65. Umemura T, Hasegawa R, Sai-Kato K, Nishikawa F, Furukawa F, Toyokuni S, Uchida K, Inoue T, Kurokawa Y. Prevention by 2-mercaptoethane sulfonate and N-acetylcysteine of renal oxidative damage in rats treated with ferric nitrilotriacetate. *Jpn J cancer Res* 1996; 87: 882-886.
66. Fukuda A, Osawa T, Hitomi K, Uchida K. 4-hydroxy-2-nonenal cytotoxicity in renal proximal tubular cells: protein modification and redox alteration. *Arch Biochem Biophys* 1996; 333: 419-426.
67. Ahotupa M, Ruutu M, Mäntylä E. Simple methods of quantifying oxidation products and antioxidants potential of low density lipoproteins. *Clin Biochem* 1996; 29: 139-144.
68. Pryor-WA. Measurement of oxidative stress status in humans. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1993; 2: 289-92.
69. Knutson MD, Handelman GJ, Viteri FE. Methods for measuring ethane and pentane in expired air from rats and humans. *Free Radic Biol Med* 2000; 28: 514-519.
70. Aghdassi E, Allard JP. Breath alkanes as a marker of oxidative stress in different clinical conditions. *Free Radic Biol Med* 2000; 28: 880-886.
71. Shen HM, Ong CN. Detection of oxidative DNA damage in human sperm and its association with sperm function and male infertility. *Free Radic Biol Med* 2000; 28: 529-536.
72. Moorhead JF, Brunton C, Varghese Z. Glomerular atherosclerosis. *Miner Electrolyte Metab* 1997; 23 (3-6):287-290.
73. Kadiiska MB, Gladen BC, Baird DD, Dikalova AE, Sohal RS, Hatch GE, Jones JP, Mason RP, Barret JC. Biomarkers of oxidative stress study: are plasma antioxidants markers of CCl4 poisoning?. *Free Radic Biol Med* 2000; 28: 838-845.
74. Lagendijk J, Ubbink JB, Vermaak WJ. Measurement of the ratio between the reduced and oxidized forms of coenzyme Q10 in human plasma as a possible marker of oxidative stress. *J Lipid Res* 1996; 37:67-75.
75. Scott DA, Grottyhann LW, Cheung JY, Scaduto RC. Ratiometric methodology for NAD(P)H measurement in the perfused rat heart using surface fluorescence. *Am J Physiol* 1994; 267: H636-44.
76. Tuncay OC, Haselgrove JC, Frasca P, Piddington C, Shapiro IM. Scanning microfluorimetric measurements of redox status in the rat dento-alveolar tissues. *Arch Oral Biol* 1990; 35: 113-118.
77. Rompel A, Cinco RM, Latimer MJ, McDermott AE, Guiles RD, Quintanilha A, Krauss RM, Sauer K, Yachandra VK, Klein MP. Sulfur K-edge x-ray absorption spectroscopy : a spectroscopic tool to examine the redox state of S-containing metabolites in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 6122-7.
78. Mclemore JL, Beeley P, Thorton K, Morrisroe K, Blackwell W, Dasgupta A. Rapid automated determination of lipid hydroxiperoxide concentration and total antioxidant status of serum samples from patients infected with HIV: elevated lipid hydroperoxide concentrations and depleted antioxidant capacity of serum samples. *Am J Clin Pathol* 1998; 109: 268-273.
79. wata S, Ozawa K, Shimahara Y, Mori K, Kobayashi N, Kumada K, Yamaoka Y . Diurnal fluctuations of arterial ketone body ratio in normal subjects and patients with liver dysfunction. *Gastroenterology* 1991; 100: 1371-8.
80. Higashiyama H, Egawa H, Iwata S, Wada Y, Shimahara Y, Sasada M, Mori K, Ozawa K. Impaired polymorphonuclear leucocyte function in patients undergoing hepatectomy: adenylate energy charge and superoxide anion production in relation to hepatic mitochondrial redox state. *Br J Surg* 1990; 77: 1224-8.
81. Zurovsky J, Sonn J. Fiber optic surface fluorometry-reflectometry technique in the renal physiology of rats. *J Basic Clin Physiol Pharmacol* 1992 ; 3: 343-58.
82. McCabe MJ, Nicotera P, Orrenius S. calcium-dependent cell death. Role of the endonuclease, protein kinase C, and chromatin conformation. En: Franceshi O, Crepaldi G, Cristofalo VJ, Vijg J, editores. Aging and cellular defebse mechanisms. *Ann NY Acad Sci* 1992; 663: 269-278.
83. Bellomo G, Mirabelli F. Oxidative stress and citoskeletal alterations. En: Franceshi O, Crepaldi G, Cristofalo VJ, Vijg J, editores. Aging and cellular defebse mechanisms. *Ann NY Acad Sci* 1992; 663: 97-109.
84. Ames BN, Shigenaga MK, hagen TM. Oxidants, antioxidants and degenerative diseases of ageing. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 7915-7922.
85. Harman D. Free radical involvement in ageing. Pathophysiology and therapeutic implications. *Drugs and Ageing* 1993; 3: 60-80.
86. Stadtman ER, Olivere CN. Metal-catalyzed oxidation of protein. Physiological Consequences. *J Biol Chem* 1991; 266: 2005-2008.
87. Glass GA, Gershon D. Decreased enzymic protection and increased sensitivity to oxidative damage in erythrocytes as a function of cell and donor aging. *Biochem J* 1984; 218: 513-537.
88. Rivett AJ. Regulation of intracellular protein turnover. Covalent modification as a mechanism of marking proteins for degradatio. *Curr Top Cell Regul* 1986;28: 291-337.
89. Goldstein JG, Ho YK, Basu SK, Brown MS. A binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low-density lipoproteins producing massive cholesterol deposition. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979; 76: 333-337.
90. Galcerán JM, Martínez A. Fenómenos oxidativos en la fisiopatología vascular. *Hipertensión* 2000; 17: 39-47.
91. Witztum JL, Steimberg D. Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. *J Clin Invest* 1991; 88: 1785-1792.
92. Hazen SL. Forum: Role of oxidation in atherosclerosis. Oxidation and Atherosclerosis. *Free Radic Biol Med* 2000; 28: 1683-1684.
93. Diaz MN, Frei B, Vita JA, Keaney JF. Antioxidant and atherosclerotic heart disease. *N Engl J Med* 1997; 337: 408-416.
94. Fernando RL, Varghese Z, Moorhead JF. Differential ability of cells to promote oxidation of low density lipoproteins in vitro. *Clin Chim Acta* 1998; 269: 159-173.
95. Benditt EP. Atherosclerosis review. Nueva York. Raven Press 1978; 3: 77.
96. Cerutti PA. Prooxidant states and tumor promotion. *Science* 1985; 227: 375-381.
97. Rao GN, Berk BC. Active oxygen species stimulate vascular smooth muscle cell growth and proto-oncogene expression. *Circ Res* 1992; 70: 593-599.
98. Roche E, Romero-Alvira D. Papel del estrés oxidativo en la expresión de genes: isquemia miocárdica, cerebral, cáncer y otras enfermedades. *Med Clin (Barc)* 1995; 104: 468-476.
99. Oberley TD, Oberley LW. Antioxidant enzyme levels in cancer. *Histol Histopathol* 1997; 12 (2): 525-535.
100. Block G. Epidemiological evidence regarding vitamin C and cancer. *Am J Clin Nutr* 1991; 54: 1310s-1314s.
101. Taylor A. Cataract relationships between nutrition and oxidation. *J Am Coll Nutr* 1993; 12: 138-146.
102. Hunt JV, Dean RT, Wolff ST. Hydroxyl production and autoxidative

- glycosylation. Glucose autoxidation as the cause of protein damage in the experimental glycation model of diabetes mellitus and ageing. *Biochem J* 1988; 256: 205-212.
103. Edelstein CL, Ling H, Wangsiripaisan A, Schier RW. Emerging therapies for acute renal failure. *Am J Kidney Dis* 1997; 30: 89-95.
 104. Nath KA, Grande J, Croatt A, Haugan J, Kim Y, Rosenberg ME. Redox regulation of renal DNA synthesis, transforming growth factor-beta1 and collagen gene expression. *Kidney Int* 1998; 53: 367-381.
 105. Panzetta O, Cominacini L, garbin U, fratta A, Gammaro L, Bianco F, Davoli A, Campagnola M, De Santis, pastorino AM, et al. Increased susceptibility of LDL to in vitro oxidation in patients on maintenance hemodialysis: effects of fish oil and vitamin E administration. *Clin Nephrol* 1995; 44: 303-309.
 106. Hashimoto H, Mio T, Sumiro K. Lipid abnormalities of erythrocyte in hemodialysis patients with chronic renal failure. *Clin Chim Acta* 1996; 252: 137-145.
 107. Davenport A, Hopton M, Bolton C. Measurement of malondialdehyde as a marker of oxygen free radical production during renal allograft transplantation and the effect on early graft function. *Clin Transplant* 1995; 9: 171-175.
 108. Van den Dorpel MA, Ghanem H, Rischen-Vos J, Man in't Veld AJ, Jansen H, Weimar W. Low-density lipoprotein oxidation is increased in kidney transplant recipients. *Transpl Int* 1996; 9: 54-57.
 109. Fauconneau B, Tallineau C, Huguet F, Piriou A. Gentamicin induced kidney damage and lipid peroxidation in rats. *Toxicol Lett* 1995; 76: 127-134.
 110. Wang G; Salahudeen AK. Lipid peroxidation accompanies cyclosporine nephrotoxicity: effects of vitamin E. *Kinvey Int* 1995; 47: 927-934.
 111. Clermont G, Lecour S, Lahet J, Siohan P, Vergely C, Chevet D, Riffle G, Rochette L. Alteration in plasma antioxidant capacities in chronic renal failure and hemodialysis patients: a possible explanation for increased cardiovascular risk in these patients. *Cardiovasc Res* 2000; 47: 618-623.
 112. Romero-Alvira D. Cardiología, estrés oxidativo, nutrición y biología molecular. Consideraciones generales. En: Romero-Alvira D, Roche E. *Cardiología, estrés oxidativo, nutrición y biología molecular. Bases y aplicaciones sobre el estrés oxidativo, aspectos nutricionales y de la biología molecular en cardiología*. ENE Ediciones 1997: 13-51.
 113. Kashiwagi A, Asahina T, Nishio Y, Ikebuchi M, Tanaka Y, Kikkawa R, Shigeta Y. Glycation, oxidative stress, and scavenger activity: glucose metabolism and radical scavenger dysfunction in endothelial cells. *Diabetes* 1996; 45: 84-6.
 114. Bravi MC, Pietrangeli P, Laurenti O, Basili S, Cassone-Faldetta M, Ferri C, De-Mattia G. Polyol pathway activation and glutathione redox status in non-insulin-dependent diabetic patients. *Metabolism* 1997; 46: 1194-8.
 115. Romero-Alvira D, Villalba MP, Bueno J. Papel de la prooxidación y la antioxidación en la etiología de la hipertensión arterial. *Med Clin (Bar)* 1991; 57: 542-551.
 116. Kuznetsov NS, Abulela AM, Kulagin IuI, Neskromnyi VN, Babin IuF. Lipid peroxidation in patients with hypertension and renal hypertension against a background of diabetes mellitus. *Lik Sprava* 1996; 5-6: 117-118.
 117. Alexander RW. Theodore Cooper Memorial Lecture. Hypertension and the pathogenesis of atherosclerosis. Oxidative stress and the mediation of arterial inflammatory response: a new perspective. *Hypertension*. 1995; 25: 155-61.
 118. Marley R, Harry D, Anand R, Frenando B, Davies S, Moore K. 8-Iso-prostaglandin F2a, a product of lipid peroxidation increases portal pressure in normal and cirrhotic rats. *Gastroenterology* 1997; 112: 208-213.
 119. Nordmann R. Alcohol and antioxidant systems. *Alcohol Alcohol* 1994; 29: 513-22.
 120. Yonehana T, Gemba M. Hypoxia and reoxygenation induced injury of renal epithelial cells: effect of free radical scavengers. *Jpn J Pharmacol* 1995; 68: 231-234.
 121. Muzakova V, Kandar R, Vojtisek P, Skalicky J, Cervinkova Z. Selective antioxidant enzymes during ischemia/reperfusion in myocardial infarction. *Physiol Res* 2000; 49: 315-322.
 122. Konat GW, Wiggins RC. Effects of reactive oxygen species on myelin membrane proteins. *J Neurochem* 1985; 45: 1113-1138.
 123. Trabandt A, Gay RE, Gay S. Oncogene activation in rheumatoid synovium. *APMIS* 1992; 100: 861-875.
 124. Ossanna PJ, Test ST, Matheson NR, Regiani S, Weiss SJ. Oxidative regulation of neutrophil elastase-alpha-1-proteinase inhibitor interactions. *J Clin Invest* 1986; 77: 1939-1951.
 125. Romero Alvira D, Guerrero L, Gotor MA, Roche E. Estrés oxidativo y patología infecciosa. *An Med Interna (Madrid)* 1995; 12: 139-149.
 126. Janero DR. Therapeutic potential of vitamin E in the pathogenesis of spontaneous atherosclerosis. *Free Rad Biol Med* 1991; 11: 129-144.
 127. Steinberg D. Antioxidant vitamins and coronary heart disease. *New Engl J Med* 1993; 328: 1487-1489.
 128. Naish-Byfield, Dean RT. Antioxidants and the influence of free radical damage to proteins on proteolysis in and around mammalian cells. En: Knecht E, Grisolia S, editores. *Current trends in the study of intracellular protein degradation II*. University of the Basque Country: Springer International 1989; 361-375.
 129. Villalba MP. Empleo de un protocolo antioxidante no enzimático en pacientes con insuficiencia coronaria. Parámetros analíticos y electrocardiográficos. Tesis Doctoral. Universidad de Zaragoza. Mayo 1988.
 130. Willet WC, Morris JS, Pressel S, et al. Prediagnostic serum selenium and risk of cancer. *Lancet* 1983; 2: 130-134.
 131. Dhalla AK, Hill MF, Singal PK. Role of oxidative stress in transition of hypertrophy to heart failure. *J Am Coll Cardiol* 1996; 28: 506-514.
 132. Morisco C, Trimarco B, Condorelli M. Effect of coenzyme Q10 therapy in patients with congestive heart failure: a long-term multicenter randomized study. *Clin Invest* 1993; 71: 143-36.
 133. Kukin ML, Kalman J, Charney RH, et al. Antioxidant effect of carvedilol and metoprolol in congestive heart failure. *J Am Coll Cardiol* 1998; 31: 189.
 134. Susuki S, Sato H, Shimada H, Takashima N, Arakawa M. Comparative free radical scavenging action of angiotensin-converting enzyme inhibitors with and without the sulfhydryl radical. *Pharmacology* 1993; 47: 61-65.
 135. Rimm EB, Stamfer MJ, Ascherio A, Gionannucci E, Colditz CA, Willett WC. Vitamin E consumption and the risk of coronary heart disease in men. *N Engl J Med* 1993; 328: 1450-6.
 136. Stampfer MJ, Hennekens CH, Manson JE, Colditz GA, Rosner B, Willett WC. Vitamin E consumption and the risk of coronary heart disease in women. *N Engl J Med* 1993; 328: 1444-9.
 137. Enstrom JE, Kanim LE, Klein MA. Vitamin C intake and mortality among a sample of the United States population. *Epidemiology* 1992; 3: 194-202.
 138. Gaziano JM, Manson JE, Ridker PM, Buring JE, Hennekens CH. Beta carotene therapy for chronic stable angina. *Circulation* 1990; 82: 201.
 139. Feuerstein GZ, Bril A, Ruffolo RR Jr. Protective effects of carvedilol in the myocardium. *Am J Cardiol* 1997; 80: 41-45.
 140. Salahudeen AK, Wang C, Kanji VK. Comparative study of the effect of 21-aminoesteroid and a-tocopherol on model of acute oxidative renal injury. *Free Radic Biol Med* 1996; 21: 691-697.
 141. Pryor WA, Godber SS. Oxidative stress status: an introduction. *Free Radic Biol Med* 1991; 10: 173.
 142. Kushi LH, Folsom AR, Prineas RJ, Mink PJ, Wu Y, Bostick RM. Dietary antioxidant vitamins and death from coronary heart disease in postmenopausal women. *N Engl J Med* 1996; 334: 1156-1162.
 143. Stephens NG, Parsosns A, Cchofield PM, Kelly F, Cheeseman K, Mitchinson MJ. Randomised controlled trial of vitamin E in patients with coronary disease: Cambridge Heart Antioxidant Study. *Lancet* 1996; 347: 781-786.
 144. Tardif JC, Cote G, Lesperance J, Bourassa M, Lambert J, Doucet S, Bilodeau L, Nattel S, de Guise P. Burocol and multivitamins in the prevention of restenosis after coronary angioplasty. *N Engl J Med* 1997; 337: 365-372.
 145. Tepel M, Van der Giet M, Schwarzfeld C, Laufer U, Liermann D, Zidek W. Prevention of radiographic contrast agent induced reductions in renal function by acetylcysteine. *N Engl J Med* 2000; 343: 180-184.
 146. Michaud DS, Feskanich D, Rimm EB, Colditz GA, Speizer FE, Willett WC, Giovannucci E. Intake of specific carotenoids and risk of lung cancer in 2 prospective US cohorts. *Am J Clin Nutr* 2000; 72: 990-997.
 147. Nagao N, Nakayama T, Etoh T, Saiki I, Miwa N. Tumor invasion is inhibited by phosphorylated ascorbate via enrichment of intracellular vitamin C and decreasing of oxidative stress. *J Cancer Res Clin Oncol* 2000; 126: 511-518.
 148. De las Heras G, García de la Paz A, Fernández MD, Fernández Fonceledo JL. Use of antioxidants to treat pain in chronic pancreatitis. *Rev Esp Enferm Dig* 2000; 92: 375-385.
 149. Gey KF, Puska P, Jrdan P, Moser UK. Inverse correlation between plasma vitamin E and mortality from ischemic heart disease in cross-cultural epidemiology. *Am J Clin Nutr* 1991; 53: 326-334.
 150. Ruiz F, Martín G, López C, Seijas V, Ruiz J. Niveles plasmáticos de vitamina A y E y riesgo de infarto agudo de miocardio. *Rev Clin Esp* 1997; 197: 411-416.

151. Knekt P, Reunanen A, Jarvinen R, Seppanen R, Heliövaara M, Aromaa A. Antioxidant vitamin intake and coronary mortality in a longitudinal population study. *Am J Epidemiol* 1994; 139: 1180-1189.
152. Losonczy KG, Harris TB, Havlik RJ. Vitamin E and vitamin C supplement use and risk of all-cause and coronary heart disease mortality in older persons: the Established Populations for Epidemiologic Studies of the Elderly. *Am J Clin Nutr* 1996; 64: 190-196.
153. The Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators. Vitamin E supplementation and cardiovascular events in high-risk patients. *N Engl J Med* 2000; 342: 154-160.
154. Hennekens CH, Buring JE, Manson JE, Stampfer M, Rosner B, Cook NR, Belanger C, LaMotte F, Gaziano JM, Ridker PM, Willett W, Peto R. Lack of effect of long-term supplementation with beta carotene on the incidence of malignant neoplasms and cardiovascular disease. *N Engl J Med* 1996; 334: 1145-1149.
155. The Alpha-Tocopherol, Beta Carotene Cancer Prevention Study Group. The effect of vitamin E and beta carotene on the incidence of lung cancer and other cancer in male smokers. *N Engl J Med* 1994; 330: 1029-1035.
156. Rapola JM, Virtamo J, Ripatti S et al. Randomised trial of alpha-tocopherol and beta-carotene supplements on incidence of major coronary events in men with previous myocardial infarction. *Lancet* 1997; 349: 1715-1720.
157. Omenn GS, Goodman GE, Thornquist MD et al. Effects of a combination of beta carotene and vitamin A on lung cancer and cardiovascular disease. *N Engl J Med* 1996; 334: 1150-1155.
158. Ness A, Egger M, Smith GD. Role of antioxidant vitamins in prevention of cardiovascular disease. Meta-analysis seems to exclude benefit of vitamin C supplementation. *BMJ* 1999; 319: 577.
159. Kardinaal AF, Kok FJ, Ringstad J et al. Antioxidants in adipose tissue and risk of myocardial infarction: the EURAMIC Study. *Lancet* 1993; 342: 1379-1384.
160. GISSI-Prevenzione investigators. Dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids and vitamin E after myocardial infarction: results of the GISS-Prevenzione trial. *Lancet* 1999; 354: 447-455.
161. Pryor WA. Vitamin E and heart disease: basic science to clinical intervention trials. *Free Radic Biol Med* 2000; 28: 141-64.
162. Lahoz C, Peña R, Mostaza JM. ¿Se debe recomendar antioxidantes para la prevención cardiovascular?. *Rev Clin Esp* 2000; 200: 212-217.
163. Pryor WA, Stahl W, Rock CL. Beta carotene: from biochemistry to clinical trials. *Nutr Rev* 2000; 58: 39-53.
164. Greenberg ER, Sporn MB. Antioxidant vitamins, cancer and cardiovascular disease. *N Engl J Med* 1996; 334: 1189-1190.
165. Tabet N, Birks J, Grimley Evans J. Vitamin E for Alzheimer's disease (Cochrane Review). *Cochrane Database Syst Rev* 2000; 4: CD002854.
166. Pearce KA, Boosalis MG, Yeager B. Update on vitamin supplements for the prevention of coronary disease and stroke. *Am Fam Physician* 2000; 62: 1359-1366.
167. Delanty N, Dichter MA. Antioxidant therapy in neurologic disease. *Arch Neurol* 2000; 57: 1265-1270.
168. Keshan Disease Research Group of Chinese Academy of Medical Science. Observation on effect of sodium selenite in the prevention of Keshan disease. *Chin Med J Engl* 1979; 92: 477-482.
169. Díaz B, Colmenero MD, Marín B. Capacidad antioxidante de la melatonina: su papel defensivo contra afecciones relacionadas con la edad. *Med Clin (Bar)* 1998; 110: 668-676.
170. Codina O, Elosua R, Marrugat J. Actividad física y arteriosclerosis. Efectos de la actividad física sobre la oxidación lipídica, la hemostasia y la función endotelial. *Med Clin (Bar)* 1999; 112: 508-515.
171. Romero-Alvira D. Excelencias de la dieta mediterránea. Dieta Roma-Tokio vs american fast-fat food. En: Romero-Alvira D, Roche E. *Cardiología, estrés oxidativo, nutrición y biología molecular. Bases y aplicaciones sobre el estrés oxidativo, aspectos nutricionales y de la biología molecular en cardiología*. ENE Ediciones 1997: 459-493.
172. De Lorgeril M, Salen P, Martin JL, Monjaud I, Boucher P, Mammelle N. Mediterranean dietary pattern in a randomized trial: prolonged survival and possible reduced cancer rate. *Arch Intern Med* 1998; 158: 1181-1187.
173. Renaud S, De Lorgeril M, Delaye M, Guidollet J, Jacquard F, Mamell N et al. Cretan Mediterranean diet for prevention of coronary heart disease. *Am J Clin Nutr* 1995; 61: 599-604.
174. De Lorgeril M, Salen P, Martin JL, Monjaud I, Boucher P, Mammelle N. Mediterranean diet, traditional risk factors, and the rate of cardiovascular complications after myocardial infarction. Final Report on The Lyon diet Heart Study. *Circulation* 1999; 99: 779-785.
175. Fitó M, Covas MI, Lamuela-Ravetós RM, Vila J, de la Torre C, Marrugat J. Aceite de oliva e inhibición de la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad. Importancia de los compuestos fenólicos. *Med Clin (Bar)* 2000; 115: 166-169.
176. López-Miranda J, Gómez P, Castro P, Marín C, Paz E, Bravo MD, Blanco J, Jiménez-Perepérez J, Fuentes F, Pérez-Jiménez F. La dieta mediterránea mejora la resistencia a la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL). *Med Clin (Bar)* 2000; 115: 361-365.
177. Bujanda L, Gutierrez A, Marimón JM. El vino a dosis moderadas: salud o enfermedad. *Med Clin (Bar)* 1999; 112: 29-35.