

11227  
70



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA  
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO  
HOSPITAL GENERAL DE MEXICO O.D.

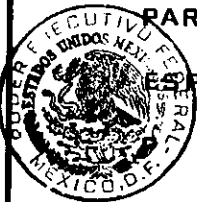
## ESTADO ACTUAL DE LOS ANTIOXIDANTES: APLICACIONES TERAPEUTICAS.

SECRETARIA DE SALUD  
HOSPITAL GENERAL DE MEXICO  
ORGANISMO DESCENTRALIZADO

TESINA DE POSGRADO

PARA OBTENER EL TITULO DE:  
ESPECIALISTA EN MEDICINA INTERNA

R E S E N T A:



DIRECCION DE ENSEÑANZA

IRIS AZUCENA SAAVEDRA GONZALEZ

ASESOR: DR. CESAR RIVERA BENITEZ  
TITULAR DEL CURSO DE MEDICINA  
INTERNA



HOSPITAL GENERAL DE MEXICO  
2000

MEXICO, D. F.

2000

285959



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**FACULTAD DE MEDICINA**  
**DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO**  
**HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO O. D.**

***ESTADO ACTUAL DE LOS ANTIOXIDANTES:  
APLICACIONES TERAPÉUTICAS.***

**TESINA DE POSGRADO  
PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
ESPECIALISTA EN MEDICINA INTERNA**

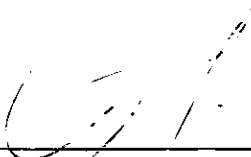
**P R E S E N T A :**  
**IRIS AZUCENA SAAVEDRA GONZÁLEZ**

***ASESOR: DR. CÉSAR RIVERA BENITEZ  
TITULAR DEL CURSO DE MEDICINA INTERNA***

**MÉXICO, D. F.**

**2000**

El contenido del presente trabajo es responsabilidad y propiedad de su autor, y su reproducción parcial ó total deberá ser autorizada por el mismo ó bien por las personas relacionadas con su elaboración:



---

**AUTOR**

IRIS AZUCENA SAAVEDRA GONZÁLEZ  
RESIDENTE DE MEDICINA INTERNA



---

**ASESOR**

DR. CÉSAR RIVERA BENITEZ  
TITULAR DEL CURSO DE MEDICINA INTERNA  
HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO, O. D.



---

**TITULAR DEL CURSO DE MEDICINA INTERNA**

DR. CÉSAR RIVERA BENITEZ  
ADSCRITO AL SERVICIO DE INFECTOLOGÍA  
HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO, O. D.

## AGRADECIMIENTOS

*A Dios, que me ha brindado la oportunidad de vivir este momento y siempre está conmigo en los momentos más difíciles.*

*A mi familia, mi madre y hermanas, que siempre están presentes para alentarme a seguir adelante y brindarme su apoyo ante cualquier situación.*

*A mis maestros, que con el espíritu de enseñanza que siempre los caracteriza, me han otorgado parte de su sabiduría y me han guiado durante mi formación como profesionalista.*

*A mis pacientes, por permitirme obtener enseñanza y experiencia en cada uno de sus enfermedades y vivencias.*

GRACIAS.

## DEDICATORIA

**A todos aquellos que deseen conocer el tema, con el afán de brindar a sus pacientes una mejor atención y beneficios a través de sus prescripciones.**

## **CONTENIDO**

	Página
INTRODUCCIÓN	2
1.- RADICALES LIBRES DE OXIGENO	3
1.1.- Definición	3
1.2.- Mecanismos de producción	3
1.3.- Funciones y efectos secundarios	4
1.4.- Mecanismos de daño	5
2.- LOS ANTIOXIDANTES	7
2.1.- Funciones y clasificaciones	7
2.2.- Antioxidantes específicos ó Barredores (Scavengers)	8
2.2.1.- Vitaminas antioxidantes	8
2.2.1.1.- Vitamina E (alfa-tocoferol)	8
2.2.1.2.- Vitamina C (ácido ascórbico)	11
2.2.1.3.- Vitamina A	13
2.2.1.4.- Carotenoides	15
2.2.2.- Antioxidantes plasmáticos naturales	16
2.2.3.- Antioxidantes sintéticos	19
2.3.- Medidas antioxidantes	19
2.3.1.- N-acetil-cisteína	20
2.3.2.- Coenzima Q <sub>10</sub>	20
2.3.3.- Ambroxol	21
2.3.4.- Probucol	21
2.3.5.- Desferrioxamina	21
3.- PATOGENIA Y RADICALES LIBRES DE OXIGENO	22
3.1.- Cáncer	23
3.2.- Enfermedades cardiovasculares	28
3.2.1.- Hipertensión arterial sistémica	28
3.2.2.- Aterosclerosis	29
3.2.3.- Accidente vascular cerebral (AVC)	31
3.2.4.- Cardiopatía Isquémica	33
3.3.- Enfermedad intestinal crónica inflamatoria	35
3.4.- Enfermedades oculares	36
3.5.- Enfermedades pulmonares inflamatorias	39
3.5.1.- Fibrosis pulmonar idiopática	40
3.5.2.- HIV-seropositividad	40
3.5.3.- Síndrome de distres respiratorio del adulto	41
3.5.4.- Enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC)	41
3.5.5.- Asma	42
3.6.- Choque circulatorio	43
3.7.- Enfermedades neurodegenerativas	45
3.7.1.- Enfermedad de Parkinson (EP)	46
3.7.2.- Enfermedad de Alzheimer (EA)	48
3.7.3.- Esclerosis lateral amiotrófica (ELA)	50
3.7.4.- Neurotrauma	51
3.8.- Transplante de órganos	51
3.9.- Complicaciones crónicas de la diabetes	53
3.10.- Fotoenvejecimiento	58
3.11.- Artritis reumatoide (AR)	60
3.12.- Toxicidad por medicamentos	60
4.- CONCLUSIONES	61
REFERENCIAS	64

## **ESTADO ACTUAL DE LOS ANTIOXIDANTES: APLICACIONES TERAPEUTICAS**

"... La mayor limitación de la medicina alternativa, es que está basada en la teoría y no en los hechos. Los estudios "científicos" que apoyan muchas de estas terapias son observacionales y no se realizan apegados al mayor de los rigores científicos.... Es irónico que pacientes que necesitan de las mejores terapias probadas científicamente cuando están enfermos, con enfermedades serias, confíen su salud a vendedores en almacenes de productos nutricionales, revistas, y testimoniales en artículos, radio y televisión ó comerciales de "autoridades en medicina alternativa" y algunas clínicas de salud. De hecho la prevención, también es importante, pero no bajo auspiciadores de la profesión médica científica ..."

Gordon A Ewy MD<sup>(1)</sup>

### **INTRODUCCION.**

Los antioxidantes ó barredores de radicales libres juegan un papel vital en los sistemas de defensa in vivo contra el estrés oxidativo inducido por especies reactivas de oxígeno. Implicados en la fisiopatología como mediadores en diversas enfermedades inflamatorias crónicas y con pronósticos reservados para la función y la vida, su producción, función e inactivación son motivo de diversos estudios desde hace más de dos décadas; el uso de vitaminas y otras medidas antioxidantes han tenido un gran auge entre la población general, como una medida importante de salud pública, ya que su uso y consumo indiscriminado ha originado una serie de contradicciones tanto en el ámbito médico como en el no médico, siendo éste el de mayor impacto, por su alcance a la mano del consumidor.

Es por esto que hemos revisado la evidencia más reciente, publicada e indexada a través del MEDLINE, sobre los usos, ventajas e indicaciones reales de la terapia antioxidante, ampliamente difundida en nuestro medio, principalmente en lo que ha enfermedades crónico-degenerativas se refiere, y que hasta el momento no ha demostrado su efectividad como monoterapia a través del uso de suplementos.

Para poder determinar su efectividad, es necesario definir el papel de los radicales libres en cada una de las patologías sometidas a revisión, y en algunos casos sus tratamientos convencionales, con el fin de determinar si existe ó no una base clara de su involucro dentro de la patogenia, para posteriormente revisar las publicaciones experimentales, observacionales y clínicas a favor y en contra del uso de los antioxidantes y realizar un consenso a cerca de su utilidad en forma de suplementos, lo que representa el objetivo principal del reporte.



## 1.- RADICALES LIBRES DE OXIGENO.

A nivel molecular, todos los procesos fisiológicos requieren de una cantidad de energía y oxígeno que origina un mecanismo continuo de daño-reparación a lo largo de la vida total de cada célula. En condiciones normales, aproximadamente 95% del oxígeno molecular en los sistemas biológicos, sufre una reacción de reducción con la suma de 4 electrones en el sistema citocromo oxidasa de la mitocondria para formar agua como producto final.

Este procesamiento celular del oxígeno, "estrés oxidativo" (oxidación celular), representa una fuente primordial de energía a una velocidad acelerada y constante, pero con subproductos llamados radicales libres. Esto es, la unión de dos átomos ó más, con un número disponible de electrones en su última órbita, se encontrará en pares, evitando dejar electrones solos para dar estabilidad al compuesto, evitando queden electrones impares que son altamente reactivos, es decir, se unen a otro átomo de forma acelerada y desordenada<sup>(2,3)</sup>.

### 1.1.- Definición

Un radical es una especie atómica en cuya última órbita no se cuenta con los dos electrones correspondientes, es decir, no se encuentra pareada, lo que aumenta su reactividad en todos los procesos de oxido-reducción, y que puede originarse por cualquier fuerza química y física, que separe un par de electrones, participando en una amplia gama de reacciones biológicas normales y en la patogénesis de una amplia gama de enfermedades.

### 1.2.- Mecanismos de producción

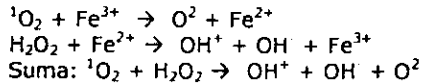
Normalmente, el oxígeno molecular (biradical por tener 2 electrones no pareados) funciona como aceptador de electrones en el sistema de transporte mitocondrial; al aceptar un electrón se transforma en el radical superóxido ( $O_2^-$ ), y si se unen dos electrones no pareados de oxígeno molecular se forma un singlete de oxígeno ( ${}_1O_2$ ), que no representa un radical libre; el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), no es propiamente un radical, pero de él puede derivarse el radical hidroxilo ( $OH^*$ ), uno de los derivados de oxígeno más reactivos. Todos estos metabolitos se consideran en conjunto radicales libres de oxígeno (RLO).

Las células endoteliales, macrófagos y neutrófilos fabrican tantas moléculas de  $O_2^-$  como óxido nítrico (NO), y ambos forman radicales peroxil-nitrico (OO-NO), que tienen una vida media de un segundo, precedido de su descomposición en bióxido de nitrógeno ( $NO_2$ ), y radicales hidroxilo. La importancia de esta reacción radica en que, el  $O_2^-$  puede inactivar los factores reactivos derivados del endotelio y OO-NO puede reaccionar con los grupos sulfhídrico libres (una reacción 1,000 veces más rápida que la de los sulfhídricos con  $H_2O_2$ ).

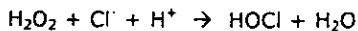
Una fuente importante de producción de estos radicales es la cadena respiratoria de los neutrófilos, macrófagos y eosinófilos en respuesta a diferentes estímulos (bacterias, agregados de IgG, partículas opsonizadas, complemento e interleucinas). Tras la estimulación, los leucocitos aumentan el NADPH y se activan los sistemas citocromo b-NADPH oxidasa y de la mieloperoxidasa.

La reducción univalente del oxígeno molecular produce el radical  $O_2^-$ , que por acción de la enzima superóxido dismutasa (SOD) se transforma en  $H_2O_2$ , que sólo es citotóxico a altas concentraciones; estos radicales pueden interaccionar en presencia

de ciertos metales de transición, como hierro y cobre, para producir un potente agente oxidante, el radical  $\text{OH}^\cdot$  conociéndose a esta reacción no enzimática como Reacción de Haber-Weiss:



Además de esos 3 radicales, los leucocitos activados secretan hemoproteína-mieloperoxidasa que cataliza la oxidación de iones cloruro por el  $\text{H}_2\text{O}_2$  produciendo hipoclorito ( $\text{HOCl}$ ; aproximadamente 100 veces más citotóxico que el anión superóxido ó el peróxido de hidrógeno).



Podemos hasta este momento entonces, resumir las vías de producción de RLO que tienen mayor importancia en la patogenia de enfermedades, de la siguiente manera:

- 1.- Fuga de electrones de la mitocondria: Durante la síntesis de ATP en el metabolismo aerobio, existe la fuga de electrones, siendo más evidente durante los procesos de isquemia ó choque séptico.
- 2.- Metabolismo eicosanoide: Por medio de la activación del ácido araquidónico
- 3.- Xantina-oxidasa (XO): A través de su participación en condiciones de isquemia/ reperfusión cuando la síntesis de ATP disminuye como consecuencia de la disminución en la disponibilidad de  $\text{O}_2$ , y en un intento por extraer energía almacenada, hidrolizando completamente el ATP en ADP, AMP, adenosín y finalmente xantina e hipoxantina, facilitando el flujo de iones. El interferón gamma aumenta la actividad de esta enzima.
- 4.- Descarga respiratoria fagocítica: Los neutrófilos tienen en los lisosomas un alto número de proteasas y lipasas que pueden actuar sinérgicamente para producir RLO. Los polimorfonucleares y XO parecen interactuar y los neutrófilos convertir la deshidrogenasa de xantina en XO incrementando el daño.

Por lo tanto, las fuentes de estos radicales son numerosas: ácido araquidónico, tetrahidropterinas, flavinas, hidroquinonas, catecolaminas, reacción de Felton, reacción de Haber-Weiss, isquemia, reperfusión, fagocitosis, radiaciones, hipoxia, smog, humo de tabaco, alcohol, ozono, etc., produciéndose normalmente en nuestro organismo y manteniéndose un equilibrio en sus concentraciones debido a los antioxidantes naturales: SOD, catalasas (CAT) y glutatión peroxidasa (GTP), que mencionaremos más adelante<sup>(3,4,5)</sup>.

### 1.3.- Funciones y Efectos secundarios

Los RLO tienen un papel fisiológico en oxidaciones mediadas por el citocromo p450, tono del músculo liso y acción microbicida y bactericida intrínseca (principalmente  $\text{O}^\cdot$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  y anión superóxido), siendo esta última, la que conlleva a la inflamación y daño potencial de los tejidos adyacentes, ya que los fagocitos activados liberan ácidos grasos insaturados con la consiguiente liberación de ácido araquidónico

y activación de la vía de la ciclo-oxigenasa y lipoxigenasa, derivándose prostaglandinas y leucotrienos que producen un número mayor de estos radicales. El sistema óxido nítrico-sintetasa, formador del radical óxido nítrico está presente en macrófagos y granulocitos, así como los fagocitos forman también HOCl, que implica la oxidación catalítica de la mieloperoxidasa.

Sin embargo los RLO no sólo representan ventajas dentro de los sistemas de defensa, sino también se conocen sus desventajas a través de sus efectos secundarios sobre varios órganos, debido a que representan sustancias capaces de dañar reversible e irreversiblemente compuestos de todas clases bioquímicas incluyendo ácidos nucleicos, proteínas y aminoácidos, lípidos y lipoproteínas y macromoléculas del tejido conectivo, produciéndose un impacto sobre las diversas actividades celulares. Esto es:

1. A nivel de proteínas (50% del peso seco de las células), todas sus funciones como transporte, almacén, contractilidad, estructura, regulación y defensa, pueden sufrir deterioro por oxidación; es decir, todos los aminoácidos son susceptibles de modificación (especialmente triptófano, tirosina, histidina y cisteína), determinando alteraciones en la estructura primaria, secundaria, terciaria y cuaternaria de las mismas, condicionando plegamiento, hidrofobicidad, agregación y finalmente, proteólisis.
2. A nivel de lípidos, los ácidos grasos poliinsaturados son más susceptibles, produciéndose alteraciones mayores en la membrana celular y nuclear, retículo endoplásmico y mitocondrias, y su oxidación conduce a la formación de productos de descomposición (aldehídos y alcanos). El radical peroxil (HOO), representa el ácido conjugado del  $O^2$  que inicia la peroxidación lipídica de estas sustancias.
3. A nivel de ácidos nucleicos, la oxidación conduce a interferencia en la síntesis proteica, replicación y reparación tisular, por lo que su oxidación puede provocar carcinogénesis y mutagénesis.

Este "daño primario" puede causar depleciones de NADH (forma reducida de la nicotinamida del di-nucleótido de adenosina), reduciendo el glutatión y ATP y elevando los iones citosólicos de calcio, todo lo cual puede causar daño celular, por lo que existen evidencias de que una alteración entre el balance de los RLO/antioxidantes causa daño a nivel tisular a cualquier nivel, reconociéndose en general, consecuencias como:

- Desnaturalización de proteínas
- Peroxidación lipídica
- Generación de factores quimiotácticos y,
- Deterioro en la síntesis de colágena.

Lo que implica la pérdida de la actividad enzimática, alteraciones en la permeabilidad de las membranas e incremento de infiltrados de células inflamatorias<sup>(3,4,5,6)</sup>.

#### **1.4.- Mecanismos de Daño**

Los RLO pueden modificar entonces, la estructura y función de las células al interactuar con membranas celulares, procesos enzimáticos y el genoma (modificando también tejido conectivo y antiproteasas, que defienden contra proteasas liberadas por las mismas células inflamatorias) de acuerdo con los siguientes mecanismos<sup>(3,4,6)</sup>:

1.- Los fosfolípidos de las membranas celulares, y sus ácidos grasos poliinsaturados, son susceptibles de peroxidación, alteración biológica causada por  $\text{OH}^{\bullet}$ , debido a que contienen varios dobles enlaces, iniciando una reacción en cadena que da lugar a la producción de hidroxiperóxidos lipídicos que autopropagán el proceso y alteran aún más la fluidez y permeabilidad de las membranas, es decir:

"... el radical  $\text{OH}^{\bullet}$  extrae un átomo de  $\text{H}^{\bullet}$  de estos elementos y forma un radical orgánico, que reacciona con oxígeno y genera un radical lipoperóxido (ó dioxilo), que ataca a un lípido vecino, sustrayendo un nuevo  $\text{H}^{\bullet}$ , que forma un nuevo radical (hidroperóxido). Estos hidroxiperóxidos lipídicos en presencia de metales se descomponen en alcoxilos..."

Por ello, la peroxidación lipídica es un fenómeno que a menudo precede a la lisis de células diana y que finalmente se asocia a la depleción de coenzima  $\text{Q}_{10}$  endógena (antioxidante natural muy potente), además de provocar elevación de lipasas y fosfolipasas, favorecida por el incremento de catecolaminas y calcio citosólico que provocan modificaciones osmolares de estos lípidos.

2.- Durante la peroxidación de ácidos grasos  $\omega_6$  y  $\omega_3$  se forman productos de degradación activos que reciben los nombres de hidroxialquenos, como 4-hidroxi-2-3-transenol, que es producido en grandes cantidades y que tiene propiedades que explican los efectos dañinos de los radicales, sugiriéndose actúan como segundos mensajeros para los RLO primarios.

3.- Durante el proceso de detoxificación de los productos de la peroxidación (hidroxiperóxidos, aldehídos y  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) se consume glutatión, poniendo en peligro la función de proteínas que dependen del sulfhidrilo; además su oxidación puede afectar a la enzima Calcio-ATPasa. La agrupación de hidroxiperóxidos y la formación de lisofosfolípidos puede causar una sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, activando proteasas y fosfolipasas que aumentan el daño oxidativo.

4.- El radical  $\text{OH}^{\bullet}$  puede oxidar a los grupos sulfhidrilo e inactivar enzimas esenciales ó proteínas de transporte de membrana. Este radical también puede reaccionar rápidamente con el ADN y causar alteraciones químicas de las bases y roturas de la cadena originando mutaciones activando oncogenes. El  $\text{HOCl}$  también ocasiona efectos similares: oxidación de sulfhidrilos, inactivación de hemoproteínas y citocromos, y la clorinación de bases purinas de ADN con degradación de aminoácidos y proteínas.

5.- Los RLO reaccionan con el araquidonato disponible localmente, produciendo la formación de derivados con potentes propiedades quimiotácticas para neutrófilos (como leucotrieno  $\text{B}_4$ ) amplificando las reacciones inflamatorias locales y la lesión tisular.

6.- Además de los efectos tóxicos intracelulares ya comentados, los radicales liberados al espacio extracelular producen lesión tisular por afección de membranas, reaccionando directamente con macromoléculas de la matriz de colágeno y activando pro-colagenasas latentes causando degradación de la matriz extracelular con la consecuente necrosis y proliferación de una mayor cantidad de radicales que despolimerizan al ácido hialurónico del espacio intercelular agregándose enzimas proteolíticas de leucocitos a la afección estructural de las células.

## 2.- LOS ANTIOXIDANTES.

Los antiguos egipcios desarrollaron eficientes métodos para preservar los cuerpos a través del embalsamamiento con aceites y extractos de plantas que funcionaban, sin conocerlo en ese momento, como antioxidantes efectivos, lo cual ha representado la base de esta terapéutica en aumento.

Normalmente debe existir un balance entre RLO y antioxidantes, lo que surgió tempranamente en la filogenia; ontogénicamente, el feto incrementa paulatinamente sus niveles pulmonares y actividad de SOD, glutatión peroxidasa (GSH-Px), CAT y glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa (G6P-DH) para soportar la brusca oxigenación al nacimiento y un desbalance de estos sistemas puede llevar a la disfunción para soportar tal cambio. De igual forma puede ocurrir en las disfunciones inmunológicas<sup>(6)</sup>.

### 2.1.- Funciones y Clasificaciones

Los antioxidantes funcionan como barreadores de RLO y normalmente reducen hasta el 90% del oxígeno consumido en el organismo, evitando su reducción univalente por la citocromo oxidasa. Hasta el momento, se conocen dos tipos de antioxidantes de acuerdo con su función: los que remueven radicales ya producidos en diversos sistemas, y los que previenen la generación de los mismos, actuando de forma inespecífica ó indirecta para suprimir su producción por células inflamatorias. Otra clasificación más, menciona el sitio de obtención, llamando antioxidantes Internos a los que se producen de forma natural (los principales representantes, Coenzima Q<sub>10</sub> y GSH), limitando la peroxidación lipídica al barrer y disminuir la formación de peroxidasas.

En general, existen 3 líneas de defensa antioxidante a nivel interno, contra la lesión oxidativa que actúan eficazmente como barreadores<sup>(3,4)</sup>:

- Primera línea de defensa (Eliminación enzimática): Dos enzimas SOD, una citosólica ó citoplasmática (cobre-zinc dependiente) y otra mitocondrial (manganeso dependiente), son responsables de mantener muy baja la concentración intracelular del radical O<sup>2</sup>. El grupo de los tioles es esencial también en la protección contra los efectos indeseables de los radicales y la sustancia fundamental es el Glutatión reducido (GSH). Las enzimas dependientes de este sistema son: Se-GSH peroxidasa (reduce H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y los hidroperóxidos), Se-fosfolípido hidroperóxido, y GSH peroxidasa (GSH-Px; reduce los peróxidos en general). El sistema de la catalasa es otro que actúa en la regulación de la concentración intracelular de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Además, metaloproteínas, como metalotioneína, aún cuando no actúan como enzimas, son importantes en la regulación del metabolismo de zinc y cobre, que poseen un elevado potencial para eliminar el radical OH<sup>+</sup>.
- Segunda línea de defensa (*Scavengers*): Se trata de una gran cantidad de sustancias hidro y liposolubles, tales como vitamina E y C, carotenoides, cisteína y ácido úrico, que actúan como eliminadores directos ó *scavengers*, dando un átomo de H<sup>+</sup> a los radicales libres haciéndolos menos reactivos.
- Tercera línea de defensa ó eliminación de Iones: Primordialmente de cobre y hierro, capaces de catalizar la reacción de Haber-Weiss reduciendo la posibilidad de generar hidroxilos. La concentración de hierro libre, intra y extracelular, se mantiene baja gracias a su unión a proteínas de almacenamiento y transporte (ferritina, transferrina y lactoferrina). La ceruloplasmina (proteína que contiene cobre), es también un antioxidante

sérico importante, sin embargo no garantiza la disminución en la producción de radicales, ya que la posibilidad de catálisis persiste, así como la producción de  $\text{OH}^+$  en los sitios de unión del metal a esta proteína.

## 2.2.- Antioxidantes específicos ó Barredores (Scavengers).

Diversos estudios epidemiológicos han demostrado una relación entre la elevación del estado antioxidante y la disminución del riesgo de enfermedades crónico-degenerativas, estableciendo que el consumo óptimo de vitaminas antioxidantes pudieran no ser logrados solo con la dieta<sup>(7)</sup>, haciendo necesario asegurar que el consumo de suplementos es seguro, a las dosis más adecuadas, por los tiempos más convenientes y estar libres de producir efectos secundarios.

A continuación mencionaremos algunas características y mecanismos de acción ya demostrados de los antioxidantes (principalmente vitaminas y micronutrientes necesarios y generados en la misma oxidación en sistemas biológicos, debido a la necesidad de acoplarlos a sistemas reductores no radicales, como glutation/ glutation disulfido,  $\text{NADPH/ NADP}^+$  y  $\text{NADH/ NAD}^+$ ), antes de comentar sus aplicaciones en patologías específicas, ya que todos estos compuestos tienen funciones y propiedades de interés biológico que no se relacionan con mecanismos antioxidantes<sup>(8)</sup>.

### 2.2.1.- Vitaminas antioxidantes

#### 2.2.1.1.-Vitamina E (alfa-tocoferol)

El término vitamina E es el nombre colectivo de 8 moléculas naturales: 4 tocoferoles (que difieren en el número de grupos metilo: alfa tiene 3, beta y gamma 2 y delta 1), y 4 tocotrienoles (con un extremo insaturado de su cadena, dándole un tercio de actividad biológica en comparación con tocoferoles); con actividad barredora similar, aunque diferente potencia en el siguiente orden: alfa, beta, gamma y delta, alfa es el más importante<sup>(9)</sup>.

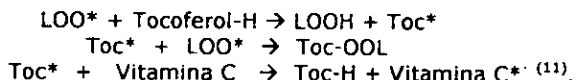
Se trata de una vitamina liposoluble cuya fuente principal es el aceite vegetal y requiere bills para su absorción; 25% de la vitamina ingerida es absorbida y aparece en la linfa, no acarreadose de forma específica por proteínas. El 90% de ella se encuentra en partículas de lipoproteínas de baja densidad (LDL). No existe un almacén único en el organismo localizándose en hígado, tejido adiposo y músculo; 70 a 80% de una dosis intravenosa es excretada en la bilis durante la primera semana de aplicación con la aparición de sus metabolitos urinarios. Una unidad Internacional es equivalente a 1mg de *dl-alfa*-acetato-tocoferol, con una recomendación diaria de 30mg. En varias especies la dosis oral, letal promedio es  $>2\text{gr/ kg}$ , pero observándose efectos secundarios cuando la dosis es  $>1\text{gr/kg}$  (equivalente a 200-500mg/ kg en humanos), siendo pocos los casos reportados aún con dosis tan altas como 3.2gr/ día<sup>(10)</sup>. Cuando es suplementada en dosis de 1g/kg en la dieta, las concentraciones mayores se alcanzan a las 48 horas de su administración y se acumula de forma predominante en hígado; sus niveles en riñón, corazón, músculo y cerebro continúan incrementándose aproximadamente durante 6 semanas y disminuyen lentamente al suspenderse de la dieta.

Se considera un antioxidante primario hidrofóbico, de sacrificio, presente en membranas biológicas y LDL; es el más abundante en el organismo y su función más relevante es la fluidificación y estabilización de membranas<sup>(11,12)</sup>. Por la naturaleza hidrofóbica requiere de proteínas de transferencia hacia el espacio intracelular e hipotéticamente esta habilidad es necesaria para su incorporación dentro de VLDL in

vivo, transportándose a través de la vena porta hacia el hígado en forma de quilomicrones<sup>(9,13)</sup>. Llevado alrededor del cuerpo como componente fundamental de LDL (6-12 moléculas de *alfa*-tocoferol/ molécula de LDL y una cantidad menor de gama) sus concentraciones difieren de una membrana a otra, representando en plasma y eritrocitos, el mayor antioxidante protector, a diferencia de las propias LDL, hepatocitos ó cualquier otro órgano, donde determina su susceptibilidad al daño oxidativo por diferentes radicales ( $\text{OH}^+$ , alcoxil,  $^1\text{O}_2$  y quizás varios complejos oxígeno-metal).

Dentro de sus mecanismos de acción se encuentran los siguientes:

- Neutraliza al radical orgánico peroxilo ( $\text{LOO}^*$ ) especialmente en membranas, debido a que reacciona con él, donándole un átomo de  $\text{H}^+$  y produciendo un hidroxil-peróxido (relativamente estable), y un radical *alfa*-tocoferoxil ( $\text{Toc}^*$ ), interrumpiendo la reacción en cadena y ofreciendo protección contra la peroxidación lipídica (antioxidante rompe-cadena, similar a los carotenoides); además,  $\text{Toc}^*$  reacciona con otro radical  $\text{LOO}^*$  para formar una mezcla de ambos, también reactiva. Alternativamente, el primero puede reducirse ó regenerarse a su forma oxidada, en el sentido inverso a través de vitamina C en la interfase agua/ lípido (todavía controversial en humanos). Esto es:



- La quelación del  $^1\text{O}_2$ ,  $\text{OH}^+$  y  $\text{LOO}^*$  por homólogos de la vitamina E (dependiendo de su actividad sobre el radical en la posición 6 de la cadena), es realizado en el siguiente orden: alfa > beta > gama > delta tocoferol, produciendo varios polifenoles que alteran el metabolismo de diversas sustancias propias del organismo, lo que podría contribuir a su aparente habilidad para disminuir las tendencias trombóticas; sin embargo a altas concentraciones in vitro, puede causar la formación de radicales por sus propiedades pro-oxidantes.
- Disminuye el daño endotelial mediado por neutrófilos, debido a un mecanismo indirecto al aumentar las concentraciones de GSH y actuar sinérgicamente para protegen a los grupos SH, importantes en la formación de enzimas como  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa cuya disminución lleva a la elevación de calcio intracelular que produce necrosis celular.

Se le han atribuido diversas acciones, por ejemplo:

a.- Se ha reportado mayor supervivencia de animales sometidos a choque séptico por *E. Coli* y *Staphylococcus*, si estos se alimentan con altas concentraciones de *alfa*-tocoferol antes del episodio.

b.- La influencia de la carga aguda de hierro y etanol sobre la peroxidación lipídica, los sistemas de defensa antioxidantes y su modificación después de suplemento con Vitamina E, ha sido evaluada hace 2 años en China, observando un aumento paulatino en la peroxidación endógena y disminución del contenido de *alfa*-tocoferol, por lo que el suplemento con vitamina E, puede proteger contra la peroxidación en estos casos sin afectar de forma predominante la actividad de la SOD, CAT y GSH-pex<sup>(14)</sup>.

c.- Previene la modificación de las LDL (como parte del proceso aterosclerótico) y preserva la generación de moléculas de ATP posterior a la reperfusión, con lo cual reduce el porcentaje de necrosis miocárdica de 73 a 47%, en modelos experimentales de infarto miocárdico.

d.- Desde 1995 se han reportado sus efectos a nivel del músculo liso, demostrándose que *alfa*-tocoferol inhibe la proliferación celular a este nivel en forma dosis dependiente (a diferencia de beta, que adicionado a su similar previene la inhibición del crecimiento), ya que esto ha sido reportado como uno de los eventos centrales al inicio de la aterosclerosis, por lo que esta vitamina representa un regulador negativo de este proceso<sup>(15)</sup>, además de barrer radicales peróxido en la fase hidrofóbica de las membranas celulares. El evento tardío, asociado con esto, es la oxidación de LDL por macrófagos y la formación de células espumosas. La concentración del *alfa*-tocoferol es cuidadosamente controlado por proteínas hepáticas de unión ó transferencia. Así mismo, como un evento preliminar a esta cascada, y a la señal de transducción que controla el crecimiento celular mediado por receptores, la activación de un factor llamado AP-1 es inhibido igualmente por *alfa*-tocoferol, lo que se traduce como el mecanismo para inhibir la proliferación celular<sup>(15)</sup>. Los *di-acil*-gliceroles producidos por fosfolipasa C y aquellos reciclados de productos de fosfolipasa D y A<sub>2</sub> pueden estimular a la proteíninasa C (principalmente su isoforma beta-II en membranas de células de músculo liso), clave en la señal de transducción, involucrada en el crecimiento y diferenciación celular, lo cual puede ser prevenido por la administración in vitro de vitamina E, bloqueando indirectamente, la proliferación de células de músculo liso y endoteliales<sup>(9)</sup>.

e.- Inhibe al NF-kB, modulador de la expresión génica, con sensibilidad del estado redox y activado por RLO como H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, hidroperóxidos de lípidos y la luz ultravioleta; su papel directo sobre las señales efectoras para modificar la expresión genética en el proceso de carcinogénesis no debe ser olvidado<sup>(9)</sup>.

f.- Inhibe la agregación plaquetaria, la adhesión de monocitos por inhibición de la expresión de E-selectina (molécula de adhesión endotelial), así como inhibición de la expresión del RNAm de la misma<sup>(9)</sup>.

g.- Interviene en el metabolismo del ácido araquidónico al inhibir la síntesis de PGE<sub>2</sub>, debido por inhibición de la fosfolipasa A<sub>2</sub>; además, inhibe la producción de PGI<sub>2</sub> (prostaciclina) metabolito predominante del ácido araquidónico por la vía de la ciclooxigenasa, argumentos para afirmar que el estrés oxidativo disminuye aparentemente su producción, lo que podría ser restaurado con la administración de vitamina E<sup>(9)</sup>.

h.- Adjunto con agentes antitumorales, inhibe el crecimiento de células de neuroblastoma in vitro, además de haber demostrado en varias líneas celulares que promueve la diferenciación celular; sin embargo se ha reportado que se requieren concentraciones relativamente altas de *alfa*-tocoferol (>20mg/L) para un efecto antiproliferativo, en contraste con dosis mucho menores de succinato de *alfa*-tocoferil (otra presentación de vitamina E) que demuestra ser efectivo agente antiproliferativo a una dosis <1mg/L.

i.- A nivel intracelular contribuye a la modulación de la respuesta inmune al disminuir la producción del factor de necrosis tumoral (TNF-*alfa*) en fumadores y antagonizar a su receptor; además, aumenta la producción de IL-6, disminuye la de IL-1-*beta* por monocitos y anión superóxido (comprobado en pacientes hipertigliceridémicos)<sup>(16)</sup>.



j.- Indirectamente regula la biosíntesis del grupo heme y proteínas que lo contienen, modulando la respuesta inmune y regulación genética <sup>(13)</sup>.

Hasta el momento, aunque su toxicidad es baja, su única contraindicación, a altas dosis, es en sujetos con alteraciones de la coagulación asociadas a vitamina K y su Ingesta por tiempos prolongados, aún en sujetos sanos, requiere de investigaciones adicionales<sup>(7)</sup>.

### 2.2.1.2.- Vitamina C (ácido ascórbico)

Propuesto como sustancia benéfica para cáncer, cataratas, enfermedades cardiovasculares, colesterol, aterosclerosis, hipertensión y envejecimiento, entre otras afirmaciones, se estima que 35% de la población adulta en los Estados Unidos, ingiere alguna forma de suplemento no dietético de esta vitamina.

Se trata de una vitamina hidrosoluble, absorbida en la parte superior del intestino por un sistema de transporte activo saturable, sodio-dependiente (55% de una dosis de 1.5gr es absorbido, en contraste con sólo el 16% de una dosis de 12gramos) y su depósito está limitado por otros factores más que el consumo dietético. Sus niveles se correlacionan estrechamente con los niveles en leucocitos (indicador del nivel tisular), reflejando al menos el consumo dietético de varios meses previos, aún durante los periodos de variación estacional <sup>(19)</sup>. La cantidad filtrada en los glomérulos es pequeña y la resorción tubular normalmente es casi completa. El oxalato es el metabolito principal (30-40% del total), por lo que la litiasis renal, de oxalato y urato ha sido reportada con dosis intravenosas mayores ó en insuficiencia renal crónica.

La incidencia de efectos adversos asociados es extremadamente baja y la dosis más segura es <4gr/ día<sup>(10)</sup>, y es en este aspecto que las recomendaciones de su consumo están aún bajo revisión por la *Food and Nutrition Board of the National Academy of Sciences*, que reporta al momento 4 valores de referencia:

1. EAR (requerimientos promedio estimados): 100mg/ día
2. RDA (recomendación dietética permitida): 120mg/ día
3. AI (consumo adecuado): estimado en 200mg/ día, obtenidos de 5 frutas ó vegetales ó 100mg/ día para prevenir la deficiencia
4. TUI (nivel de consumo superior tolerable ó nivel diario más alto de consumo sin riesgo de efectos adversos en casi todos los individuos de una población): <1gr/ día de la vitamina, lo que muestra un amplio rango de seguridad en humanos<sup>(17)</sup>.

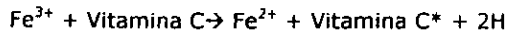
Sin embargo, a mediados del año pasado la *American Society for Clinical Nutrition* fue aún más específica al reportar que la RDA de vitamina C en adultos era de 60mg/día (para hombres y mujeres no fumadores), en base al requerimiento promedio de 46mg/día para prevenir el escorbuto, que se considera una cantidad insuficiente para proteger contra enfermedades crónicas y revisándose nuevamente la evidencia bioquímica, clínica y epidemiológica en relación a su papel preventivo, concluyendo que la totalidad de la información sugiere un consumo de 90-100mg/día es óptimo en población no fumadora (lo que representa casi 2 veces la recomendación promedio hasta 1989, incluso apoyando 120mg/día como nueva cifra al respecto)<sup>(17,18)</sup>.

Dentro de sus mecanismos de acción se encuentran los siguientes:

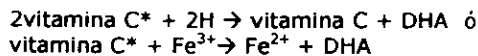
- Produce desactivación y quelación de radicales OH<sup>+</sup>, O<sup>2</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, hipoclorito y <sup>1</sup>O<sub>2</sub>, resultando el más rápido de los antioxidantes en comparación con otros a nivel plasmático (proteínas tioles, urato, bilirrubina y *alfa*-tocoferol), inhibiendo la

peroxidación iniciada por el radical LOO\*, con lo que se considera el antioxidante más importante del líquido extracelular.

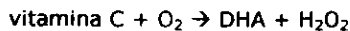
- Eficiente atrapador de radicales LOO\* en la fase acuosa (antes de que puedan iniciar la peroxidación), protege a las membranas contra el daño oxidativo (Protector de membranas), incluso al aumentar la actividad del tocoferol (reduciendo el tocoferoxil y restaurando su actividad describiéndose una acción antioxidante del ascorbato asociada a tocoferoles, que mantendrá el potencial barrador dentro de la membrana por regeneración de tocoferol y transfiere el reto oxidativo a la fase acuosa) <sup>(8)</sup>.
- La vitamina C es oxidada en dos pasos: el primero al radical ascorbil y posteriormente a dehidroascorbato. En este proceso el ascorbato disminuye 2 átomos de H<sup>+</sup>, que reaccionan con el radical peroxil AAPH-derivado (AOO\*) para formar un producto no radical, AOOH (hidroxiperoxido AAPH-derivado). El atrapamiento de AOO\* previene que este radical ataque a LDL y otras lipoproteínas plasmáticas; debido a que el ascorbato es usado en el curso de esta acción y previene la iniciación de la peroxidación, es considerado un antioxidante de sacrificio y preventivo, respectivamente <sup>(11)</sup>.
- Además de sus propiedades antioxidantes, tiene propiedades oxidantes debido a que su combinación con Fe<sup>3+</sup>/Fe<sup>2+</sup> produce una intensa oxidación a través de la reacción de Felton, esto es:



donde 2 moléculas de vitamina C\* (radical no reactivo), ó la reacción con Fe<sup>3+</sup> pueden producir una molécula de dehidroascorbato (DHA) y restablecer el potencial oxidativo del ácido ascórbico:



Con lo que finalmente durante su oxidación también se formará H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:



Lo que parece explicar el potencial efecto peroxidante de la vitamina, aún cuando se necesita una cantidad suficiente de Fe<sup>3+</sup>/Fe<sup>2+</sup> para inducir la peroxidación (con lo que el potencial oxidante disminuye significativamente).

Se le han atribuido diversas acciones dentro de las cuales se encuentran:

a.- La administración de 100mg 3 veces al día durante 8 semanas produce 12% de incremento del conteo leucocitario, mientras 2gr/ día por 15 días disminuyen su actividad bactericida y precipita la deficiencia de cianocobalamina <sup>(10)</sup>.

b.- Tiene un sin número de acciones biológicas bien definidas: co-sustrato en la biosíntesis de procolágeno, catecolaminas y carnitina, además de su amplio espectro de actividades antioxidantes por su habilidad para reaccionar con numerosos RLO acuosos, con lo que reduce la progresión de la aterosclerosis, disminuyendo la oxidación de LDL <sup>(11)</sup>.

c.- De forma experimental, afecta el catabolismo de colesterol por ácidos biliares condicionando el desarrollo de enfermedad litiasica vesicular, incluso en humanos, demostrándose que disminuye la actividad de la *alfa*-hidroxilasa-7-colesterol (enzima que regula el catabolismo del colesterol por ácidos biliares), y la hipersecreción de mucina (glicoproteína secretada por el epitelio vesicular) que precede a la des-

estabilización del colesterol y formación de litos, debido a que los radicales  $\text{OH}^+$  estimulan su secreción, con lo que la inhibición de los cambios oxidativos intravesiculares disminuyen la aparición de litos. En humanos, este año se reportaron resultados parciales del *Thrid National Health and Nutrition Examination Survey* (NHANES III)<sup>(9)</sup>, que incluye entre otros datos los niveles séricos de ácido ascórbico de 13mil adultos americanos, mencionando que los niveles están inversamente asociados con la presencia de enfermedad clínica y asintomática (el incremento fue asociado con una disminución del 23% y 22% de la prevalencia respectivamente;  $p < 0.001$ ), sin existir modificaciones significativas en hombres ni asociarse con el uso de suplementos, en contraste con el reporte de Simon y colaboradores, entre mujeres post-menopáusicas con enfermedad coronaria, que reportaron un 50% menos litiasis, asociándose con influencia del sexo en el estado antioxidante del ácido ascórbico<sup>(20)</sup>.

d.- Protege contra el daño oxidativo endógeno del DNA en esperma humano, afectando la integridad del mismo y el riego de defectos genéticos, particularmente en poblaciones con bajos niveles de ascorbato como sucede en fumadores<sup>(8)</sup>.

e.- Matsuda y cols, al inicio de la década de los 90's, investigaron sus efectos cutáneos en altas dosis (>60mg/día) en quemaduras extensas, reportando que detiene la progresión de las alteraciones en la permeabilidad vascular después de las mismas, reduciendo la unión microvascular del líquido y proteínas, protegiendo al endotelio capilar y células circulantes como eritrocitos y leucocitos, además de reducir la peroxidación en las quemaduras, que se suma al daño endotelial<sup>(21)</sup>.

f.- En un estudio holandés, aleatorizado, contra placebo, en 52 pacientes que reportaron fractura de muñeca y secuelas de distrofia simpática refleja, se ha propuesto como tratamiento profiláctico a dosis de 500mg/ día por un promedio de 50 días. Esta secuela se caracteriza por una fase caliente pseudo-inflamatoria (con cambios en la microcirculación) y una fase fría (con cambios tróficos) donde los RLO se han propuesto como un posible mecanismo, demostrándose la disminución en su incidencia, en adultos mayores ( $p=0.008$ ), apoyando la teoría oxidativa en esta patología<sup>(21)</sup>.

Finalmente, la única indicación absoluta es la deficiencia de la misma (escorbuto), considerándose como una indicación relativa a la alcaptonuria, error congénito del metabolismo caracterizado por la ausencia de oxidasa del ácido homogentísico (HGA), producido durante el metabolismo de la tirosina y fenilalanina, sin que exista un tratamiento efectivo; sin embargo, para prevenir sus complicaciones, como la presencia de litiasis, grandes cantidades de vitamina C pueden resultar benéficas al acidificar la orina. Además, in vitro protege a la hidroxilasa de lisil, requerida para reparar el cartilago, de la inhibición por la HGA, además de impedir la oxidación y polimerización de esta última, demostrándose la reducción en su excreción<sup>(22)</sup>. Dentro de sus contraindicaciones se considera de forma predominante a la insuficiencia renal crónica y aguda y la deficiencia de cianocobalamina.

### 2.2.1.3.- Vitamina A

Se trata de una de las vitaminas más antiguas que se han utilizado en la historia, siendo una sustancia esencialmente liposoluble. Una unidad internacional de vitamina A equivale a 0.3 mcg de *all-trans*-retinol y 1 equivalente de retinol tiene la actividad de 1mcg de *all-trans*-retinol (3.33 UI), 6 mcg de beta-caroteno (10UI) ó 12 mcg de provitaminas carotenoides. El tiempo promedio de intoxicación se ha estimado

en 7.5 meses con dosis de 300,000 UI/ día y 3.5 meses de 500,000 UI/ día en una persona de 70kg, por lo que la dosis de 5,000-10,000 UI/ día parece ser segura<sup>(10)</sup>.

El retinol y sus ésteres (forma más común en que los retinoides, derivados naturales ó sintéticos y análogos, son ingeridos como alimento ó suplementos): ácidos *all-trans*, *9-cis*- y *13-cis*-retinoicos, y análogos sintéticos, tienen un patrón característico de metabolismo, farmacocinética e interacción con receptores celulares. El retinol es almacenado en hígado (80-90%), retina, pulmones y riñones; en respuesta a las necesidades periféricas, el hígado produce proteínas ligadoras de retinol (RBP), que unen su forma libre en una proporción molar de 1:1. Su excreción, después de la oxidación de ácido retinoico y glucuronidación, ocurre por vía hepática y renal (después de la filtración glomerular, las RBP son catabolizadas en los túbulos renales).

Es la única vitamina antioxidante que no se considera como barrador de RLO, sino como medida antioxidante debido a que cuenta con los siguientes mecanismos:

- Los ácidos *all-trans*- y *9-cis*-retinoico sirven como ligandos para las 6 proteínas nucleares retinoide-receptor (factores de transcripción), para mediar sus efectos en la regulación de la expresión genética y su poderosa actividad biológica, que al igual que las hormonas esteroideas, reside en sus interacciones receptor-específicas en cada uno de los casos<sup>(23)</sup>.
- Los mecanismos propuesto para su efecto antiproliferativo son a través de receptores específicos (RAR y RXR), la inhibición de la transcripción del activador proteico 1 (AP-1: complejo elaborado de c-Fos y c-Jun, que media la señal de varios factores de crecimiento, péptidos inflamatorios, oncogenes y promotores tumorales) que da como resultado la proliferación celular. Además, la disminución en las concentraciones tisulares de ácido *all-trans*-retinoico puede interferir con la señal de transducción normal, con subregulación de la actividad de RAR que actúa por secuestro de AP-1, previniendo su unión a los sitios específicos; en ausencia de estos receptores, AP-1 se une a la secuencia de DNA promoviendo la proliferación celular<sup>(24)</sup>.

Dentro de sus indicaciones absolutas y relativas podemos mencionar<sup>(24)</sup>:

a.- Deficiencia de vitamina A (Incluso asociada a la deficiencia de zinc, debido a la incapacidad de sintetizar RBP y rodopsina, debiendo recibir tratamiento de forma conjunta con sulfato de zinc 220mg/ día por 2 semanas como promedio).

b.- Síndrome de mala-absorción leve (grasa fecal promedio de 10g/día con dietas de 100g de grasa), debido a enfermedad crónica intestinal, reversible en un rango del 60%, con la suplementación oral en un promedio de 30 días con 50,000 UI ó 15mg.

c.- Deficiencia de vitamina A subclínica (sin ceguera nocturna), en poblaciones con cirrosis alcohólica, cirrosis biliar primaria, antecedente de cirugía intestinal de bypass (realizada regularmente por obesidad) e insuficiencia pancreática.

Sus contraindicaciones principales son las siguientes<sup>(24)</sup>:

a.- Hiperlipidemias tipo I y enfermedad hepática alcohólica, debido al riesgo de toxicidad, aún cuando cursen con deficiencia, por que de forma experimental, como resultado de su movilización hepática a tejidos periféricos, aumenta la oxidación del retin-aldehído y destrucción del ácido retinoico por enzimas del citocromo P<sub>450</sub>.

b.- Falla hepática, debido al deterioro en el procesamiento de la vitamina y la disminución en la síntesis de RBP y transtiretina.

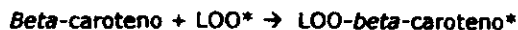
c.- Alcoholismo, debido a la competencia del etanol con retinol por la alcohol-dehidrogenasa, que cataliza la oxidación del retinol a retin-aldehído y posteriormente a ácido retinoico y cuya deficiencia tisular local podría ser un mecanismo molecular que contribuya al daño hepático relacionado con el alcohol (activación de la proliferación de hepatocitos y fibrosis hepática). Además, el etanol inhibe la síntesis de ácido retinoico por competición con retinol, mediada por alcohol-dehidrogenasa, incrementando su destrucción por aumento en la actividad de citocromo P<sub>450</sub>.

#### 2.2.1.4.- Carotenos

Se trata de un grupo de 500- 600 pigmentos encontrados en todas las plantas fotosintéticas donde el más representativo es *beta*-caroteno, con actividad predominante de provitamina (formando 2 moléculas de retinol), existiendo compuestos similares con beneficios antioxidantes, debido al extenso sistema de dobles enlaces responsable de esta función, como *alfa*-caroteno, licopene, luteína y zeaxantina. Sus funciones pueden ser altamente específicas como lo indica el predominio en algunas localizaciones: oxicarotenoides, zeaxantina y luteína en la mácula retiniana con ausencia virtual de *beta*-caroteno, que tiene mayor distribución en hígado, glándula adrenal, riñón, ovario y grasa, mientras que licopene es más abundante en testículo<sup>(8,11)</sup>.

Desde 1997, se ha demostrado que el consumo de suplementos orales de beta caroteno, en dosis de 25mg/día, incrementan sus concentraciones séricas (>150%) en comparación con las de *alfa*-caroteno y licopene, además de asociarse con una disminución del 37% de luteína, sin alterar las concentraciones de retinol y *alfa*-tocoferol, lo que ha sugerido que existe una interacción biológica y balance en estas concentraciones por lo que los suplementos no aseguran la elevación uniforme y equilibrio de todos los carotenoides séricos normales<sup>(25)</sup>. Una unidad internacional de vitamina A equivale a 0.6 mcg de *beta*-caroteno y 1 equivalente de retinol a 6mcg del mismo. Su conversión es en intestino delgado y su conversión incompleta produce beta-caroteno y retinol. Dosis de 30-180mg/ día durante más de 15 años, no han reportado efectos secundarios, pero individuos que consumen 30mg/ día por periodos prolongados tienen manifestaciones de carotinemia, reversibles de forma inmediata con su suspensión, concluyendo que su consumo prolongado es seguro y no provocan hipervitaminosis A, debido a que su absorción intestinal es mucho menor e induce menor toxicidad en comparación con esta última<sup>(10)</sup>.

*Beta*-caroteno es una sustancia liposoluble, almacenada en tejido adiposo y no en hígado. Sus acciones sinérgicas en la fase acuosa y lipofílica del proceso de oxidación, con otros antioxidantes han sido estudiadas, siendo el de menor reactividad a través de radicales (en comparación con ascorbato y tocoferol) y actuando como el mayor antioxidante en solución y el más lipofílico (más que tocoferol), debido a su localización en el interior de las membranas y moléculas de LDL<sup>(26)</sup>, donde está presente en aproximadamente una concentración de 1:20 con *alfa*-tocoferol y es consumido sólo después de que éste último lo ha hecho; sin embargo, los mecanismos subyacentes de beta caroteno a nivel de la aterogénesis pueden no estar relacionados con su actividad antioxidante, sino todo lo contrario, ya que es el último antioxidante consumido en la exposición de LDL al proceso oxidativo como un quelante primario de <sup>1</sup>O<sub>2</sub> y reacciona con radicales peróxido en una forma mayor a la convencional, agregándose una reacción que no dona átomos de hidrógeno:



Pero mientras esto ocurre de forma eficiente a bajas presiones de O<sub>2</sub>, cuando sucede lo contrario, puede tener acciones pro-oxidantes, y la razón de esto parece ser una

**reacción de desgaste** en la cual los radicales derivados intermedios, reaccionan con  $O^2$  para formar radicales  $LOO^*$ , lo que puede perpetuar la peroxidación que lo transforma en un pro-oxidante de mayor importancia<sup>(8,11)</sup>.

Los mecanismos antioxidantes reconocidos para los *beta*-carotenos son los siguientes:

- quelante efectivo del  $^1O_2$  (aunque licopene, con una cadena análoga de *beta*-caroteno, tiene la tasa más constante y rápida para esta función).
- Inhibe la peroxidación lipídica al interactuar con RLO, dando como resultado productos de oxidación del caroteno.
- Reduce los radicales tri-cloro-metilperoxil, con reacciones de auto-oxidación a cualquier nivel de presión tisular de oxígeno, con formación de epóxidos localizados en la cadena beta y grupo cetona (*beta*-apocarotenos) y aldehído (*beta*-apocarotenol), a diferentes longitudes de la cadena, aunque tiene una mejor acción atrapa-radicales en presiones (fisiológicas) bajas de oxígeno, siendo un antioxidante relativamente potente en estas condiciones.
- Sus acciones anticarcinogénicas pueden ser mediadas solo en parte por la desactivación de los RLO, pero también a través de su conversión a retinoides (especialmente ácido retinoico) actuando en la transcripción genética a través de las familias RAR y RXR de las proteínas de receptores nucleares, que ha demostrado ser un mecanismo efectivo en la terapia de varias neoplasias<sup>(12)</sup>.

Sus acciones hasta el momento se limitan a las siguientes condiciones:

a.- Actúa como antiinflamatorio al inhibir la peroxidación del ácido linoléico por XO y disminuir el daño celular mediado por neutrófilos.

b.- Rowe, en 1996, analizó su situación como antioxidantes, refiriéndose a una serie de estudios hasta el momento realizados e indicando que estudios animales han comprobado su papel protector contra el cáncer, a pesar de que los resultados en humanos son completamente contradictorios (estudios CARET, ATBC y el PHS) aunque otros estudios al respecto (como el WSH, versión femenina del PHS), han propuesto la hipótesis de que se trata solamente de un marcador de muchos otros nutrientes, en pro de una buena alimentación, como la única medida de prevención en estos casos, pareciendo que la toma conjunta de una cápsula de vitamina E podría compensar los malos hábitos alimenticios y conductas (como el tabaquismo), lo cual representa un grave problema para demostrar sus beneficios<sup>(27)</sup>.

c.- Debido a que el sistema Inmune juega un papel importante en la prevención del cáncer, se ha sugerido que puede aumentar la función inmune, con la conclusión general de que aumentan la inmunidad mediada por células particularmente en ancianos<sup>(28)</sup>.

No existen hasta el momento indicaciones relativas ó absolutas hasta el momento para su consumo en forma de suplementos y la única contraindicación identificada a lo largo de varios estudios son los casos de cáncer pulmonar en estadios iniciales, y fumadores con sospecha del diagnóstico (los cuales recibieron 20mg/día), ya que esto pudiera influir en la incidencia de cáncer avanzado<sup>(7,8)</sup>, demostrándose en pruebas de quimioprevención que sólo ó en combinación con vitamina A ó E, incrementa su incidencia y mortalidad debido a sus efectos co-carcinogénicos<sup>(29)</sup>.

## 2.2.2.- Antioxidantes plasmáticos naturales

No reconociéndose como barredores de RLO propiamente dichos, debido a una función más importante en el organismo y porque representan una minoría respecto al proceso oxidativo, existen varias moléculas pequeñas antioxidantes, particularmente

en el espacio extracelular, donde las enzimas están ausentes ó presentes en pequeñas cantidades, que se clasifican por su naturaleza polar como:

1. **Hidrosolubles:** se localizan en líquidos tanto intra como extracelulares como, ascorbato (fracciones de vitamina C), urato (producto final del metabolismo de las purinas), GSH (tripéptido que contiene residuos de cisteína, al cual debe su mayor actividad antioxidante), y aminoácidos libres con grupos tiol, que se encuentran distribuidos en concentraciones sustanciales en el líquido extracelular<sup>(11)</sup>.
2. **Liposolubles:** localizadas en las membranas celulares y lipoproteínas, considerándose en este grupo sustancias como *alfa*-tocoferol (una pequeña proporción plasmática) y carotenoides como *alfa*-caroteno, licopene, luteína, bilirrubina (producto final del catabolismo de hemoglobina, que ha demostrado actuar como antioxidante), así como un sin número de hormonas femeninas esteroideas, como 2-*hidroxi*-estrone y 2-*hidroxi*-estradiol.

Ácido úrico, albúmina, bilirrubinas, glucosa, haptoglobulina, ceruloplasmina y hemopexina, han demostrado inhibir reacciones oxidativas por secuestro de metales de transición (Tabla 1), actuando todos ellos en una fase acuosa, a diferencia de la vitamina E (principal antioxidante plasmático).

Tabla 1. Antioxidantes plasmáticos menores

DEFENSA	MODO DE ACCION	COMENTARIO
Transferrina/ lactoferrina	Se une al hierro para disminuir su participación en la peroxidación y reacción de Haber-Weiss.	
Albúmina	Se une al cobre y hierro minimizando su reacción con OH* (en la reacción de Haber-Weiss), por lo que puede participar en la reacción de Felton, pero el radical OH* formado sobre la superficie de la albúmina es eliminado por ella sin permitir que escape dentro de la solución libre, por lo que se considera un antioxidante sacrificado.	Antioxidante plasmático menor, su unión al cobre es un ejemplo de reacción sitio-específica biológica no significativa.
Haptoglobulina/ hemopexina	Capta Hemoglobina libre en la circulación, impide la liberación del hierro y bloquea la oxidación de dimetil-sulfóxido inducido por Hemoglobina.	Hemoglobina y meta-hemoglobina son preoxidadas poderosas que aceleran la peroxidación lipídica.
Urato (ácido úrico)	Inhibe la peroxidación por su habilidad para unir débilmente al hierro y cobre.	
Glucosa	Elimina radicales OH* a una tasa constante similar a manitol.	Mayor acción después de consumir alimentos ricos en carbohidratos.

Fuente:

En lo que respecta a los metales de transición, se ha demostrado que cobre, zinc y manganeso son esenciales para el mantenimiento de la actividad antioxidante de SOD, pero libres son capaces de inducir daño oxidativo, por lo que las proteínas

que están involucradas en su unión pueden actuar como antioxidantes (transferrina y ceruloplasmina, uniendo hierro y cobre respectivamente, de forma similar a hemopexina)<sup>(30)</sup>. Incluso, uno de los factores asociados a la sobreproducción de RLO, en lo que a enfermedades neurodegenerativas se refiere, es el depósito de hierro y otros metales de transición en regiones cerebrales afectadas por la muerte neuronal, independientemente de la etiología, aumentando el número de reacciones redox, principalmente reacción de Felton, iniciando su interacción con un sistema enzimático específico donde la ceruloplasmina juega un papel fundamental.

Recientemente, Martínez-Lascano y colaboradores, en el departamento de Neuroquímica de Barcelona<sup>(31)</sup>, han estudiado estos metales en las reacciones oxidativas, principalmente hierro y cobre, éste último interviniendo a varios niveles del metabolismo de dopamina y en la cadena respiratoria, formulando la hipótesis en Enfermedad de Parkinson de que el cobre ionizado aumenta en LCR, coincidiendo con la disminución de ceruloplasmina y la actividad de ferroxidasa, cuya actividad disminuye significativamente en pacientes sin tratamiento; otra situación reportada en presencia de L-Dopa es la formación de complejos Cu-catecolamina captados por la neurona, explicando el restablecimiento del valor normal del cociente de cobre libre en pacientes tratados, así como el mantenimiento de los procesos oxidativos asociados al mismo<sup>(6,32)</sup>.

Además, existen otras interacciones del cobre con el sistema enzimático a nivel cerebral: actúa en la absorción y utilización de hierro, transporte de electrones, metabolismo de purinas y el desarrollo del SNC. Por su parte, la ferroxidasa-1 (ceruloplasmina), que contiene 65% del cobre en plasma (debido a su unión a esta proteína), inhibe las reacciones de RLO catalizadas por hierro por su capacidad para oxidar hierro ferroso ( $Fe^{2+}$ ) a hierro férrico ( $Fe^{3+}$ ), como un paso necesario para la movilización del hierro almacenado, considerándose el principal transportador de cobre del SNC, lo que le da un papel neuroprotector probablemente debido a la activación de cupro-enzimas de defensa contra hierro y RLO, demostrado también en Barcelona<sup>(31)</sup>, por lo que su función indirecta es impedir la reacción de Felton sin disminuir los intermediarios de radicales, considerándose un inhibidor de la peroxidación lipídica hierro y cobre-dependientes, además de reaccionar con radicales  $O^2$ , aunque en menor grado, representando otro antioxidante plasmático de vital importancia.

Otros elementos traza de importancia, pero con funciones antioxidantes, son sulfato de zinc y sulfuro de selenio, que se han adicionado a vitaminas antioxidantes, con el fin de prevenir enfermedades crónico-degenerativas, sin embargo con el objeto de determinar sus efectos a largo plazo como suplementos (diario, durante 2 años) sobre la inmunidad y la incidencia de infecciones en adultos >60 años hospitalizados, se realizó un estudio aleatorizado, doble ciego, controlado contra placebo en 25 centros geriátricos de Francia<sup>(33)</sup>, observándose la corrección de sus deficiencias nutricionales específicas a los 6 meses y manteniéndose durante el primer año, además de demostrarse títulos elevados de anticuerpos después de la vacunación contra Influenza, disminuyendo los cuadros de infecciones de vías respiratorias (sin beneficios en la reducción de urogenitales) y concluyendo que la suplementación con dosis bajas de zinc y selenio dan significativa mejoría al incrementar la respuesta humoral después de la vacunación, lo que tiene importancia en salud pública al reducir la morbilidad de este tipo de infecciones; sin embargo, al igual que otros estudios de múltiples variables, no se menciona la importancia de la dieta y se concluye un beneficio solo de estos elementos sin mencionar que se trata de una combinación de los mismos, demostrándose recientemente en un estudio de cohorte (con 1,063,023 adultos americanos examinados de 1982-1989), sobre mortalidad asociada a enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas y cáncer. No obstante los datos observacionales dan un apoyo limitado a la hipótesis de que su uso reduce este tipo de enfermedades.



### 2.2.3.- Antioxidantes sintéticos

a.- Superóxido dismutasa (SOD): Entre los antioxidantes internos conocidos, el más importante es el constituido por metalo-enzimas que aceleran la dismutación del radical superóxido y peróxido de hidrógeno, principalmente por SOD, así en presencia de  $H_2O_2$  actúa como peroxidante, permitiendo la integración de otros sistemas colectores de RLO, como las catalasas y peroxidasas. A nivel experimental, la SOD bovina mejora el pronóstico del corazón infartado, pero a través de la ingeniería genética se ha logrado sintetizar, por recombinación de DNA, la llamada SOD humana (rh-SOD), con átomos de cobre y zinc, y un peso molecular de 32,000 (igual a la molécula humana) con las mismas propiedades de recolectar RLO y que ha demostrado su aplicación, únicamente y con mejores resultados, a nivel Intra-articular en los procesos inflamatorios, ya que hasta el momento la aplicación intravenosa es inefectiva, por su vida media; por vía oral es completamente inefectiva.

b.- Catalasas: Con una alta capacidad de reacción y poca afinidad al sustrato, normalmente se encuentra en alta concentración en el hepatocito, eritrocito, y en mucho menor cantidad, cerebro y pulmón, observándose de manera experimental que bloquea la citotoxicidad mediada por XO; además, atenúa la leucopenia, bloquea la liberación de prostanoïdes, suprime la peroxidación lipídica y disminuye el nivel de tromboxano A2 en el choque séptico, siempre y cuando se administre antes de la infusión de la endotoxina<sup>(5)</sup>.

c.- Taurina: Es un aminoácido sulfurado, usado en infusión intravenosa en la revascularización miocárdica, que reduce los RLO y disminuye el daño mitocondrial aparentemente no tóxico.

d.- Otros antioxidantes: En este momento se encuentran en experimentación análogos de la vitamina E, ebselen, ácido-2-O-octadecil-ascórbico y  $Cu(II)2(3,5-DIPS)$ , que representan sólo una mínima parte de la lista aún en experimentación<sup>(6)</sup>.

### 2.3.- Medidas Antioxidantes

Como parte del tratamiento antioxidante debe considerarse a la prevención (como actividad de atención primaria) con el fin de disminuir ó suprimir las fuentes de RLO, como tabaco ó polución atmosférica, dejando el empleo de barredores como parte de una medida de atención secundaria, con el fin de prevenir complicaciones de las mismas enfermedades. En el enfermo crítico, existen recursos terapéuticos que además de estar encaminados a mejorar la donación de oxígeno, inducen la liberación e incremento de sustancias antioxidantes (como GSH y CAT), como inotrópicos ó estimulantes beta-adrenérgicos, además de tener acción antiinflamatoria por inhibir el desgaste respiratorio de los neutrófilos y suprimir la peroxidación lipídica.

De ahí que actualmente se encuentren a nivel experimental y clínico, una diversidad de medicamentos y sustancias con propiedades antioxidantes secundarias, sin determinarse aún su utilidad, como:

a.- Inhibidores de la xantina-oxidasa: alopurinol

b.- Inhibidores del metabolismo del ácido araquidónico ó antiinflamatorios: AAS, Indometacina, Ibuprofeno).

c.- Inhibidores de la agregación plaquetaria: Sustancias del grupo anterior y heparina; inhibidores de la tromboxano-sintetasa y bloqueadores de receptores para tromboxano.

d.- Agentes antineutrófilos: AINEs y Anticuerpos antineutrófilo

e.- Inotrópicos y cronotrópicos: Bloqueadores *alfa* y *beta*-adrenérgicos, de los canales de calcio (especialmente ramipril, verapamil, nifedipina y nicardipina, benéficos en el mecanismo de isquemia/reperfusión), y nitroglicerina.

Estas sustancias han demostrado efectos de forma indirecta, ya que se menciona que los barredores pueden disminuir la trombogenicidad relacionada a la lesión celular, siendo el dimetilsulfóxido el medicamento más representativo hasta el momento de este mecanismo (inhibidor de la ADP, adrenalina, y trombina, conocidos inductores de la agregación plaquetaria). Además, se ha demostrado que potencian algunos efectos antioxidantes; por ejemplo, N-acetilcisteína, empleada en la sobredosis de acetaminofén y tratamiento del SIRPA, ha demostrado un efecto protector con nitroglicerina, en los pacientes con cardiopatía isquémica, debido a su facultad para incrementar el sistema del glutatión. Otro ejemplo es el alopurinol, que tiene el poder de inhibir el daño oxidativo a nivel microvascular y la fuga transcapilar inducida por endotoxinas en estudios experimentales in vivo, principalmente a nivel miocárdico, mejorando la eficiencia de la bomba y concentraciones enzimáticas.

Los experimentos sobre RLO y la vía del ácido araquidónico han demostrado ventajas en el empleo de la tromboxano-sintetasa, bloqueadores de los receptores para tromboxanos, inhibidores de la agregación plaquetaria mediada por serotonina; así mismo, aspirina, ibuprofeno y prostaciclina limitan la inflamación y producción de tromboxanos indirectamente, demostrándose beneficios en su empleo, especialmente del ibuprofeno, al prevenir el daño oxidativo pulmonar y la peroxidación lipídica, probablemente a través de mecanismos que afectan la quelación del  $Fe^{2+}$  y la inhibición de la ciclooxigenasa <sup>(4,5)</sup>.

### 2.3.1.- N-acetilcisteína

Originalmente usado como agente mucolítico, precursor de glutatión en el tratamiento de la sobredosis de paracetamol, puede proteger contra efectos secundarios de agentes mutagénicos y reducir la producción celular de mediadores pro-inflamatorios, como TNF-*alfa* e IL-1<sup>(34,35)</sup>, penetra dentro de las células donde es deacetilado a L-cisteína contribuyendo con la biosíntesis de GSH, lo que mantiene su depósito intracelular jugando un papel clave en la protección celular e inhibiendo la quimiotaxis de neutrófilos y monocitos<sup>(36)</sup>.

Absorbido a nivel gastrointestinal, puede usarse sólo ó en combinación con otros antioxidantes, debido a sus propiedades de barredor de RLO a través de su grupo SH, que capta  $H_2O_2$ ,  $OH^+$  y HOCL, más evidente en neumopatías, caracterizadas por bajos niveles de glutatión y una alta producción oxidativa de células inflamatorias.

### 2.3.2.- Coenzima Q10

También llamado ubiquinol, representa junto con NADH un antioxidante necesario para la generación de ATP mitocondrial, demostrándose que barre radicales  $LOO^*$  más rápido que el *alfa*-tocoferol, aunque débilmente, y de forma similar a vitamina C, puede regenerar a la vitamina E en el ciclo redox de forma experimental.

Su administración ha demostrado mejoría de los síntomas de encefalomiopatías y en conjunto con NADH (10mg/día antes de los alimentos), en un estudio piloto, ha

demostrado beneficios en pacientes con Alzheimer en conjunto con la suplementación de selenio<sup>(27)</sup>.

### 2.3.3.- Ambroxol

El ambroxol ó [trans-4-(2 amino-3,5-di-bromo-benzil-amino)hidrocloruro-ciclo-hexano], reduce la hiperreactividad bronquial, y es sabido que estimula la producción de surfactante celular y barredor de RLO ( $\text{OH}^+$ , HOCl); además de tener propiedades antiinflamatorias propias de su efecto inhibitor sobre la producción de citosina y metabolitos del ácido araquidónico.

Actualmente sólo se han validado pruebas experimentales con concentraciones micromolares, sin embargo aún está pendiente revalorar concentraciones adecuadas in vivo en población abierta y confirmar su utilidad<sup>(34)</sup>.

### 2.3.4.- ProbucoI

Se trata de un agente hipolipemiente con propiedades antioxidantes a nivel gástrico y vascular de forma experimental.

En Japón, desde hace 2 años se ha establecido que es un barredor tanto de anión  $\text{O}^2$  como radical  $\text{OH}^+$ ; su administración oral en dosis de 250-1000 mg/ kg, previene en forma dosis dependiente, el daño inducido por etanol a la mucosa gástrica, así como el incremento de sustancias ácido-reativas tiobarbitúricas (como índice de la peroxidación lipídica a nivel gástrico). Su administración repetida (misma dosis 2 veces/ día) acelera la curación de las úlceras gástricas ácido-acético inducidas, inhibiendo el incremento de sustancias reactivas en el centro de la región ulcerada, antes de iniciar el efecto de curación ya establecido. Todo esto sugiere que el probuocol, puede parcialmente proteger a la mucosa gástrica del daño agudo y promover la curación de las úlceras crónicas por su actividad antioxidante<sup>(37)</sup>.

Recientemente en Londres (1999), se documentó su utilidad en enfermedades inflamatorias vasculares, como es el caso del fenómeno de Raynaud primario y secundario, comparando los resultados de la terapia con nifedipina (20mg/ día) y probuocol (500mg/ día) durante 12 semanas, evaluándose frecuencia y severidad de los cuadros por medio de una escala visual análoga y la medición de LDL, colesterol, triglicéridos, vitamina E y C en plasma, encontrando una reducción importante tanto en la frecuencia como severidad de los ataques en pacientes que recibieron probuocol (independientemente de la etiología), reflejando la susceptibilidad oxidativa de las LDL como un mecanismo asociado. Los cambios fueron similares tanto en Raynaud asociado a esclerosis sistémica como al no asociado, sugiriendo que el probuocol puede ser de utilidad en los casos sintomáticos, además de reducir la susceptibilidad a la oxidación de LDL y tener un beneficio adicional al modificar la enfermedad<sup>(38)</sup>.

### 2.3.5.- Desferrioxamina

Debido a que el hierro, parecer ser un promotor importante del daño oxidativo, agentes quelantes como la desferrioxamina han sido propuestos como antioxidantes, debido a que ha demostrado las siguientes acciones:

- a.- Aumenta la vida media de los neutrófilos activados
- b.- Disminuye el daño pulmonar agudo mediado por neutrófilos después de la activación del complemento.
- c.- A altas dosis es antiinflamatorio en inflamación aguda y crónica
- d.- Bloquea la acción hemolítica de varias drogas generadoras de radicales
- e.- Disminuye la muerte de hepatocitos por  $\text{H}_2\text{O}_2$
- f.- Disminuye la toxicidad por paraquat

g.- Ha reportado utilidad en el tratamiento paliativo de enfermedades neurodegenerativas y hereditarias a nivel experimental.

h.- Puede proteger contra el daño por reperfusión en isquemia cardiaca, renal y cutánea.

Sin embargo, no es ideal para el tratamiento del estrés oxidativo en humanos, y otros agentes quelantes pueden ser más prometedores, debido a que tiene mayor capacidad de penetración intracelular <sup>(6)</sup>.

### 3.- PATOGENIA Y RADICALES LIBRES DE OXIGENO.

El incremento en el estrés oxidativo puede resultar en la sobreproducción de precursores de radicales y/ ó disminución en la eficacia de sistemas inhibitorios y barredores, así como amplificación y propagación por un ciclo autocatalítico de estrés metabólico, daño tisular y muerte celular que llevan a su vez al aumento simultáneo de RLO; esto pudiera ser inferido de la cinética de formación y acumulación de productos oxidativos en tejidos, plasma y orina. Sin embargo, su detección no es suficiente para implicar al estrés oxidativo en una patología, a menos de que el daño pueda ser lógica y cuantitativamente relacionado al desarrollo de ésta y demostrar que su inhibición previene ó retarda el proceso de la misma, aumentando cada vez más la cantidad de reportes que implican a los radicales en una diversidad de patologías<sup>(39)</sup>.

La porfiria cutánea tarda y la hemocromatosis son considerados como modelos humanos del daño celular oxidativo<sup>(40)</sup>. Para definir el papel pro-oxidante de hierro y porfirina, en sus diferentes formas moleculares y sus efectos sobre los sistemas antioxidantes, en Italia se evaluó a 17 pacientes con porfiria cutánea tarda y 14 con hemocromatosis primaria y secundaria, determinándose retinol plasmático, tocoferol, alfa y beta caroteno, ácido ascórbico, glutatión, malondialdehído y hierro libre en eritrocitos, reportando una reducción significativa de retinol, alfa, beta caroteno y glutatión (mayor en porfiria cutánea), confirmando que los efectos pro-oxidantes de las porfirinas in vivo son mayores a través de la inducción de las formas de hierro tóxico libre; además de confirmar que el envejecimiento es una influencia negativa en términos de todos los casos del balance pro- /antioxidantes, particularmente en los casos de hemocromatosis.

Otro ejemplo de esto es el reporte en Turquía sobre la relación de RLO y psoriasis, en 34 pacientes con enfermedad moderada y severa, evidenciando niveles de glutatión y su actividad, significativamente menores ( $P < 0.001$ ), mientras que los niveles de beta caroteno en plasma y malondialdehído en eritrocitos fueron mayores significativamente ( $p < 0.01$ ,  $p < 0.001$ ), como parte de la evidencia del papel potencial del estado redox y antioxidante en esta patología <sup>(41)</sup>.

En el caso de la enfermedad de Wilson también existen reportes en relación con el estado antioxidante y su relación con RLO<sup>(42)</sup>, donde se ha valorado la contribución de reacciones mediadas por cobre libre (no unido a ceruloplasmina), en el desarrollo de sus complicaciones, principalmente a nivel hepático asociado ó no con anemia hemolítica, comparado con sujetos sanos y pacientes que reciben tratamiento a base de penicilamina, reportando que los niveles de ascorbato y urato plasmático se encuentran disminuidos significativamente antes del tratamiento y demostrando que alantoína (producto de la oxidación de ácido úrico) se encuentra elevada de forma desproporcional, lo que pudiera representar un marcador de la generación de los radicales in vivo.

A pesar de que los casos mencionados representan enfermedades con una incidencia mundial ligeramente menor en comparación con otras de mayor interés, las

g.- Ha reportado utilidad en el tratamiento paliativo de enfermedades neurodegenerativas y hereditarias a nivel experimental.

h.- Puede proteger contra el daño por reperfusión en isquemia cardiaca, renal y cutánea.

Sin embargo, no es ideal para el tratamiento del estrés oxidativo en humanos, y otros agentes quelantes pueden ser más prometedores, debido a que tiene mayor capacidad de penetración intracelular<sup>(6)</sup>.

### 3.- PATOGENIA Y RADICALES LIBRES DE OXIGENO.

El incremento en el estrés oxidativo puede resultar en la sobreproducción de precursores de radicales y/ ó disminución en la eficacia de sistemas inhibitorios y barredores, así como amplificación y propagación por un ciclo autocatalítico de estrés metabólico, daño tisular y muerte celular que llevan a su vez al aumento simultáneo de RLO; esto pudiera ser inferido de la cinética de formación y acumulación de productos oxidativos en tejidos, plasma y orina. Sin embargo, su detección no es suficiente para implicar al estrés oxidativo en una patología, a menos de que el daño pueda ser lógica y cuantitativamente relacionado al desarrollo de ésta y demostrar que su inhibición previene ó retarda el proceso de la misma, aumentando cada vez más la cantidad de reportes que implican a los radicales en una diversidad de patologías<sup>(39)</sup>.

La porfiria cutánea tarda y la hemocromatosis son considerados como modelos humanos del daño celular oxidativo<sup>(40)</sup>. Para definir el papel pro-oxidante de hierro y porfirina, en sus diferentes formas moleculares y sus efectos sobre los sistemas antioxidantes, en Italia se evaluó a 17 pacientes con porfiria cutánea tarda y 14 con hemocromatosis primaria y secundaria, determinándose retinol plasmático, tocoferol, alfa y beta caroteno, ácido ascórbico, glutatión, malondialdehído y hierro libre en eritrocitos, reportando una reducción significativa de retinol, alfa, beta caroteno y glutatión (mayor en porfiria cutánea), confirmando que los efectos pro-oxidantes de las porfirinas in vivo son mayores a través de la inducción de las formas de hierro tóxico libre; además de confirmar que el envejecimiento es una influencia negativa en términos de todos los casos del balance pro- /antioxidantes, particularmente en los casos de hemocromatosis.

Otro ejemplo de esto es el reporte en Turquía sobre la relación de RLO y psoriasis, en 34 pacientes con enfermedad moderada y severa, evidenciando niveles de glutatión y su actividad, significativamente menores ( $P < 0.001$ ), mientras que los niveles de beta caroteno en plasma y malondialdehído en eritrocitos fueron mayores significativamente ( $p < 0.01$ ,  $p < 0.001$ ), como parte de la evidencia del papel potencial del estado redox y antioxidante en esta patología<sup>(41)</sup>.

En el caso de la enfermedad de Wilson también existen reportes en relación con el estado antioxidante y su relación con RLO<sup>(42)</sup>, donde se ha valorado la contribución de reacciones mediadas por cobre libre (no unido a ceruloplasmina), en el desarrollo de sus complicaciones, principalmente a nivel hepático asociado ó no con anemia hemolítica, comparado con sujetos sanos y pacientes que reciben tratamiento a base de penicilamina, reportando que los niveles de ascorbato y urato plasmático se encuentran disminuidos significativamente antes del tratamiento y demostrando que alantoina (producto de la oxidación de ácido úrico) se encuentra elevada de forma desproporcional, lo que pudiera representar un marcador de la generación de los radicales in vivo.

A pesar de que los casos mencionados representan enfermedades con una incidencia mundial ligeramente menor en comparación con otras de mayor interés, las

áreas afectadas por RLO son diversas, permitiendo su estudio de una manera más amplia, mencionando entre los sitios de mayor relevancia miocardio, sistema reticulo-endotelial y células inflamatorias en general, pero es el estudio del cáncer el que mayor cantidad de información al respecto ha generado, sugiriendo que puede tratarse de una alternativa terapéutica (en cualquiera de sus versiones), como explicaremos a continuación <sup>(4)</sup>.

### 3.1.- Cáncer

El posible papel de las vitaminas antioxidantes en la prevención del cáncer, ha sido el foco de atención de diversas investigaciones en años recientes. Una gran variedad de neoplasias son causadas por radiación y carcinógenos exógenos en el aire, la dieta y el flujo incrementado de RLO con la pérdida de la homeostasis óxido-reducción celular; aunque la mayoría de los carcinógenos operan por mecanismos comunes, la importancia de cada uno radica en el órgano blanco y susceptibilidad genética individual, propiedades cruciales para causar cambios estructurales permanentes en el DNA (mutaciones puntuales, deleciones, inserciones, reordenamientos y amplificación), para activar las vías de transducción citoplasmática y nuclear, y modular la actividad de proteínas y genes de estrés que regulan genes efectores relacionados con crecimiento, diferenciación y muerte celular, y los RLO poseen todas estas propiedades<sup>(43)</sup>.

#### Mecanismos de daño por RLO

Para causar cambios genéticos permanentes, los radicales libres activan vías de transducción citoplasmática relacionadas con crecimiento, diferenciación y muerte celular, mimetizando la acción de factores proteicos asociados a estos procesos. La movilización de calcio en mitocondrias y retículo endoplásmico hacia el espacio extracelular, es el evento más temprano después de la exposición a los RLO<sup>(43)</sup>. Los cambios consecutivos, en la actividad de cinasas y fosfatasas, traducen la señal inicial a la familia de los factores de transcripción, que representan el inicio de todo el proceso y de alguna forma el estrés oxidativo producirá directamente alteración en la actividad de ellos; por ejemplo, el factor *kappa*-B nuclear es separado de su subunidad inhibitoria posterior a la exposición a radicales, TNF-*alfa* ó IL-1 y oncoproteínas Fos y Jun, siendo reducido a residuos de cisteína en posiciones estratégicas, para la dimerización y la actividad transcripcional total, aumentando la síntesis de factores relacionados y la transactivación de subfamilias de genes efectores (como colagenasa, metalotioneína II-A y ciertas repeticiones virales terminales). La activación de estos circuitos de por los RLO es la que puede participar en la promoción tumoral y su progresión.

Aunque el disparador de esta cascada de eventos se localiza comúnmente en la membrana celular, otras vías pueden ser activadas por daño al DNA, especialmente en los sitios de rompimiento de la doble cadena, favoreciendo una restricción enzimática que resulta en acumulación de P<sub>53</sub>, que por sí sólo servirá como un disparador en la carcinogénesis, ya que al acumularse se detienen las fases G<sub>2</sub>/S del ciclo celular (que permiten reparar las lesiones del DNA antes de la replicación). El daño oxidativo puede alterar directamente P<sub>53</sub> y mutarlo. Recientemente en España se propuso que la generación del estrés oxidativo en respuesta a varios estímulos esta implicada en la activación de todos estos factores y es un disparador de la apoptosis<sup>(44)</sup>, principalmente en la iniciación del proceso ó la activación de varios proto-oncogenes y/ o inactivación de algunos genes supresor-tumoral, considerando que la regulación génica por medio de oxidantes, antioxidantes y el estado redox permanece como una terapéutica prometedora.

Neoplasias asociadas al Estrés Oxidativo.

Los radicales implicados con mayor frecuencia en la iniciación y promoción del proceso de carcinogénesis son anión superóxido,  $H_2O_2$  y  $OH^+$ , lo que sugiere que los antioxidantes podrían brindar protección ante este tipo de patología.

En el caso del Carcinoma cervical<sup>(45)</sup>, Ahmed y cols en el Cairo, reportaron en diciembre de 1999, valores séricos de vitamina C, E y glutatión en mujeres con carcinoma, encontrando una marcada reducción en su contenido; la actividad de la GSH-pex y SOD también estaban reducidas ( $p < 0.001$ ), siendo más marcada en estadios tardíos (III, IV) en comparación con los tempranos (I, II;  $p < 0.001$ ). El glutatión estaba más reducido en casos de tumores poco diferenciados (grado III), en comparación con moderadamente ó bien diferenciados (grado I y II;  $p < 0.05$ ). Los niveles de peróxidos de lípidos fueron significativamente mayores en tejido maligno más que normal y sus niveles se correlacionaron con un estadio clínico avanzado ( $p < 0.001$ ). Todo esto sugiere un deterioro en el estado antioxidante en el carcinoma de cervix y se relaciona con su progresión.

Previamente, elucidando un mecanismo molecular de la acción preventiva de *beta*-caroteno en la carcinogénesis cervical, en 1995 se publicó un estudio realizado por investigadores japoneses, donde se adicionó *beta*-caroteno liposomal a medios de cultivo con líneas celulares de displasia cervical humana, derivadas de neoplasias intraepiteliales cervicales ó NIC I, II y III, induciendo un retardo significativo en el crecimiento de todas ellas, reduciendo la internalización y unión a receptores de crecimiento epidérmico, permaneciendo este efecto hasta por 3 días posterior al tratamiento, encontrando una substancial reducción al 7º día del mismo, concluyendo que la prevención de la carcinogénesis es debida a la inducción de la apoptosis de células displásicas por medio de la subregulación del receptor del factor de crecimiento epidérmico<sup>(46)</sup>.

El carcinoma basocelular (4 veces más frecuente en hombres, raramente metastásico, pero con una morbilidad sustancialmente asociada con altos costos para los cuidados de salud), también se ha relacionado con el estrés oxidativo, debido al envejecimiento y mayor exposición a la radiación ultravioleta (UV) debido a la depleción de la capa de ozono; otros factores, incluyendo la dieta (alto contenido de grasas totales y bajo consumo de *beta*-caroteno, retinol, vitamina E, C, D y ácidos grasos de 3 carbonos también asociado con el aumento en la incidencia de carcinoma de células escamosas en estudios animales), influyen en su desarrollo, sin existir datos concluyentes de esto. En un estudio de casos-control con carcinoma basocelular un aparente efecto protector del uso de multivitamínicos fue observado<sup>(47)</sup>, pero un estudio prospectivo previo con un seguimiento a 4 años (*Nurses Health Study* ó NHS), reportó contradictoriamente que el consumo de grasas, vitamina A, C, D ó E no se asociaba con su incidencia, aunque el estudio incluía únicamente mujeres. Este año, esa misma hipótesis fue evaluada en un estudio prospectivo en Estados Unidos, en hombres con un seguimiento a 8 años, utilizando a la población del *Professionals Health Study* (PHS con 51,529 profesionales de la salud, varones, que completaron un cuestionario sobre los factores de riesgo para cáncer y otras enfermedades crónicas de interés), reportándose carcinoma basocelular en 84% de ellos y encontrando que el consumo elevado de folatos, vitamina C, E y carotenos está positivamente asociado con carcinoma (además de ser más comunes en regiones con un alto índice de radiación solar), esto es, el seguimiento a 8 años no apoyó la hipótesis inicial, no demostró efecto protector del retinol, carotenos ó vitaminas C, D y E, y no se asoció con las concentraciones séricas de los mismos<sup>(48)</sup>.

En el caso del cáncer de mama se han publicado resultados consistentes con el riesgo y consumo de carotenoides inespecíficos<sup>(49)</sup>; parte del NHS analizó la frecuencia en el consumo de frutas y vegetales en una cohorte de 83,234 mujeres por medio de un cuestionario de frecuencias en un seguimiento a 14 años, identificando 2,697

casos, con una proporción considerable de mujeres premenopáusicas (784 pacientes), en quienes se reportó que el consumo de *beta*-caroteno en alimentos y suplementos, luteína, zeaxantina y vitamina A se asocia de forma inversa con el riesgo del cáncer de mama durante la etapa premenopáusica, sugiriendo que el consumo de frutas y vegetales con alto contenido de carotenoides y vitaminas reduce su incidencia. De forma similar se reportó en Holanda<sup>(50)</sup> con el carcinoma gástrico, en el *Netherlands Cohort Study* (NCS), iniciado en 1986 y reclutando 120,852 hombres y mujeres entre 55-69 años, a través de un cuestionario de frecuencias por un período de 6.3 años del consumo de fibra, vitaminas y carotenoides dietéticos, reportando una incidencia de 282 casos y una asociación inversa con su consumo ( $p=0.6$ ), pero principalmente con el uso de retinol y *beta*-carotenos que se asociaron positivamente con el riesgo de carcinoma ( $RR=1.6$ ), atribuyéndose a los suplementos a base de vitamina A un papel protector de, aunque la asociación no se estableció de forma concluyente.

Para el cáncer pulmonar la información es diversa y extremadamente amplia, pero a la vez contradictoria, resultando ser el tipo de cáncer en el cual, debido a su epidemiología, se han estudiado una gran cantidad de antioxidantes (desde los naturales hasta sintéticos de la manera más sofisticada); un ejemplo de ello, es el reporte reciente en Holanda (como parte del NCS) del análisis de 58,279 hombres estimando que el consumo de luteína, zeaxantina, *beta*-criptoxantina, folato y vitamina C tiene un efecto protector para este tipo de pacientes, pero después de realizar algunos ajustes al análisis, se reportaron diferencias entre su especificidad: folato y vitamina C para carcinoma de células pequeñas, carcinoma de células escamosas y adenocarcinoma, limitando el beneficio de los carotenoides a los dos primeros y demostrando que vitamina E no se asocia a la disminución del riesgo<sup>(51)</sup>.

Estudios similares para otros tipos de cáncer también han sido reportados recientemente enfatizando la relación del consumo de vitaminas antioxidantes en la dieta, más que los suplementos, demostrándose únicamente asociación de los mecanismos oxidativos en su incidencia.

### Terapéutica empleada:

En 1996, los estudios epidemiológicos notaron un bajo riesgo de cáncer entre personas cuyas dietas incluían una gran cantidad de vegetales y frutas; una explicación a nivel científico y para el público en general, fue que las vitaminas antioxidantes en vegetales y frutas previenen la carcinogénesis, por interferencia pasiva con el daño oxidativo al DNA. *Beta*-caroteno recibió particular interés como antioxidante preventivo de numerosas enfermedades en diversos reportes científicos, principalmente estudios animales, sugiriendo que puede prevenir el daño al DNA y quizás retardar la iniciación de la carcinogénesis, pero existiendo muy poca evidencia de que suprime su progresión después de la exposición al carcinógeno<sup>(23)</sup>, incluso 2 estudios de casos no encontraron ningún efecto protector y uno a mayor escala sugirió que incrementa la mortalidad de cáncer pulmonar, lo que ha mantenido la constante expectativa al respecto.

El estudio que sugirió esta última situación es el *Alpha-Tocopherol Beta-carotene Cancer Prevention Study* (ATBC)<sup>(52)</sup> un aleatorizado, doble ciego, controlado contra placebo, en prevención primaria, realizado para determinar si la suplementación con *alfa*-tocoferol (50mg/ día), *beta*-caroteno (20mg/ día), ambos o ninguno, reduciría la incidencia del cáncer pulmonar en fumadores (29,133 participantes, con un promedio de 20.4 cigarrillos diarios por un lapso de 35.9 años, asignados a 4 grupos de estudio, en 14 regiones del suroeste de Finlandia), proyecto conjunto del *Instituto Nacional de Cáncer* de Estados Unidos y el de salud pública finlandés, con un seguimiento continuo de 5-8 años, sin encontrarse diferencias entre los factores de riesgo al inicio y final del estudio; se reportó la falta de evidencia de una interacción entre los 2 suplementos sobre cáncer pulmonar y sus primeros casos



se observaron a los 18 meses de iniciado el estudio, con una mortalidad aparentemente mayor en el grupo que recibía *beta*-caroteno ( $>8\%$   $p=0.02$ ), así como una mayor incidencia de cáncer de próstata y estómago, en comparación con el grupo que recibía tocoferol que reportó menor incidencia de cáncer colorectal y próstata, pero mayor incidencia de cáncer de vesícula, estómago y otros sitios. Se concluyó entonces, que no existen evidencias sobre los efectos benéficos en términos de prevención del cáncer pulmonar y que la dosis de 20mg/ día de *beta*-caroteno por un periodo aproximado de 6 años, no confiere protección a fumadores (incluso existiendo la posibilidad elevada de que sea dañino en ellos).

Otro estudio que intentó determinar sus beneficios es el PHS: comparativo contra placebo, reportado a 12 años, con el seguimiento a 12 años de 22,071 médicos varones de 40-84 años de edad, sin historia de cáncer ó cardiopatías en Estados Unidos<sup>(53)</sup>, inicialmente para probar aspirina (325mg en días alternos) y *beta*-caroteno (50mg en días alternos) como medidas de prevención del cáncer y enfermedades cardiovasculares en 4 grupos, sin encontrar beneficio ó daño estadísticamente significativo para *beta*-caroteno respecto al cáncer cerebral, pulmonar, de colon, recto, próstata, estómago, melanoma, leucemia ó linfoma, y aunque se reportó mayor incidencia de cáncer de vesícula y tiroides en el grupo con agente activo, no existió diferencia estadística. Este estudio en sujetos aparentemente sanos, bien nutridos, no demuestra beneficio en términos de prevención de neoplasias malignas, lo que no es consistente con resultados de estudios observacionales, aunque en estos últimos se ha sugiere que son vegetales y frutas ricas en *beta*-carotenos los que previenen el cáncer pulmonar en fumadores y no los suplementos.

Por si esto fuera poco un estudio más, que analiza de forma específica a caroteno, *Beta Carotene and Retinol Efficacy Trial* (CARET)<sup>(54)</sup>, organizado en 1983 e iniciado en Seattle en 1985 en forma aleatorizada, para probar que *beta*-caroteno y vitamina A, por sus acciones antioxidantes complementarias y promoción de la diferenciación, y posiblemente efectos protectores a nivel inmunológico, reducían la incidencia del cáncer pulmonar en poblaciones con alto riesgo. En este caso, se realizaron 2 estudios piloto; un grupo con exposición sustancial al asbesto, corroborada radiológicamente ó por antecedentes y tratados con 15mg/día de *beta*-caroteno, 25,000 UI/día de retinol, recibiendo el tratamiento activo ó placebo; el otro reclutó con historia de tabaquismo intenso, recibió 30mg/día de *beta*-caroteno, 25,000 UI/día de retinol, ambos ó ninguno de ellos. Después de 5 años, se comprobaron los niveles séricos mayores de ambas vitaminas en los grupos de estudio ( $p < 0.01$ ), reportando un 2% de casos nuevos de cáncer pulmonar durante el seguimiento, con un RR=1.28 en el grupo con tratamiento activo (95% de IC 1.04-1.57;  $p = 0.02$ ), con un 28% de mayor incidencia, no apoyando el efecto benéfico de ambas vitaminas y confirmando los datos del ATBC, sin distinguir los efectos del *beta* caroteno de los de vitamina A, debido a que fueron administrados de forma conjunta, bajo la hipótesis de que tenían un efecto complementario, que tampoco se confirmó.

Finalmente, otro estudio aleatorizado a gran escala, llevado a cabo en Lixian, China, *Chinese Cancer Prevention Trial*<sup>(47)</sup>, durante poco más de 5 años de seguimiento, evaluó la suplementación diaria con 15mg de *beta* caroteno, 50mcg de selenio y 30mg de *alfa*-tocoferol, comparado con otras 3 combinaciones de vitaminas y minerales (9 elementos totales: retinol, zinc, riboflavina, niacina, vitamina C, molibdeno, *beta* caroteno, vitamina E y selenio), en 29,584 adultos residentes de 4 comunidades al norte y centro de China, presumiblemente deficientes en ellos (siendo una de las regiones con la tasa más alta del mundo de cáncer esofágico y gástrico, donde el consumo de micronutrientes es muy bajo). Los resultados demostraron que la mortalidad por cáncer gástrico disminuyó en un 11%, pero los nutrientes fueron estudiados en conjunto y es imposible distinguir las contribuciones reales del *beta*-caroteno, vitamina E y selenio, demostrando únicamente que una ingesta adecuada de vitaminas y minerales es efectivo en este tipo de padecimientos<sup>(55)</sup>.

Al comparar los 4 estudios anteriores, aún con poblaciones completamente diferentes, se encuentra el reporte de RR para cáncer pulmonar similares<sup>(54)</sup> (ATBC 1.18 entre quienes recibieron beta caroteno, con y sin tocoferol, PHS 0.93, CARET 1.28 y Lixian sin reporte específico del mismo), por lo que es claro que debe existir muy poco entusiasmo acerca de la eficacia ó seguridad de *beta*-carotenos ó vitamina A para reducir la incidencia de cáncer en ciertas poblaciones, aunque todavía sea recomendable el consumo dietético de frutas y vegetales. De hecho desde 1981 se informó que más del 35% de las neoplasias malignas podrían relacionarse a los hábitos dietéticos, lo que se fundamenta también, con el uso de tabaco y alcohol, dos de las variables más importantes en la patogenia de la enfermedad y responsables del 30 y 3% de todos los cánceres respectivamente, por lo que aún el más plausible y pequeño beneficio de las vitaminas antioxidantes (con una reducción del riesgo del 20-30%), puede tener un enorme impacto en la salud pública.

Se ha postulado que *beta*-caroteno, vitamina C y E son de los constituyentes en la dieta que previenen el cáncer, demostrando una relación inversa entre su consumo dietético, sus niveles séricos y el riesgo de contraerlo; sin embargo, las diferencias geográficas en su incidencia pueden explicar las variaciones regionales en el consumo identificándolos como un mecanismo quimioprotector por su habilidad para atrapar y/ o desactivar RLO<sup>(56)</sup>, incluso *beta*-caroteno podría no ser el componente activo en frutas y vegetales, inhibidor del cáncer e identificado como protector en estudios observacionales y su consumo podría ser solamente un marcador del estilo de vida que protege contra el mismo. Hennekens, en Massachussets, publicó en 1994 un compendio de estudios que demostraron evidencias compatibles con posibles beneficios, pero los datos no son consistentes debido a que esta serie de estudios comparan sólo subgrupos extremos para tales características dietéticas, ignorando muchas otras variables relevantes, tales como las carnes rojas, actividad física, situaciones de vida y otras conductas<sup>(52,53,54)</sup>.

Por esta razón, la *American Health Foundation* en Estados Unidos, reportó que el consumo diario de 5-10 vegetales y frutas, jugos de frutas, vino tinto y té, son una fuente rica de estos micronutrientes, con propiedades antioxidantes (los tomates contienen licopene, antioxidante estable activo, y muchos vegetales contienen quercetina y compuestos polifenólicos relacionados, el té es una fuente de galato de epigallocatequina y el vino tinto contiene resveratrol); de hecho, el cáncer gástrico se desarrolla con el consumo de alimentos salados y encurtidos que facilitan la activación de carcinógenos, y su formación es inhibida por vitaminas C y E de la dieta, el cáncer de colon, mama, próstata y páncreas pueden ser causados por una nueva clase de carcinógenos (aminas heterocíclicas) formados durante la cocción (asando ó friendo), de alimentos con alto contenido de creatinina (incluyendo pescado y carnes), que de igual forma, pueden ser inhibidas por antioxidantes como vitamina C, té y soya, elementos de una dieta sana<sup>(57)</sup>.

Ahora bien, aunque el tema de la prevención del cáncer resulta fundamental, la posibilidad de usar vitaminas antioxidantes en su tratamiento (durante y posterior a quimio- y radioterapia), también ha sido planteada, existiendo controversias en cuanto a sus indicaciones y contraindicaciones; se reportó por la *Clínica Tahoma* de Estados Unidos en 1999, que los antioxidantes pueden reducir el daño creado por los RLO en radioterapia y algunas forma de quimioterapia, demostrando que sólo existe un efecto benéfico en este tipo de terapias y existiendo datos que apoyan la teoría de la disminución de los efectos adversos de las quimioterapias con su uso<sup>(56)</sup>.

### 3.2.- Enfermedades cardiovasculares

#### 3.2.1.- Hipertensión arterial

##### Mecanismos de daño por RLO

El origen del estrés oxidativo en humanos hipertensos ha sido de interés debido a los datos que indican que la vía de la cicloxigenasa es la principal fuente de RLO, ya que estudios previos han demostrado que este mecanismo induce disfunción endotelial en estos pacientes (la indometacina puede incrementar la respuesta a la acetilcolina en hipertensos).

La hipertensión esencial está asociada con deterioro de la vasodilatación dependiente del endotelio, ya que juega un papel primario en la modulación del tono vascular. El mayor factor relajante derivado del endotelio (FRDE) es el óxido nítrico (NO), derivado de L-arginina por medio de la óxido nítrico sintetasa, la cual puede ser específicamente inhibida por análogos de L-arginina; sin embargo, el endotelio puede producir otros FRDE, principalmente prostanoides dependientes de la ciclooxygenasa (tromboxano A<sub>2</sub>, PGH<sub>2</sub>) e incluso anión superóxido, uno de los RLO más importantes a este nivel y también producido por XO; es un potente inactivador químico del NO, lo que sugiere que la disfunción endotelial en la hipertensión podría estar determinada por el aumento en la producción de este radical, que deteriora la habilidad del endotelio para inducir relajaciones mediadas por NO en células musculares lisas subyacentes, lo que clasifica al anión O<sup>2</sup> como un FRDE.

Este elemento en la fisiopatología de la hipertensión experimental se demostró en humanos en un estudio comparativo donde se realizaron mediciones y modificaciones en la presión arterial a través de acetilcolina, nitroprusiato de sodio e infusión de vitamina C (2.4mg/dl/min), demostrando que en pacientes hipertensos la vitamina C mejora la vasodilatación (p<0.01), por su efecto barredor específico dentro de la vasculatura, sin observarse ese mismo efecto en sanos, confirmando la hipótesis de que el O<sup>2</sup> es un factor en la disfunción endotelial en humanos<sup>(58)</sup>.

En Irlanda se agregó otra evidencia acerca de su actividad a través de la medición de los niveles plasmáticos de malondialdehído y la estimación del estado antioxidante con la medición de ácido ascórbico plasmático y *alfa*-tocoferol asociado a lípidos en plasma y a nivel eritrocitario (que puede reflejar la protección a nivel de membranas celulares) en pacientes hipertensos, demostrándose que existen niveles plasmáticos mayores de malondialdehído (p<0.001) y significativamente menor de ácido ascórbico (p<0.01), además de que la concentración de *alfa*-tocoferol eritrocitario fue significativamente menor (p<0.001), aunque los niveles plasmáticos son similares en sujetos sanos, sugiriendo que en la hipertensión esencial existe incremento en la peroxidación y reducción en la protección antioxidante contribuyendo al desarrollo de aterosclerosis<sup>(59)</sup>.

##### Medidas experimentales de tratamiento

Se ha sugerido en algunos reportes que el tratamiento con antioxidantes como SOD ó el inhibidor de XO, oxipurinol, disminuyen la presión arterial a nivel experimental, así como en humanos.

Los estudios experimentales sugieren que el incremento en la producción de RLO forma parte de la etiología y los estudios epidemiológicos, que el consumo dietético de ácido ascórbico se correlaciona inversamente con hipertensión y sus secuelas; así, en un comparativo, doble ciego, controlado contra placebo, aleatorizado se ha demostrado que el tratamiento con ácido ascórbico (500mg/día durante 30 días) disminuye la presión arterial, siempre que se haya excluido cualquier causa de hipertensión secundaria y descontrol hipertensivo, además de continuar tratamiento

antihipertensivo específico, demostrando que el tratamiento disminuye la presión sistólica ( $p < 0.001$ ), a diferencia de la diastólica, además de disminuir la presión arterial media (PAM) de 110 a 100 mmHg ( $p < 0.001$ ), sin modificar la frecuencia cardíaca y sus concentraciones plasmáticas. Incrementan dentro de rangos fisiológicos desde las primeras horas de su administración con una correlación inversa con los cambios en la PAM, sugiriendo que no existe activación neurohormonal para conseguir este efecto y concluyendo que, la administración a largo plazo con este antioxidante disminuye la presión sistólica en hipertensos de forma similar a lo demostrado por estudios poblacionales previos, aunque el mecanismo por el cual reduce la presión permanece indeterminado (aún cuando se ha sugerido que a nivel intrarterial a dosis altas disminuye la disfunción endotelial)<sup>(60)</sup>.

Este año se confirmó parcialmente el efecto de suplementos orales de vitamina C, a la misma dosis durante 3 meses continuos, sobre la presión arterial ambulatoria y los lípidos plasmáticos, en un estudio cruzado, doble ciego, aleatorizado controlado contra placebo, en adultos de 60-80 años de edad, demostrando una pequeña pero significativa caída de la presión sistólica ( $2 \pm 5.2$  mmHg; IC 95% 0-3.9 mmHg), no así en la diastólica, incrementándose la diferencia al realizar el análisis de regresión y los cambios en el nivel de HDL sólo se asociaron con el sexo, ya que incrementan en mujeres ( $p = 0.007$ ), sin cambios en LDL, concluyendo que en adultos mayores, altos consumos de ácido ascórbico tienen pequeños efectos sobre la presión sistólica, lo que podría contribuir a la reportada asociación entre su consumo y disminución del riesgo de enfermedades cardiovasculares y eventos vasculares cerebrales<sup>(61)</sup>.

### 3.2.2.- Aterosclerosis

La premisa de que el estrés oxidativo juega un importante papel en la aterogénesis, implica que el desarrollo y progresión de ella, pueda ser inhibida por antioxidantes, y en la inhibición de la oxidación de LDL y de la adhesión leucocitaria en la disfunción endotelial vascular sobre todo, el ascorbato parece ser más efectivo que *alfa*-tocoferol por sus habilidades para barrer efectivamente una amplia variedad de RLO, especies nitrogenadas y regenerar *alfa* tocoferol, con actividad prooxidante, que también puede ser prevenida por el ascorbato actuando como co-antioxidante<sup>(62)</sup>.

#### Mecanismos de daño por RLO

La oxidación de LDL, representa el factor de riesgo más importante para el proceso inicial de aterosclerosis y cardiopatías, y las evidencias recientes indican que LDL en su forma nativa no es la principal responsable de este proceso ya que deberá ser oxidada antes de ser potencialmente aterogénica. El primer paso en su oxidación es la peroxidación lipídica, que lleva a la formación de hidroperóxidos de fosfolípidos y un sin número de sustancias reactivas, los cuales de forma subsecuente pueden modificar la apolipoproteína B; esto llevará a la formación de LDL modificada y reconocida por los llamados receptores de barredores (*scavenger receptors*) en macrófagos, que capturan LDL modificadas en forma subregulada, esto es, no sujetas a cambios en el contenido plasmático de colesterol intracelular. Así, los macrófagos acumulan grandes cantidades de LDL oxidada y eventualmente son convertidos en células espumosas, que representan el marco de las placas ateroscleróticas adheridas a la pared.

Además, LDL oxidada tiene un sin número de efectos que pueden contribuir a la aterosclerosis: estimulación de la adhesión de monocitos al endotelio, inhibición de la vasodilatación y citotoxicidad; sin embargo, la mayor implicación de la hipótesis oxidativa en la aterosclerosis, es que los antioxidantes podrían inhibir la modificación

de LDL y por lo tanto, prevenir ó disminuir la progresión de la misma, determinándose una serie de eventos en el sistema antioxidante que lleva a esta afirmación.

La primera línea de defensa plasmática en estas condiciones es la vitamina C, la cual es oxidada en los primeros 60 minutos del proceso de aterosclerosis experimental, con lo que se ha demostrado que el mecanismo de protección antioxidante natural es el siguiente: antes de que LDL se exponga a condiciones oxidativas, son removidas de toda la superficie lipoproteica, moléculas antioxidantes hidrosolubles del plasma (incluyendo vitamina C), concluyendo que cuando el ascorbato se agrega, efectivamente protege a LDL del estrés oxidativo; en el caso de los antioxidantes liposolubles, existe un sin número de ellas y vitamina E es el más importante (presente en un nivel aproximado de 6-7 moléculas/ partícula, a diferencia de 0.2-0.5 moléculas/ partículas de *beta*-caroteno, determinando una secuencia distinta de consumo antioxidante); primero, CoQ<sub>10</sub> es consumido, seguido de *alfa*- y *gama*-tocoferol, luteína, licopene y otros *beta*-caroteno, por lo que vitamina E resulta sacrificada, al donar átomos H<sup>+</sup>, interrumpiendo en las membranas la cadena oxidativa<sup>(11)</sup>.

#### Medidas experimentales de tratamiento:

Previamente se ha demostrado que *alfa*-tocoferol tiene la mayor cantidad de mecanismos antiaterogénicos, entre los que se menciona la promoción e interacción de co-antioxidantes (incluyendo ubiquinol, ascorbato, bilirrubina unida a albúmina y el ácido 3-hidroxiantralínico ó 3HAA, metabolito del triptófano), y su habilidad para atrapar radicales LOO\*, señalando que la prevención de la oxidación depende de la rapidez de destrucción ó eliminación del radical tocoferoxil, implicando una inhibición más eficiente en estadios iniciales, esto es: LDL contiene pequeñas cantidades de ubiquinol (primer antioxidante consumido durante el proceso aterogénico, cuando LDL se expone a radicales LOO\*, metales de transición, hipoclorito, <sup>1</sup>O<sub>2</sub>, NO y peroxinitrico, neutrófilos humanos activados, monocitos no estimulados y macrófagos) demostrándose que después de 4-5 días de suplementación con este tipo de antioxidante, sus concentraciones plasmáticas aumentan hasta 4 veces el valor normal; ascorbato en cambio, inhibe la peroxidación sinérgicamente con vitamina E, deteniendo su consumo; bilirrubina unida fisiológicamente a albúmina (para su transporte), barre de forma eficiente los radicales, inhibiendo la formación de CEOOH (éster colesterol de hidroxiperóxidos), con la concomitante regeneración del *alfa*-tocoferol; finalmente, 3HAA producido por monocitos humanos y macrófagos activados por el interferón-*gama* a partir del triptófano a través de la vía de la quinurenina, inhibe la oxidación mediada por LOO\* y cobre y reduce al tocoferil directamente. Además, catecoles como adrenalina y 2-hidroxiestradiol pueden ser eficientes co-antioxidantes en forma experimental<sup>(63)</sup>.

Se ha propuesto entonces que, un consumo de vitamina C ó un estado antioxidante óptimo puede proteger contra la aterosclerosis y sus secuelas, mientras que la vitamina E puede ser efectiva en combinación con ésta, como se reportó inicialmente por el *Atherosclerosis Risk in Communities Study* (ARIC, estudio prospectivo, con una cohorte de 15,792 adultos de 45-64 años de edad, de 4 comunidades de Estados Unidos, de 1986-1989, a través de un cuestionario de frecuencias de alimentos y ultrasonido en modo B de segmentos múltiples de arteria carótida, con la finalidad de evaluar la relación entre consumo de antioxidantes dietéticos y el engrosamiento de las paredes arteriales, que representa una medida objetiva de aterosclerosis incipiente y asintomática) y aunque se demostró parcialmente que su consumo combinado está inversamente asociado con el engrosamiento de la pared arterial, se reportan diferencias entre ambos sexos y *beta*-caroteno se asocia únicamente en hombres mayores, demostrando de forma autocrítica diversos sesgos en su realización<sup>(64)</sup>. No obstante sus errores en el diseño,

más tarde se publicó un análisis similar del mismo estudio, pero esta vez enfocado al consumo de carotenoides y las placas ateroscleróticas en arteria carótida, demostrando que su alto consumo disminuye la prevalencia (mujeres 25.4% y hombres 36.0%), aunque no se relaciona con el promedio de adelgazamiento de la pared, sugiriendo que pueden influir en forma tardía más que temprana en el proceso aterosclerótico retardando sus manifestaciones clínicas<sup>(65)</sup>.

Otra evidencia en este mismo sentido, es el resultado del estudio holandés *Rotterdam Study*, que analizó niveles circulantes de carotenoides (*alfa*-, *beta*-caroteno, *beta*-criptoxantina, luteína, licopene y zeaxantina), con función protectora conocida en aterosclerosis (a nivel aórtico, valorado a través de la presencia de placas calcificadas a nivel abdominal), demostrando que el nivel sérico de licopene se asocia inversamente con el riesgo de aterosclerosis y nivel de tabaquismo, donde la calcificación aórtica es más evidente, no observándose ninguna otra asociación con el resto de los carotenoides, concluyendo que existe una modesta relación entre los niveles séricos de licopene y aterosclerosis, aunque su asociación más pronunciada en fumadores sugiere un papel protector<sup>(66)</sup>.

Paralelamente a la publicación del ARIC, en Canadá se diseñó un estudio similar, comparativo con ramipril (con fines antioxidantes), ya que las evidencias clínicas y experimentales sugieren que los IECA, al igual que vitamina E, pueden retardar el proceso aterosclerótico: *Study to Evaluate Carotid Ultrasound Changes in Patients Treated with Ramipril and Vitamin E (SECURE)*, complemento de un estudio a mayor escala llamado HOPE (*Heart Outcomes Prevention Evaluation*) diseñado en humanos para valorar estos efectos, utilizando ramipril 2.5mg/día (con poco efecto a nivel de la presión arterial) ó 10mg/día más vitamina E 400 UI/día, en pacientes con alto riesgo cardiovascular (Incluyendo diabéticos), pero sus resultados aún están pendientes de publicación<sup>(67)</sup>.

### 3.2.3.- Accidente vascular cerebral (AVC)

#### Mecanismos de daño por RLO:

En Gran Bretaña, se demostró que su incidencia es más alta en regiones donde el consumo de vegetales y frutas es muy bajo, incluso en relación a este tema, como parte de un estudio poblacional con seguimiento a 20 años, se reportó que de un total de 643 defunciones, 124 fueron a causa de AVC con mayor mortalidad entre quienes presentaron consumos bajos de vitamina C, pero demostrando que quienes tienen una ingesta mayor de esta vitamina, también consumen una mayor cantidad de otros nutrientes (dieta multivitamínica), concluyendo que los niveles de ácido ascórbico únicamente representan un predictor de la mortalidad por esta causa. Un estudio prospectivo previo en Suiza, también analizó esta asociación, aunque reportó que pacientes con concentraciones plasmáticas menores de ácidos ascórbico y *beta*-caroteno aumentaba 4 veces el riesgo de AVC, sin demostrar la misma asociación con vitamina C sola<sup>(68)</sup>.

Tradicionalmente, se ha considerado que la presión arterial es un importante factor de riesgo para AVC, pero el papel dentro de estos factores del colesterol total, HDL, *alfa*-tocoferol y *beta*-caroteno fue establecido de forma reciente en Finlandia, donde se evaluó su relación con AVC y sus subtipos (como parte del estudio ATBC), en un total de 1,057 hombres (85 hemorragias subaracnoideas, 112 intracerebrales, 807 infartos cerebrales y 53 no especificados), reportándose que la presión sistólica >160mmHg incrementa el riesgo de todos los subtipos en 2.5-4 veces, el colesterol total sérico se asocia inversamente con el riesgo de hemorragia intracerebral, mientras que el riesgo de infarto cerebral se eleva con concentraciones de colesterol

>7mmol/L, y con HDL >0.85mmol/L disminuye el riesgo de hemorragia subaracnoidea e infarto cerebral; así mismo, los niveles séricos preestudio, más altos de *alfa*-tocoferol disminuyen el riesgo de hemorragia intracerebral a la mitad y el de infarto cerebral a un tercio, contrario a lo que sucede con los niveles elevados de *beta*-caroteno que duplican el riesgo de hemorragia subaracnoidea y disminuyen el de infarto cerebral en una proporción menor, reflejando las diferencias en su etiopatogenia<sup>(69)</sup>.

También de forma específica, la generación de RLO en eventos trombóticos, tiene un papel distinto en la patogénesis del daño isquémico cerebral, ya que uno de los efectos potencialmente dañinos de la homocisteína, como factor de riesgo de eventos oclusivos, es su producción principalmente en fase aguda, como se demostró en un estudio reciente, transversal, comparativo con 30 pacientes, 2 días posteriores al inicio del ataque, que determinó los niveles séricos de homocisteína, peróxidos de lípidos, ácido ascórbico, SOD y NO, encontrando elevaciones estadísticamente significativas de homocisteína, peróxidos y NO ( $p < 0.001$ ), y niveles plasmáticos de ácido ascórbico menores en AVC, sin evidenciar cambios en el nivel de SOD, con una significativa correlación positiva, entre homocisteína y peróxidos, y negativa de ambos con ácido ascórbico, a diferencia de la correlación positiva de NO con SOD, concluyendo que la hiperhomocistinemia es un factor causal y fuente de RLO durante la fase aguda de los AVC trombóticos<sup>(70)</sup>.

#### Medidas terapéuticas en experimentación:

Los datos observacionales sugieren que dietas ricas en frutas y vegetales, y un alto nivel de antioxidantes séricos, se asocian con disminución en la incidencia y mortalidad de AVC, y bajo esta premisa, se ha continuado la investigación en relación con su prevención y tratamiento.

Como parte del ATBC, se estudiaron los efectos de la suplementación con *alfa*-tocoferol (50mg/día), *beta*-caroteno (20mg/día), ambos ó placebo, en la incidencia y mortalidad de la enfermedad, con un seguimiento a 6 años, presentando la mayor proporción de su mortalidad en los primeros 3 meses de suplementación, pero lo más importante es que *alfa*-tocoferol incrementa el riesgo de hemorragia subaracnoidea en un 50% (IC 95%, 3-132%;  $p=0.07$ ) y de hemorragia subaracnoidea fatal en 181% ( $p=0.01$ ), aunque disminuye el riesgo de infarto cerebral en un 14% ( $p=0.03$ ), mientras que *beta*-caroteno incrementa el riesgo de hemorragia intracerebral en un 62% ( $p=0.01$ ), aunque continua desconocido su mecanismo etiopatogénico, por lo que se considera que los efectos de la suplementación no son tan significativos, ya que aunque *alfa*-tocoferol aumenta el riesgo de eventos hemorrágicos, previene el infarto cerebral (debido a sus acciones antiplaquetarias)<sup>(71)</sup>, y aún más, en cuanto a la prevención y tratamiento, los resultados son contradictorios, examinándose la asociación entre el consumo de vitaminas y la mortalidad por AVC en un estudio prospectivo con una cohorte de 34,492 mujeres post-menopausicas, que documenta 215 muertes, informando que no existe relación alguna con el consumo de vitamina A y carotenoides, incluso después de realizar ajustes con el análisis multivarianza, a excepción del consumo de vitamina E en fuentes concentradas como mayonesa, cacahuates y margarina, sugiriendo su posible efecto obtenida de los alimentos, pero no apoyan el papel protector de la suplementación con vitamina E y otros antioxidantes<sup>(72)</sup>.

Recientemente, a través del análisis del estudio PHS<sup>(73)</sup>, se determinó si el consumo de vitamina E, C ó carotenoides era pronóstico del riesgo del AVC isquémico, en sujetos sin factores de riesgo cardiovascular inicial, demostrando que no existe una relación significativa, ni siquiera con el consumo de suplementos.

### 3.2.4.- Cardiopatía Isquémica

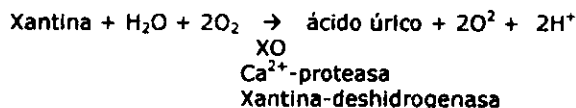
#### Mecanismos de daño por RLO:

La cardiopatía isquémica y particularmente el infarto miocárdico (IM), constituye una limitante para la longevidad y la oxidación juega un papel importante en su patogenia a través de LDL y la formación de RLO, que facilitan la evolución de las lesiones tempranas de la pared arterial hacia placas ateroscleróticas, al promover la formación de células espumosas, reclutamiento y retención de monocitos en la pared arterial, y contribuir a la aterogénesis por daño endotelial, promoción de trombosis e interferencia con la regulación vasomotora normal. Los metales de transición, incluyendo cobre, también causan modificación oxidativa de LDL y formación de radicales; de hecho, recientemente se reportó su asociación con la mortalidad por coronariopatías, a través del análisis de los datos del estudio NHANES II, demostrando que sus concentraciones séricas de cobre se encuentran en un 5% más en comparación con sujetos sanos y asociándolo fuertemente con la mortalidad, por lo que sí el cobre afecta directamente a la aterogénesis o es un marcador de la inflamación asociada permanece como un tópico a esclarecer<sup>(74)</sup>.

Los RLO actúan de forma desventajosa en el proceso de isquemia/reperfusión ya que el daño por reperfusión se debe a la presencia del oxígeno molecular en tejidos isquémicos, generando radicales a través de XO, proporcionalmente a la extensión del tejido dañado inicialmente, por medio de la siguiente reacción:



Hipoxantina\* representa el sitio de acción de XO, que tiene como precursor a la xantina-deshidrogenasa y que bajo condiciones de isquemia se transforma irreversiblemente en la primera y cataliza la siguiente reacción:



Así, la degradación de ATP formará hipoxantina y XO cataliza la reacción hacia xantina, creando círculos que favorecen el surgimiento continuo de RLO, hasta el momento, un daño limitado experimentalmente con SOD, alopurinol y dimetilsulfóxido ya que se ha demostrado que la disminución de antioxidantes es fundamental y SOD revierte parcialmente la acción depresiva de la acidosis sobre la captación de calcio, depletado a nivel del retículo sarcoplásmico (almacén) y que puede ser inhibido de igual forma por la administración de manitol.

Las mitocondrias también contribuyen a la formación de RLO debido a que los acarreadores de electrones permanecen en su forma reducida como resultado de la pO<sub>2</sub> causando eventualmente una reducción parcial del oxígeno molecular a H<sub>2</sub>O en la matriz lipídica de la membrana mitocondrial.

La activación de fosfolipasas, los ácidos grasos acumulados y fosfolípidos, y la peroxidación lipídica ha sido llamada tríada lipídica y se relaciona con la reversibilidad e irreversibilidad del daño miocárdico en el infarto del mismo, es decir, la activación de fosfolipasas en la isquemia libera ácido araquidónico que a través de la vía de la ciclo- y lipoxigenasa lo metabolizan y forman intermediarios de RLO, coincidiendo con la elevación de ácidos grasos y sobrecarga de calcio produciendo disfunción miocárdica contráctil durante el proceso de reperfusión.

Los neutrófilos atraídos a las áreas afectadas, por medio de receptores de superficie C<sub>3</sub> (sistema de complemento), poseen NADPH-oxidasa que reacciona con



oxígeno y forma superóxido (además de poseer mieloperoxidasa que puede generar el radical hipoclorito); por otra parte, se adhieren al endotelio y participan en el fenómeno de no reflujo (*no reflux*), taponando los capilares, y hasta el momento, solo el uso de anticuerpos antineutrófilo (Ac-N) reducen la isquemia de forma experimental y al agregar un antioxidante a los Ac-N se limita aún más el daño *in vitro*.

Finalmente, pese a que los RLO inducen una mayor liberación endotelial de PGI<sub>2</sub> anticoagulante, esta respuesta es insuficiente en el infarto agudo del miocardio, ya que la actividad plaquetaria es resistente a ella y los inhibidores de la tromboxano-sintetasa no previenen la agregación de forma efectiva.

#### Medidas experimentales de tratamiento:

Aunque la suspensión del tabaquismo, disminución de LDL, control de la presión, una dieta tipo mediterránea y terapia de ejercicio regular (caminar 3.2 Km/d) han demostrado reducir su mortalidad, la terapia con antioxidantes aún no; la administración específica de vitamina E no ha demostrado mejoría al respecto<sup>(1)</sup>, incluso reportes recientes sobre vitamina C y enfermedad coronaria, sólo mencionan que en grandes cantidades induce vasodilatación en arterias coronarias y braquiales, pero no determinan si tiene efectos benéficos, por lo que sus altos consumos, podrían reflejar únicamente una dieta sana ó quizás un estilo de vida saludable<sup>(75)</sup>.

Inicialmente un estudio escocés y posteriormente, el *Cambridge Heart Antioxidant Study (CHAOS)*<sup>(76)</sup>, estudio doble ciego, controlado contra placebo, aleatorizado, en pacientes con aterosclerosis coronaria demostrada angiográficamente y la administración de *alfa-tocoferol* (400-800 UI/día), encontró que la terapia con vitamina E disminuía la incidencia de infarto miocárdico (IM) después de un año de ingesta, pero no la mortalidad; de ahí, que existen varias razones para evitar la prescripción de vitamina E y otros antioxidantes en este sentido.

ATBC en cambio, no demostró un efecto significativo sobre la incidencia ó mortalidad de angina pectoris de reciente inicio, al igual que PHS (con 50mg de *beta-caroteno* en días alternos por 12 años). Por el contrario, NHS, demostró una significativa reducción del riesgo coronario en mujeres con alto consumo de vitamina E por al menos 2 años (el tiempo menor de ingesta no se asocia con la reducción del riesgo, con RR= 0.86, en comparación con su administración a 15 años ó más con RR= 0.59), con una disminución promedio del 40% de riesgo; sin embargo, este aparente beneficio fue atribuible principalmente al uso de vitamina E en suplementos (30UI ó menos en multivitamínicos y un RR= 0.78, en comparación con 100UI ó más en suplementos específicos y un RR=0.57), debido a que la dieta rica en esta vitamina no se asoció de la misma manera, considerando que el mecanismo por el cual reduce la enfermedad es la reducción de la aterosclerosis<sup>(77)</sup>.

Recientemente, *Rotterdam Study* investigó a través de un cuestionario de frecuencias y un seguimiento a 4 años en adultos mayores, si el consumo dietético de *beta-caroteno*, vitamina C y E se relaciona con el riesgo de IM, demostrando un riesgo mayor con el consumo menor de *beta-caroteno* (0.55, IC 95%: 0.34-0.83; p=0.013), sin encontrarse esta misma asociación con vitamina C y E, concluyendo que sólo los primeros pueden proteger contra las enfermedades coronarias<sup>(78)</sup>, contradictorios a los reportes de que el consumo de vitamina C previene la intolerancia a los nitratos (aunque en forma de suplementos), una hipótesis ya negada este año, por un estudio mexicano que administró vitamina C inicial durante el tratamiento de la angina.

Otras medidas antioxidantes, han tenido más auge entre los investigadores, como probucol y sus efectos hemorreológicos y antioxidantes sobre el curso de la angina pectoris (angina de esfuerzo; clase funcional II-III), observándose que inhibe de manera efectiva la peroxidación lipídica, estabilizando la estructura y función de los eritrocitos y plaquetas en pacientes con coronariopatías<sup>(79)</sup>.

### 3.3.- Enfermedad intestinal crónica inflamatoria

El intestino delgado y grueso tienen la mayor cantidad de sistemas enzimáticos que catalizan la oxidación de sustratos, siendo el captador de  $O_2$  y productor de RLO con mayor extensión en el organismo y uno de los de mayor trascendencia. A este nivel, las oxidasas (xantina, amino, aldehído y deshidrogenasas), se encuentran en: células fagocíticas de la pared intestinal, células endoteliales y del epitelio de la mucosa intestinal, donde existe una de las mayores concentraciones de SOD, CAT, GSH-pex y *alfa*-tocoferol del organismo, debido a la delicada interfase mucosa/ microorganismos intraluminales, lo que explica la gran cantidad de fagocitos y por lo tanto de NADPH-oxidasa y mieloperoxidasa, sin olvidar que se trata de un tejido muy activo metabólicamente con una producción elevada de  $ATP^{(3)}$ .

#### Mecanismos de daño por RLO:

En su fisiopatología se han implicado múltiples mediadores que inician y perpetúan el proceso inflamatorio, existiendo evidencias que apoyan esta hipótesis.

#### a.- Evidencias indirectas

- Diversos autores han estudiado a través de espectrofotometría y quimoluminiscencia la producción de RLO en sangre periférica por neutrófilos y monocitos, debido a informes previos que reportan una sobreestimulación en EICI y la evidencia de su hiperacumulación en la pared intestinal durante la fase aguda, indicando que la función celular es más ó menos normal y las alteraciones halladas previamente son inespecíficas y probablemente en relación con otros factores como desnutrición.
- El defecto en el sistema antioxidante de la EICI se ha demostrado con la disminución de la SOD cobre/zinc-dependiente en la mucosa intestinal, eritrocitos y neutrófilos, tanto en Colitis Ulcerativa (CU) como en Enfermedad de Crohn, y se ha encontrado una disminución en la concentración de GSH-pex en eritrocitos y metalotioneína en mucosa intestinal.
- La segunda línea de defensa se encuentra alterada, con los valores séricos disminuidos de vitaminas E, C y *beta*-caroteno en pacientes con CU activa, aunque no existen hasta el momento datos sobre sus concentraciones normales en mucosa intestinal; sin embargo, esto puede ser importante ya que esta disminución combinada amplifica la susceptibilidad a la peroxidación y las bajas concentraciones de vitamina C pueden actuar como pro-oxidantes en presencia de hierro y cobre con producción del radical  $OH^+$ , además de que ambas vitaminas inhiben a lipoxigenasa, cicloxigenasa y mieloperoxidasa.
- Estos pacientes presentan con frecuencia disminución en los valores séricos de oligoelementos, como zinc (asociado con aumento de cobre, con una relación cobre / zinc aumentada, al igual que en otros procesos inflamatorios crónicos), que podría ser un indicador del estrés oxidativo en la mucosa intestinal, ya que es el cofactor de la SOD. Además, un porcentaje no despreciable de pacientes con EICI presentan también concentraciones de selenio sérico disminuidas (cofactor de la GSH-pex), y su déficit puede desempeñar un papel en los mecanismos oxidativos en este tipo de enfermedades.
- La isquemia intestinal desempeña un papel importante ya se produce la conversión de la enzima xantina-deshidrogenasa en XO y la formación de anión  $O_2$  y  $H_2O_2$  en la fase de reperfusión, debido a la atracción de neutrófilos con la producción de más RLO y finalmente lesión tisular<sup>(3)</sup>.

#### B.- Evidencias directas.

- Durante su fase activa hay aumento en la producción de RLO, ante diversos estímulos por células fagocíticas aisladas en la pared intestinal.
- Existe aumento de la producción de lipoperóxidos en biopsias de mucosa rectal de pacientes con EICI activa, sugiriendo la existencia de lesión oxidativa.
- Durante la realización de pruebas de quimioluminiscencia se ha demostrado que la mucosa colónica está activa, correlacionándose el grado de inflamación macroscópica (índice endoscópico) y microscópica (índice histológico) con la actividad de la mieloperoxidasa, y disminuyendo con la utilización de antioxidantes que eliminan  $H_2O_2$  ó  $OH^+$ , aunque efectivos en menor grado, sugiriendo que los oxidantes derivados de los neutrófilos ( $O^2$ ,  $H_2O_2$ ,  $OH^+$ ,  $HOCl$ ) se producen en exceso en la mucosa colorrectal de los pacientes, apoyando la hipótesis de que su producción por neutrófilos desempeña un papel importante, como principal fuente de actividad de mieloperoxidasa. Los monocitos pierden la peroxidasa cuando maduran a macrófagos, de ahí su función limitada en el proceso oxidativo<sup>(3)</sup>.

Una evidencia más reciente es la disminución de diferentes carotenoides y retinol séricos en Enfermedad de Crohn, en comparación con sujetos sanos, que mejora posterior al inicio del tratamiento, aunque no se alcanzan los valores normalmente observados en pacientes sanos<sup>(60)</sup>.

#### Medidas experimentales de tratamiento:

La prueba final del papel de los RLO en la EICI vendrá con la demostración de que el tratamiento antioxidante específico es beneficioso in vivo, aunque solo existen evidencias indirectas al respecto, es decir, estudios realizados en estos últimos años han demostrado que fármacos efectivos en el tratamiento de EICI, como salazopiridina ó 5-aminosalicílico (5-ASA), poseen efecto antioxidante, barriendo de manera eficiente al radical  $OH^+$  e hipoclorito, además de inhibir la actividad de mieloperoxidasa y la síntesis del anión  $O^2$ , a nivel experimental, protegiendo a las células de la lesión oxidativa producida por los neutrófilos activados. Otros resultados de estudios preliminares, no controlados, sugieren que la utilización de SOD encapsulada en liposomas, y de SOD cobre/zinc dependiente mejoran clínicamente a los pacientes con Enfermedad de Crohn atenuando la inflamación mucosa en la colitis experimental<sup>(60)</sup>.

#### 3.4.- Enfermedades oculares

Los mecanismo oxidativos también juegan un papel determinante en este tipo de patologías y sus exponentes más importantes son la catarata (senil ó metabólica), y la degeneración macular (relacionada con la edad). De hecho, aproximadamente de los 30-50 millones de casos de ceguera mundial, 50% son resultado de catarata inoperable, llevando a discapacidad severa en la población. En el *Framingham Eye Study* se reportó una incidencia incrementada con la edad, con una proporción de 4 de cada 10 en el grupo de 52-64 años, en comparación con 9 de cada 10 en el de 75-85 años, siendo la extracción el procedimiento más utilizado en estos casos, en los Estados Unidos; así mismo, la degeneración macular, cambios degenerativos en la parte posterior del ojo, que primariamente involucran a los fotorreceptores y epitelio pigmentario de la retina, es la causa número uno de ceguera en mayores de 65 años, realizando fotocoagulación en una minoría de ellos, donde los vasos de neoformación

se encuentran alrededor de la fovea, pero este tratamiento no es preventivo y subsecuentemente también se pierde la visión<sup>(81)</sup>.

En Gran Bretaña desde 1930<sup>(82)</sup>, la catarata ha demostrado estar asociada con la deficiencia de riboflavina y aminoácidos, vitaminas y algunos minerales y al igual que en Estados Unidos, existe una sustancial expansión en el consumo de suplementos antioxidantes y vitamina B, que han demostrado bajos consumos en pacientes con alto riesgo; sin embargo, es poca la información disponible sobre su importancia, principalmente estudios longitudinales, en relación con la progresión de la catarata.

#### Mecanismos de daño por RLO:

La catarata es la respuesta acumulativa más común de varias influencias de daño que atacan a la cápsula, epitelio y fibras constituyentes de los lentes del ojo, y la oxidación de sus proteínas por RLO juega un papel muy importante en el proceso multifactorial, por su extremada sensibilidad a factores como tabaquismo y envejecimiento, disminuyendo la defensa antioxidante propia que podría ser modificada por micronutrientes como *alfa*-tocoferol, *beta*-caroteno y selenio, que pueden proteger a las proteasas (enzimas endógenas responsables de remover proteínas dañadas por foto oxidación propia del lente). Algunas evidencias apoyan esta hipótesis, pero esto no se ha probado aún en estudios longitudinales<sup>(81,82,84)</sup>.

En humanos, un estudio finlandés con un seguimiento a 15 años, reportó la asociación entre los niveles séricos de *alfa*-tocoferol, *beta*-caroteno y el riesgo de catarata, con un promedio de concentración sérica menor, por lo que sus bajas concentraciones predicen un incremento en el riesgo, lo que fue consistente con reportes experimentales y confirmando su relación causal con una defensa antioxidante defectuosa de los lentes<sup>(83)</sup>.

#### Medidas experimentales de tratamiento:

Mucho de las investigaciones experimentales sobre su etiología se han enfocado en el papel de los antioxidantes (vitamina C, E y carotenoides), y la evidencia de estudios epidemiológicos apoyan su papel en el desarrollo y progresión de oftalmopatías, aunque estos datos no son concluyentes, reportándose incluso contradictorios en múltiples ocasiones, como veremos a continuación.

Altos niveles séricos de carotenoides totales ó vitamina C han reducido el riesgo de uno ó más tipos de cataratas, sin encontrar efecto protector de vitamina A y E plasmáticas, aunque el uso durante 5 años previos de forma regular en suplementos de vitamina C ó E y beta carotenos<sup>(84)</sup>, reduce aproximadamente 50-60% de las extracciones, sin observar efecto con suplementos de vitamina A ó multivitamínicos<sup>(81)</sup>, y apoyando la hipótesis de que sus altos consumos reducen el desarrollo de catarata, concluyendo inicialmente que los antioxidantes tienen un papel en la prevención y sugiriendo prudente el consumo de dietas altas en estas vitaminas<sup>(85)</sup>; incluso *Lixian*, demostró que esta combinación reduce el 35% de catarata nuclear en el grupo de 65-74 años de edad<sup>(81)</sup>.

Desde 1993, se reportaron 2 estudios más sobre el tema; uno (*Baltimore Longitudinal Study of Aging*), demostró que niveles altos de vitamina E reducen 60% el riesgo de enfermedad sin efecto protector de vitamina C, *beta*-caroteno ó multivitamínicos, en contraste con el otro (*Beaver Dam Eye Study* en Wisconsin), en personas sin diabetes, donde altos consumos de multivitamínicos por más de 10 años reducen 40% de cataratas nucleares y aumenta 60% el riesgo de catarata cortical<sup>(81)</sup>. Incluso, de manera prospectiva se recabaron los datos del PHS, reportando un RR=0.73 y 0.79 para la extracción en quienes tomaron multivitamínicos, en

comparación con suplementos sólo de vitamina C y/ ó E y concluyendo que sólo la toma de multivitamínicos tiende a disminuir el riesgo<sup>(86)</sup>.

Al mismo tiempo, se publicaron los resultados del *Eye Disease Case-Control Study Group* de Massachussets (multicéntrico que reunió 356 pacientes entre 55-80 años de edad, diagnosticados en estadios avanzados), realizado para evaluar la relación entre consumo dietético de vitaminas A, E y C y carotenoides, y el riesgo de degeneración macular, observando que sólo un alto consumo de estos últimos se asocia con disminución en el riesgo de la enfermedad (43% menor incidencia,  $p=0.02$ ), mencionando de forma específica a luteína y zeaxantina ( $p=0.001$ ), obtenidos en particular del alto consumo de espinaca, coles de brucas y brócoli ( $p<0.001$ ), aunque varios alimentos ricos en carotenoides también estuvieron asociados con la disminución<sup>(87)</sup>, aunque estos resultados dejan fuera el papel del resto de las vitaminas antioxidantes; en una nueva versión del *Beaver Dam Eye Study* el año pasado, que mide las concentraciones séricas de carotenoides y tocoferoles se reportó que solo estos últimos están asociados con la incidencia de catarata y se concluye la posibilidad de que el tipo nuclear pueda asociarse con el estado sérico de vitamina E, no excluyendo los beneficios que pudieran brindar los carotenoides al respecto<sup>(88)</sup>, incluso mencionando en un estudio paralelo con un seguimiento a 2 años que luteína y zeaxantina son los únicos carotenoides que se asocian con catarata nuclear y que otros factores de riesgo, vitamina C y E se asocian con la opacidad, sugiriéndose que la luteína sería la responsable del papel protector y los niveles de vitamina C y E predictores en el desarrollo de la enfermedad<sup>(89)</sup>.

Otro argumento a favor es el reporte en Gran Bretaña de que las concentraciones de *alfa*-tocoferol en lente opacificado por catarata es mucho menor que las cifras plasmáticas promedio, que aumentan con el uso de suplementos activos (tanto a nivel plasmático como del lente), aunque los únicos carotenoides demostrados localmente son luteína y zeaxantina<sup>(90)</sup> (componentes protectores de la región macular de la retina), con lo cual se han realizado 2 estudios prospectivos a gran escala, para demostrar esta asociación a través de un cuestionario de frecuencias y la reducción de la extracción, encontrando disminución de la misma en relación con altos consumos de luteína y zeaxantina (22% en mujeres y 19% en hombres,  $p=0.04$  y  $0.03$  respectivamente), a diferencia de otros carotenoides. De igual forma, el *National Eye Institute-sponsored* (estudio multicéntrico, comparativo, prospectivo, con portadores de degeneración macular severa, para demostrar el efecto protector de carotenoides específicos), observó una reducción en el riesgo, con altos niveles de luteína y zeaxantina, sin efecto del resto de carotenoides, vitaminas C, E ó selenio plasmáticos, y lo mismo fue observado en 1996 en Italia, en un estudio de casos-control, reportando la reducción de extracciones en pacientes con alto consumo de espinacas, tomates, pimientos y melón, como alimentos, y calcio, ácido fólico y vitamina E como micronutrientes, en comparación con los altos índices reportados con el consumo de mantequilla, otras grasas y retinol, metionina, beta carotenos y vitaminas A, C y D<sup>(91)</sup>.

Finalmente, aunque diversos estudios y resultados han fallado en demostrar un efecto protector efectivo para cualquiera de las vitaminas, lo único que se ha confirmado es que el consumo dietético de algunos carotenoides es la medida de prevención más efectiva, y otra muestra reciente de ello es el reporte de la *Universidad de Boston*, que examina la respuesta tisular de su consumo dietético (comparando sus concentraciones séricas, en tejido adiposo y células de mucosa oral), donde los niveles séricos de zeaxantina se incrementan después de 4 semanas, sin cambios en el resto de los tejidos; aunque el dato de mayor relevancia es que los niveles de luteína en tejido adiposo aumentan después de 8 semanas, debido a que existe evidencia de su relación inversa con los cambios en la densidad del pigmento macular, sugiriendo una interacción entre el tejido adiposo y la retina en el metabolismo de la luteína y confirmando su importancia al respecto<sup>(92)</sup>.

### 3.5.- Enfermedades pulmonares Inflammatorias

A nivel pulmonar son diversas las patologías relacionadas con el estrés oxidativo: displasia broncopulmonar, neumoconiosis, toxicidad por paraquat y polvo mineral, tabaquismo, síndrome de insuficiencia respiratoria progresiva del adulto (SIRPA), asma y cáncer, pero en cualquiera que sea la afección pulmonar, la hipoxia aumenta la peroxidación que suele coincidir con la reintroducción de oxígeno, sin embargo en procesos inflamatorios, los complementos oxidantes y proteasas, potencian la destrucción del parénquima.

La mayor fuente de proteasas son las células atraídas al pulmón como parte de la defensa del huésped, normalmente protegido por antiproteasas, que rápidamente se unen a ellas inhibiendo irreversiblemente su actividad; entre ellas, *alfa-1*-antitripsina (*alfa-1*-AT), inhibidor secretorio de leucoproteasas (SLPI) y *alfa-2*-macroglobulina, son antiproteasas centrales en la defensa pulmonar y varias enfermedades inflamatorias han sido implicadas con el desequilibrio entre estos sistemas (enfisema pulmonar, fibrosis quística, síndrome de distrés respiratorio del adulto y bronquitis aguda y crónica) ya que si el efecto protector de las antiproteasas disminuye, enzimas proteolíticas como las elastasas se estimulan por aumento de células inflamatorias, consumiendo proteínas del tejido conectivo y llevando al aumento de los espacios respiratorios típicos de enfermedades como el enfisema. Esta protección, puede verse aún más comprometida por la ausencia ó deficiencia secundaria de *alfa-1*-AT por enfermedades autosómicas recesivas asociadas ó bien, circunstancias que llevan a su deficiencia funcional (tabaquismo ó infecciones bacterianas recurrentes).

#### Mecanismos antioxidantes normales:

Antioxidantes como SOD, CAT y GSH, son los de mayor importancia a nivel pulmonar, aunque antioxidantes pequeños no enzimáticos como vitamina E, A y C tienen un papel relevante en cuanto a protección, distribuyéndose a nivel extracelular en el líquido interno del epitelio del tracto respiratorio inferior (llamado líquido interno epitelial ó ELF por su nombre en inglés), donde su relevancia antioxidante es aún mayor, mencionándose que la molécula antioxidante dominante a nivel intracelular y del ELF es la GSH, ya que su forma reducida es eficiente antioxidante intra y extracelular, de hecho está presente a altas concentraciones en él, con niveles normales en humanos mayores a 50 veces más que en plasma.

#### Mecanismos de daño por RLO:

La mayor fuente radicales en el tracto respiratorio inferior son las células fagocíticas activadas por el humo del cigarro inhalado, ya que el tabaquismo crea una enorme cantidad de oxidantes en el epitelio respiratorio, estimándose una producción de  $10^{14}$ - $10^{16}$  de RLO y se asocia con el reclutamiento y activación de macrófagos y neutrófilos llevando a una inflamación crónica leve del tracto respiratorio, además de que *alfa-1*-AT está parcialmente inactivada llevando a una insuficiente inactivación de elastasas (SLPI se inactiva de forma similar), por lo que los RLO causan daño y muerte celular por modificación y/ ó alteraciones en estructura y función de cualquier célula ó componente no celular, inactivando moléculas requeridas para mantener la integridad del tejido pulmonar, como *alfa-1*-AT, ya que su centro activo contiene un residuo de metionina que puede ser oxidado fácilmente.

Además oxidantes y proteasas dañan sinérgicamente el tejido pulmonar de forma directa, pues los oxidantes potencian el efecto de las proteasas al inactivar antiproteasas, y los antioxidantes pueden ser inactivados por proteasas, explicando el daño observado en enfermedades como el enfisema.

### Terapias antioxidantes:

El acceso rápido a la superficie epitelial respiratoria por los aerosoles ha dado la oportunidad de valorar y monitorizar terapéuticas dirigidas a fortalecer defensas antioxidantes en el tracto respiratorio inferior, mientras se corrige el desequilibrio oxidativo directamente en el sitio de la enfermedad; por ejemplo, en estudios *in vitro* se ha demostrado que una solución de GSH depositada en gotas de aerosol es capaz de alcanzar el tracto inferior, debido a que el proceso de aerolización por sí mismo, no altera la estructura de la molécula de glutatión y permanece reducida, aumentando la actividad antioxidante del ELF sin efectos adversos. Así, GSH funcional puede ser liberada por el aerosol y aumentar directamente sus niveles en ELF de la superficie respiratoria, un recurso terapéutico que puede ser de utilidad en varias enfermedades, principalmente fibrosis pulmonar idiopática (FPI) e infección por HIV, que están asociadas con un desequilibrio pulmonar severo entre oxidantes y niveles de glutatión en ELF alveolar, como veremos más adelante<sup>(93)</sup>.

Además, el descubrimiento reciente de la terapia SLPI en aerosol (antiproteasa de 12-kd, tipo serina con 8 cisteínas internas y enlaces disulfuro, que incrementa la capacidad de elastasas antineutrófilo y niveles de glutatión en ELF *in vivo*), sugiere que aún puede ser posible aumentar defensas antioxidantes y antiproteolíticas de la superficie epitelial respiratoria con una simple sustancia, siendo particularmente de mayor utilidad en el enfisema pulmonar, debido a las proteasas tipo serina en esta entidad.

Finalmente, otra estrategia prometedora es la terapia génica, que incrementa la expresión de genes antioxidantes en células de tejidos caracterizados por incremento en sustancias oxidativas como el epitelio respiratorio; la transferencia de un gen *alfa-1-AT* recombinante al epitelio pulmonar, *in vivo*, para aumentar la protección antiproteolítica del tracto respiratorio claramente ha demostrado que esta terapia aumenta la protección, por lo que los antioxidantes solos ó en combinación con antiproteasas, claramente ameritan estudios clínicos a largo plazo<sup>(93)</sup>.

#### **3.5.1.- Fibrosis pulmonar idiopática**

Caracterizada por inflamación en respuesta a un estímulo desconocido, daño epitelial y fibrosis progresiva, la respuesta espontánea de las células inflamatorias incrementa la cantidad de RLO, con disminución de las concentraciones del glutatión en ELF, magnificando el desequilibrio oxidante/antioxidante en la superficie alveolar, incrementando la susceptibilidad para el daño severo epitelial característico de la enfermedad. Para evaluar este concepto, la GSH (600 mg), fue administrada en aerosol, 2 veces/día por 3 días en individuos con FPI; una hora después del primer aerosol, los niveles de glutatión en ELF incrementaron significativamente, comparados con los niveles deficientes pretratamiento y una hora después del último aerosol, los niveles del glutatión permanecieron elevados, lo que indica que GSH aerolizado es utilizado como antioxidante debido a que no es oxidado por el proceso de aerolización, disminuyendo significativamente el anión O<sup>2</sup>.

Pacientes con FPI también han sido tratados con N-acetilcisteína (600mg orales, 3 veces/día por 5 días) y sus niveles de glutatión aumentan significativamente comparados con las concentraciones preterapia, sin alcanzan significancia.

#### **3.5.2.- HIV-seropositividad**

En pacientes HIV(+) asintomáticos, el número de células inflamatorias y el promedio de moléculas oxidantes de lavados broncoalveolares se encuentra

aumentado en comparación con individuos sanos, en niveles comparables a los encontrados en fumadores y sus concentraciones de glutatión en ELF están disminuidos en un 60% del valor normal. En un intento por preservar su función pulmonar, GSH aerolizada fue administrada 6 veces al día (600mg), encontrando niveles elevados del glutatión y permaneciendo elevados al menos por 3 horas posteriores a la terapia experimental, y el porcentaje de glutatión oxidado aumenta, probablemente como un reflejo de la utilización del glutatión como antioxidante in vivo<sup>(93)</sup>, aunque los resultados no son concluyentes al respecto.

### 3.5.3.- Síndrome de distres respiratorio del adulto

Caracterizado por hipoxemia severa, infiltrados pulmonares difusos y disminución de la capacidad respiratoria, afecta a más de 100,000 individuos en Estados Unidos, con factores de riesgo tan diversos como sepsis y broncoaspiración, sobreviviendo sólo el 50-60% de los afectados y radiológicamente evidenciada por infiltrados difusos como parte de la evidencia del daño alveolar asociado con edema pulmonar y requiriendo de ventilación mecánica con riesgo de barotrauma.

Los eventos que actúan para contrarrestar el daño aumentan el contenido de neutrófilos, como una medida relevante para la defensa y reparación pulmonar; su papel fisiológico es contener la interacción de sistemas efectores oxidativos y proteolíticos celulares, siendo las proteasas las responsables del daño a la matriz del tejido conectivo pulmonar, mientras que los RLO producidos son los intermediarios primarios para dañar al tejido, y aunque normalmente operan de forma fisiológica (como antimicrobianos), también tienen un efecto dañino en estos casos. En el primer caso, la generación de proteasas (colagenasas, elastasas y proteinasa 3) favorece la penetración al espacio extracelular del patógeno que es inactivado por RLO, considerándose un sistema de defensa regulado por antioxidantes y antiproteasas que facilitan directamente la migración, fagocitosis y actividad microbicida, evitando el daño funcional y estructural del sistema respiratorio, por lo que las consecuencias clínicas podrían depender de la interdependencia de estos sistemas y no sólo de la eficiencia microbicida de los neutrófilos. En el segundo caso, la generación y aumento de RLO es resultado del flujo de neutrófilos y aunque se sospecha que este flujo puede agotar rápidamente la cantidad de antioxidantes se ha demostrado un incremento en la capacidad del líquido para inhibir la peroxidación y una disminución específica de glutatión reducido; por lo tanto, la clave en la patogenia del síndrome son los neutrófilos, que aumentan la cantidad de elastasas y oxidantes con doble acción y pérdida masiva de la permeabilidad selectiva tanto del epitelio como endotelio. De aquí, que diversos investigadores han demostrado que la concentración de elastasas está aumentada, llevando a la hipótesis de que la terapia experimental con *alfa-1-AT* (Prolastin\*), en enfisema hereditario puede mejorar la cantidad de proteasas que degradan elastina (relacionada con los defectos en la permeabilidad), aunque otros estudios experimentales más recientes no lo han comprobado<sup>(94)</sup>.

### 3.5.4.- Enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC)

Tanto los mecanismos inflamatorios como oxidativos juegan un papel importante en su desarrollo y progresión. Los cambios morfológicos en la bronquitis crónica se caracterizan por hipertrofia e hiperplasia de glándulas mucosas, metaplasia de células cuboides, hipertrofia de músculo liso y la pérdida de la función ciliar, asociados con infiltrados de células inflamatorias mononucleares; la hipersecreción y reducción del aclaramiento mucociliar pueden causar retención de moco facilitando la agregación de infecciones virales ó bacterianas y la consecuente alteración de la



defensa con acumulación de neutrófilos, macrófagos y linfocitos T en la mucosa bronquial. Sin embargo, el proceso puede iniciar una auto-perpetuación con aumento de citocinas y sustancias con acción proteolítica.

Los neutrófilos activados, incrementados en el esputo durante las exacerbaciones, pueden causar daño a través del aumento de elastasas, mieloperoxidasa y la generación de RLO, y causar daño epitelial y adelgazamiento de la pared de las vías de pequeño calibre con el subsiguiente desarrollo del enfisema. El incremento en el número de radicales es el resultado del daño directo de la inhalación del humo de cigarro ó incremento de su producción por células inflamatorias activadas inactivando a *alfa*-1-AT y contribuyendo a la pérdida de la función pulmonar. Las evidencias que apoyan su presencia son diversas: el lavado broncoalveolar contiene residuos de metionina oxidados, la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, en la respiración de pacientes estables, son significativamente mayores en comparación con sanos y durante las exacerbaciones aumentan aún más, indicando el aumento del estrés oxidativo y reducción de la capacidad antioxidante plasmática y no solo local.

Como parte del tratamiento de este tipo de patología se incluye el evitar los disparadores como tabaquismo e irritantes relacionados con trabajos específicos, además de modalidades no farmacológicas como una adecuada nutrición, inmunización contra influenza, oxígeno suplementario, ejercicios respiratorios y rehabilitación pulmonar; aunque, la inhibición de estos mecanismos puede brindar posibilidades terapéuticas adicionales y habrá que identificar a los grupos que puedan beneficiarse del tratamiento antioxidante y esteroideo. En un intento de ello, se reportó un análisis del estudio EUROSCOP (multicéntrico de la Sociedad Europea Respiratoria sobre EPOC, realizado en 1992) concluyendo lo siguiente<sup>(36)</sup>:

- Ya que los esteroides son el tratamiento de elección en pacientes con asma, pacientes con EPOC leve, no fumadores, <40 años de edad, con historia de alergias ó datos de bronquitis asmática, pueden tratarse de igual manera y beneficiarse del mismo (beclometasona 800mcgr/día por 30 meses), reduciendo el número de exacerbaciones y mejorando el FEV<sub>1</sub> en los primeros 3-6 meses de tratamiento, lo que sugiere que la mayor parte del proceso obstructivo no mejorará con el tratamiento a largo plazo.
- El tratamiento con antioxidantes, a base de N-acetilcisteína (400-600mg/día vía oral, dosis que ha demostrado disminuir las concentraciones de lisozimas y lactoferrina, reducir la activación y número de neutrófilos y macrófagos alveolares, y proteger a *alfa*-1-AT contra su inactivación) a largo plazo (6 meses en promedio), mejora los síntomas respiratorios, acorta los períodos de convalecencia, y reduce la duración y número de exacerbaciones con disminución de la colonización por *S. pneumoniae* y *H. influenzae* en las vías aéreas de pacientes con bronquitis crónica con este tratamiento, atribuyéndose su eficacia a la habilidad de reducir la viscosidad del moco y mejorar el aclaramiento mucociliar, demostrando efectos antioxidantes protectores del tejido pulmonar contra el daño oxidativo e inhibiendo el adelgazamiento epitelial y la hiperplasia de células secretorias inducida por el humo del cigarro, por lo que se trata de una terapéutica que puede beneficiar a pacientes con EPOC leve a moderado >50años de edad, con historia de tabaquismo positiva, reduciendo el declive anual en la función pulmonar.

### 3.5.5. - Asma

Aunque se trata de una enfermedad inflamatoria, las evidencias sobre el daño producido por radicales se reducen al estado redox y estimulación de mecanismos conocidos dentro de su fisiopatología, comprobándose que los niveles de GSH-pex están reducidos, corroborando esta información en pacientes pediátricos<sup>(93)</sup>, desde

1994, con concentraciones de SOD, retinol, vitamina C y *alfa*-tocoferol reducidas en comparación con sujetos sanos ( $p=0.006$ ), lo que habla de posibles implicaciones etiológicas y terapéuticas en asma; además, de forma experimental, XO *in vitro*, causa hiperreactividad de las vías aéreas al entrar en contacto con acetilcolina y leucotrieno D<sub>4</sub> (LTD<sub>4</sub>), y la hiperreactividad a histamina puede ser bloqueada por SOD endógena, evidenciándose de forma directa la participación de los RLO; el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> estimula la liberación de glucoconjugados de alto peso molecular de los cultivos de células epiteliales, indicando que los RLO pueden inducir secreción de moco en las vías aéreas, y las cantidades existentes en eosinófilos destruyen el epitelio humano. Así mismo, se ha demostrado que los macrófagos alveolares y leucocitos de asmáticos contienen mayores niveles de RLO que producen un desbalance muscarínico con inducción de la contracción transitoria del músculo liso traqueal (a nivel experimental en cobayo, con el radical hipoclorito)<sup>(4)</sup>.

#### Terapia antioxidante experimental:

Gibbs y Schmutzler, en Alemania también han reportado la asociación de RLO con enfermedades inflamatorias como asma, evaluando los efectos del ambroxol y N-acetilcisteína (NAC), como terapias antioxidantes, sobre histamina, leucotrienos, citocinas y anión O<sup>2</sup>, en las células involucradas en la patogenia de la inflamación alérgica, seleccionando para las pruebas, mastocitos de adenoides humanas y piel de pacientes asmáticos, y basófilos, monocitos y granulocitos de donadores sanos; los 2 fueron adicionados en diferentes períodos antes de la estimulación con varios secretagogos inmunológicos y no inmunológicos, determinándose por ELISA, IL-4, 13 y LTC<sub>4</sub> (en basófilos) y LTB<sub>4</sub> (en granulocitos neutrófilos/ eosinófilos ó monocitos), encontrándose que ambroxol inhibe el aumento de histamina en más del 50% de los mastocitos e inhibe notablemente anti-IgE inducida por el aumento tanto de histamina como de LTC<sub>4</sub>, IL-4 y 13 y reduce histamina y LTB<sub>4</sub> inducida por monocitos. La droga también reduce la producción del anión O<sup>2</sup> en granulocitos estimulados, siendo más eficaz en un corto periodo de incubación (5-15 min.), contrario a NAC que no produce efectos claros al respecto, concluyendo que el ambroxol es capaz no sólo de inhibir el aumento de mediadores agudos de mastocitos y leucocitos, sino también reduce la generación de citocinas inmunomoduladoras en basófilos (así como la producción de superóxido en macrófagos alveolares), y puede tener efectos benéficos en el tratamiento de enfermedades alérgicas respiratorias como asma bronquial<sup>(96,97)</sup>. N-acetilcisteína hasta el momento, se ha propuesto en asma como preventivo en la contracción producida por hipoclorito, a nivel de músculo liso traqueal<sup>(4)</sup>.

### **3.6.- Choque circulatorio.**

Cualquiera que sea su etiología, está demostrado que la serie de eventos desencadenados, llevan al aumento en la producción de RLO, por lo que también se han intentado demostrar los beneficios de algunas medidas antioxidantes, sin confirmarse su utilidad, al igual que en otras etiologías.

#### Mecanismos de daño por RLO:

En el choque hipovolémico por hemorragia, la disminución de la presión arterial a la mitad de la cifra basal, condiciona aumento de neutrófilos a nivel pulmonar (fenómeno mediado por XO), liberando mieloperoxidasa y desencadenando una serie de reacciones que aumentan la producción de RLO con afección a macromoléculas que llevan a la necrosis tisular; bajo este mismo principio, se ha

Informado de la alteración de la membrana eritrocitaria en el choque séptico, que se describió como prevenible si se administra *alfa-tocoferol*.

Estos efectos también pueden influir en la sepsis, al bloquear la donación de oxígeno y generar cortos circuitos periféricos, existiendo el mismo riesgo a nivel cardíaco y músculo-esquelético, que contribuye finalmente a la presentación de complicaciones como: síndrome de falla orgánica múltiple, esteatosis necrotizante, insuficiencia renal aguda, pulmón de choque, etc.; además, se ha postulado que la disminución del ATP pancreático, hepático e intestinal, es una condición refleja por la producción de XO, contribuyendo a los mecanismos de daño.

Se ha demostrado también en el choque tóxico, que los RLO aumentan la permeabilidad microvascular (demostrada experimentalmente, por la extravasación de dextrán marcado con fluoresceína), realizándose mediciones que muestran concentraciones de etano, uno de los últimos productos de la peroxidación lipídica, y malondialdehído, directamente proporcionales a la gravedad de los casos, como se demostró clínica y bioquímicamente, este año en España<sup>(98)</sup>, reportando que independientemente de la etiología, cualquier daño tiene una relación significativa entre el estado redox, los marcadores de activación leucocitarias y la severidad de la enfermedad (principalmente en relación con la escala de APACHE III), lo que ha sugerido que la severidad en las Unidades de Cuidados Intensivos está proporcionalmente relacionada con el grado de estrés oxidativo, consistente con la hipótesis de que los RLO juegan un papel en la causalidad y propagación de la respuesta inflamatoria en pacientes críticos.

La sepsis, ó cualquier estado crítico, induce el aumento de mediadores pro-inflamatorios y RLO, como consecuencia de la activación de leucocitos polimorfonucleares y otras células reticuloendoteliales, asociados con el consumo de antioxidantes endógenos, reflejando el desequilibrio en el estado redox localizado al tejido dañado y produciendo daño sistémico, ya que los RLO reaccionan con toda clase de sustratos biológicos (especialmente ácidos grasos poliinsaturados), aumentando la peroxidación lipídica y destrucción de membranas, con la consecuente reducción de antioxidantes y otros componentes de la respuesta biológica. De hecho, el glutatión, está depletado en el músculo esquelético de pacientes críticos y la capacidad plasmática antioxidante está disminuida inicialmente en pacientes con sepsis quienes desarrollan disfunción orgánica, por lo que podría ser razonable, iniciar una terapia antioxidante como parte de la rutina de tratamiento de los pacientes admitidos a una UCI<sup>(98)</sup>.

#### Medidas experimentales de tratamiento:

Los efectos tóxicos de RLO producidos por células inmunes, pueden ser controlados en cierto grado por antioxidantes endógenos, especialmente importante en la inmunidad celular, a nivel fagocítico.

Víctor y Guayerbas<sup>(99)</sup>, investigadores españoles, informaron que el ácido ascórbico (AA), mejora la respuesta inmune, en el choque endotóxico producido por bacterias gram-negativas, a través del lipopolisacárido (LPS) de *E. coli*, encontrando en sus experimentos, el aumento en la producción del anión O<sup>2-</sup>, in vitro, y probando los efectos del AA a diferentes concentraciones sobre varios pasos del proceso fagocítico: adherencia al sustrato, quimiotaxis, ingestión de partículas y producción de O<sup>2-</sup>, a las 2,4,12 y 24 horas después de la inyección del LPS; sus resultados demostraron que el incremento en la adherencia, ingestión y producción de O<sup>2-</sup> fueron menores en presencia de AA, sugiriéndose que puede disminuir la severidad del choque endotóxico.

Por otro lado, Goldring<sup>(100)</sup>, estudioso del tema en Sudáfrica, con respecto al proceso de adherencia, como componente integral de la función inmune (especialmente en eritrocitos infectados por Malaria), reportó que los efectos de

diversos antioxidantes como dexametasona, cortisol, ambroxol, danazol, probucol y estaurosporina, es reducir la adherencia de los monocitos a las células infectadas, modulando la respuesta inflamatoria en estos casos, especialmente estaurosporina y los esteroides, sin olvidar los efectos que tuvieron en menor proporción probucol y ambroxol. El tratamiento con alopurinol también ha demostrado disminuir la mortalidad de los casos estudio, así como vitamina E en choque séptico, sin mencionarse por el momento dosis y tiempo de administración más adecuado<sup>(4,5)</sup>.

En los estudios sobre sepsis, la localización ó tipo de defensa antioxidante podría ser importante, ya que el aumento en la producción de RLO parece ocurrir en el espacio extracelular, debido a la activación de sustancias secretadas por células inflamatorias (intracelularmente podrían producirse como consecuencia de XO y citocromo P<sub>450</sub>, inactivándose de forma efectiva por SOD). Freeman y cols<sup>(101)</sup>, reportaron este año la posibilidad de que aunque los antioxidantes atenúen los efectos dañinos de los radicales en una variedad de sistemas biológicos, los efectos sean variables sobre la sobrevivencia, lo que es consistente con los resultados de otros estudios, donde se confirma que esta terapia puede ser dañina en algunos subgrupos, lo que pone en duda la aparente mejoría en este síndrome<sup>(102)</sup>.

Finalmente, de forma experimental, los RLO generados en el estado de choque, pueden ser contrarrestados con barredores del tipo de las nitronas (N-tert-fenil-butil-nitrona, alfa-4-piridil-óxido-N-tert-butil-nitrona, 5-5,dimetil,1,pirrolina N-óxido), pero aún requieren de iniciar su evaluación en humanos.

### 3.7.- Enfermedades neurodegenerativas.

De todos los órganos, el cerebro podría ser considerado el más sensible al estrés oxidativo, debido a que usa el 20% del oxígeno respirado y tener el nivel más alto de ácidos grasos insaturados, fácilmente oxidados por radicales, además de tener los niveles más bajos de antioxidantes vitamínicos y enzimáticos en comparación con hígado y otros órganos, así como presenta niveles diferentes entre sus mismas estructuras (cerebelo contiene la más baja concentración de vitamina E)<sup>(30)</sup>; sin embargo, no se muestra evidencia de estas alteraciones hasta que los estragos del proceso de envejecimiento se agregan al proceso degenerativo, por lo que la mayoría de las enfermedades propias del SNC se manifestarán a partir de los 65 años de edad<sup>(35)</sup>, y ningún tratamiento a largo plazo ó preventivo está aún disponible para ellas, siendo definitivo para su grado de declive cognitivo únicamente la selección de la muerte neuronal, ya que el resto de los procesos patogénicos es similar en muchos aspectos.

Se ha sugerido que el estrés oxidativo y las especies reactivas de nitrógeno son los factores de riesgo de mayor importancia, debido a que son generados a nivel intra y extracelular por varios mecanismos (fundamentalmente <sup>1</sup>O<sub>2</sub>, HO<sup>+</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y NO\*, NO<sub>2</sub>\* y ONOO\* como radicales nitrogenados), y funcionan como intermediarios de diversas neurotoxinas que inician y promueven la degeneración cerebral<sup>(103)</sup>. Además se ha sugerido que los componentes epigenéticos (mitocondria, membranas, modificación de proteínas y otros organelos), más que los genes nucleares de las neuronas, son el blanco de acción de tales neurotoxinas, incluyendo RLO; la disfunción mitocondrial es otro de los cambios que llevan al anclaje de radicales hacia el interior del citoplasma y núcleo mitocondrial, lo que puede originar el deterioro en el metabolismo energético y la razón de su alta sensibilidad es que su DNA está próximo al sitio donde los radicales son generados durante la fosforilación oxidativa, ya que no cuenta con la protección de las histonas ni enzimas de reparación; además, la actividad de las enzimas antioxidantes (CAT y GSH-pex), se encuentra reducida.

Otras fuentes de RLO son, algunas enzimas cerebrales como MAO, tirosina

hidroxilasa y L-aminoácido-oxidasa, que producen  $H_2O_2$  como un bioproducto normal de su actividad, generado también por la oxidación del ascorbato y catecolaminas; además la activación mediada por calcio, de los receptores del glutamato, principalmente con la formación de  $NO^*$  que puede reaccionar con oxígeno molecular para formar aniones peroxinitricos que a su vez forman  $OH^+$ , mucho más reactivo a nivel cerebral<sup>(35)</sup>.

Por lo tanto el daño oxidativo puede ser un mecanismo fundamental en un sin número de enfermedades neurológicas y la terapia antioxidante tendría potencial para prevenir, disminuir ó aminorar muchas de ellas. Sin embargo, la bioquímica de la patobiología oxidativa es compleja y las opciones antioxidantes óptimas pueden variar y necesitar ser adecuadas a cada una de las enfermedades, ya que en estudios *in vitro* y modelos animales se ha apoyado su efecto benéfico, aunque los resultados de pruebas clínicas usando vitamina E, tirilazad, N-acetilcisteína y ebselen, han sido controversiales, e incluso sugiriendo su administración en enfermedades crónicas insidiosas para alcanzar un apreciable beneficio clínico<sup>(104)</sup>.

### 3.7.1.- Enfermedad de Parkinson (EP)

#### Mecanismos de daño por RLO:

La enfermedad de Parkinson es un síndrome neurológico de origen desconocido, experimentalmente inducido con MPTP (metil-4-fenil,1,2,3,6-tetra-hidropiridina), neurotoxina asociada con la formación excesiva de RLO con un incremento en los niveles de peroxidación, disminución de elementos traza esenciales e inhibición del complejo I de la cadena respiratoria, con el consecuente incremento del estrés oxidativo, demostrándose que la metalotioneína, proteína con diferentes isoformas (I, II, III y IV; la fracción más importante I+II, con efectos dosis-dependiente), representa una alternativa de tratamiento experimental (antioxidante natural atrapa radicales), ya que regula el metabolismo de metales traza de importancia fisiológica y elimina los de mayor toxicidad<sup>(105)</sup>.

Se ha implicado al estrés oxidativo como parte de los mecanismos de producción, sugiriendo que existe incremento en la peroxidación en las células dopaminérgicas, además de incremento de hierro, que puede ser parte de la cascada que sirve para acelerar la pérdida neuronal, independientemente de su causa; sin embargo, la causa de este incremento permanece desconocido, aunque parece relacionarse con la gliosis en áreas enfermas, con cambios en la integridad de la barrera hemato-encefálica causada por alteraciones en la permeabilidad del tejido o por eventos inflamatorios<sup>(106)</sup>. En este sentido, los estudios realizados en necropsias también demuestran evidencias del incremento en la peroxidación en la sustancia nigra, con disminución de la defensa antioxidante y ferritina, lo que provoca la acumulación del hierro, el cual cataliza la formación de radicales  $OH^+$  y  $H_2O_2$  que oxidan a los lípidos y DNA (aunque el nivel del resto de los antioxidantes enzimáticos pareciera normal, probablemente como parte de los cambios adaptativos a la carga excesiva de ellos). Ninguno de estos eventos se ha indicado como primario o secundario, tardío ó precoz, sin embargo la pérdida del 60-70% de las neuronas dopaminérgicas en la sustancia nigra debe tener relación con estos eventos.

Además, la comúnmente usada L-dopa podría agravar la producción de radicales debido a su autooxidación e incremento de los niveles de dopamina, los cuales también producen RLO durante su metabolismo, produciendo semi-quinonas potencialmente tóxicas, acelerándose su metabolismo por MAO tipo B, lo que podría producir la formación excesiva de  $H_2O_2$  y explicaría los efectos secundarios asociados al tratamiento con levodopa, en estos pacientes<sup>(35)</sup>.

### Medidas experimentales de tratamiento:

Evidentemente con fines preventivos, se ha reportado que el consumo de vitamina E y *beta*-caroteno puede reducir el riesgo de peroxidación en la sustancia nigra, disminuyendo la incidencia de EP, pero pocos son los estudios que reportan su efecto real. El *Rotterdam Study*, realizado en Holanda<sup>(107)</sup>, por un periodo de 5 años, aplicando un cuestionario de frecuencias, no encontró relación con el consumo de antioxidantes dietéticos (*beta*-caroteno, flavonoides ni vitamina C), excepto vitamina E, cuyo consumo estaba disminuido y asociado de forma dosis dependiente en sujetos sanos (calculando un promedio de 10mg/día de vitamina E), aunque 2 estudios previos de casos-control no reportaron ningún efecto protector, además de un estudio multicéntrico con un seguimiento a 30 años en Estados Unidos, que evaluó el consumo de vitamina E, tanto en la dieta total como en alimentos con alto contenido de ella, corroborando que el consumo de legumbres ofrece protección y se especula únicamente acerca de sus posibles beneficios como profiláctico, ya que los resultados no son concluyentes, debido a reportes a favor del daño potencial de dietas altas en grasas en pacientes con predisposición, así como la falta de evidencia de actividad antioxidante de vitaminas en alimentos ó suplementos<sup>(108,109)</sup>.

Los resultados de estos estudios son controversiales, por lo que la realización de estudios a mayor escala y mejor planeación deberán ser diseñados. Por ejemplo, un estudio clínico, prospectivo, doble ciego, controlado contra placebo, multicéntrico, el *Deprenil and Tocopherol Antioxidant Therapy of Parkinsonism (DATATOP)*<sup>(110)</sup>, que reclutó 800 pacientes en estadios tempranos de EP sin requerir de tratamiento, iniciado en 1987 para evaluar la eficacia del *alfa*-tocoferol (2000 UI/día vía oral) y deprenil (Inhibidor de MAO tipo B, 10mg/día vía oral), para disminuir la tasa de progresión de la enfermedad; después de un promedio de 14 meses se reportó que deprenil aumenta el intervalo de tiempo necesario para requerir de tratamiento con Levodopa, y el efecto es sostenido hasta por 8.2 años antes de requerir dosis más elevadas, sin disminuir los efectos secundarios ó el periodo de enfermedad severa, es decir, ni deprenil, tocoferol ni su combinación afectaron la duración y calidad de vida en los pacientes en tratamiento (tasa de mortalidad reportada 17%, con un porcentaje anual del 2.1%(107)). *Alfa*-tocoferol no reportó ningún beneficio, lo que podría implicar que la tasa de degeneración de neuronas dopaminérgicas no se afecta por vitamina E sintética, ó incluso que la dosis podría ser inefectiva para el tratamiento de Parkinson en estas etapas. Sin embargo, uno de los defectos en el diseño del estudio fue permitir a todos los participantes el uso de multivitamínicos (*One-a-day*), argumentando que 30 UI de vitamina E podrían no contribuir más al efecto de las 2000 UI iniciales ó bien actuar de forma aislada con deprenil, enunciado que no es válido en el sentido de que los multivitamínicos tienen un efecto más pronunciado en comparación con los antioxidantes de forma individual<sup>(35)</sup>; de hecho, un estudio preliminar con vitamina E (3000 UI/día) y C(3g/día), demostró que hay un incremento en el intervalo de requerimiento de levodopa, por un lapso de 2-4 años en el 75% de los pacientes y 16% durante el seguimiento no requirió de esta terapia por un espacio de 8 años de seguimiento<sup>(111)</sup>, por lo que resulta interesante notar que la combinación produce efectos benéficos en etapas tempranas mientras que la vitamina E de forma aislada no es efectiva.

Precisamente, debido a estos resultados es que se recomiendan los siguientes tratamientos a base de suplementos con antioxidantes múltiples<sup>(35)</sup>, como un parámetro para el diseño de estudios ulteriores y en base a la distribución de la población afectada:

1.- **Alto riesgo de EP:** 1g de vitamina C como ascorbato cálcico, 200UI de vitamina E como *alfa* succinato de tocoferil y 250mg de N-acetilcisteína, sin administrar cobre, hierro ni manganeso.

2.- Estadios tempranos de EP: 2g de vitamina C, 400UI de succinato de tocoferil, 15mg de beta caroteno natural, 500mg de N-acetilcisteína, 100mg de coenzima Q10, 10mg de NADH y 200gr de selenio.

3.- EP que requiere de levodopa (sola ó en combinación con selegiline): 4g de vitamina C, 600mg de succinato de tocoferil, 30mg de beta caroteno, 500mg de N-acetilcisteína, 200mg de coenzima Q10, 10mg de NADH y 200gr de selenio.

Sin embargo, la pregunta más importante es acerca de la biodisponibilidad cerebral de las vitaminas antioxidantes administradas a pacientes con enfermedades neurodegenerativas, lo que ha generado una serie de estudios y opiniones, también controversiales, por lo que resulta esencial para todas las terapéuticas potenciales demostrar este aspecto.

Experimentalmente se ha reportado que el consumo de *di-alfa*-tocopherol obtenido de la dieta (1000 UI/día), por un promedio de 4 meses eleva los niveles de la vitamina a 1.4 veces más del valor normal, mientras que en LCR se elevan a 2 veces más su valor normal, pero con mayor lentitud (2 años)<sup>(35)</sup>. Aún más, DATATOP<sup>(112)</sup>, también demostró que la concentración de vitamina E a nivel lumbar con altas dosis (2000 UI/día vía oral), aumentaba significativamente después del tratamiento ( $p < 0.001$ ), demostrando una correlación positiva entre tiempo de ingesta y concentraciones en SNC ( $p < 0.001$ ), concluyendo que el tratamiento con vitamina E eleva sus niveles en LCR y posiblemente también a nivel parenquimatoso. Sin embargo existe un reporte que ha demostrado que la suplementación oral con *alfa*-tocopherol (400-4000 UI/día por 30 días), no incrementa las concentraciones en LCR ventricular, pero la diferencia entre estos resultados se ha explicado en base a la localización de las muestras de estudio, existiendo aún dudas a este respecto.

### 3.7.2.- Enfermedad de Alzheimer (EA)

#### Mecanismos de daño por RLO:

Las personas con esta enfermedad presentan un daño excesivo a neuronas de al menos 4 sistemas neurotransmisores, que incluyen: a.- núcleos basales de acetilcolina de Meynert, núcleo medial septal y banda diagonal de Broca; b.- locus cerúleo de norepinefrina; c.- núcleo rafe de serotonina del tallo cerebral; d.- dopamina de la sustancia nigra (la cual lleva a un grado variable de enfermedad de Parkinson en asociación con este tipo de demencia). Esta pérdida se ha asociado con la formación de pigmentos (lipofuscina, en el sistema de acetilcolina y serotonina; y neuromelanina en el sistema de la norepinefrina y dopamina), a lo cual contribuyen los RLO, como marcadores del estrés oxidativo a este nivel.

Recientemente, Smith y Rottkamp han propuesto que la disfunción mitocondrial, procesos mediados por *beta*-amiloide, acumulación de metales de transición y factores genéticos como apolipoproteína E y presenilinas, son posibles responsables del descontrol redox y origen de las inclusiones filamentosas intraneuronales conocidas como mezclas neurofibrilares, lo que lleva a un mejor entendimiento de la enfermedad y abre nuevas posibilidades terapéuticas. Se ha establecido además que la presencia de los productos finales de glicación avanzada, nitración, proteínas neurofilamentosas carbonil-modificadas, carbonilos libres y productos estables de glicación, predominantemente asociados con los depósitos de *beta*-amiloide, representan la mayor fuente de radicales, en base a la hipótesis de que representan compensaciones celulares con funciones antioxidantes, apoyado en un estudio que reporta depósitos que siguen, más que preceden, a la formación de las placas de amiloide<sup>(113)</sup>.

Grudman<sup>(114)</sup>, en California Estados Unidos, también ha sugerido la asociación de *beta*-amiloide a la toxicidad a nivel neuronal, ya que se implica directamente en la formación de RLO a través de radicales peptídil y adicionalmente productos finales de glicación avanzada, que activan receptores específicos, como el receptor de productos de glicación avanzada (RAGE) y el receptor-barredor clase A. El daño establecido por el amiloide es topográficamente distinto, con la formación del radical  $\text{OH}^+$  en el citoplasma más que en la mitocondria. Esta neurotoxicidad asociada incluye la despolarización de membranas, incremento en la sensibilidad a excitotoxinas y alteraciones en la homeostasis del calcio, sin embargo su influencia y la de otros factores genéticos puede ser mediada a través del estrés oxidativo, lo que puede ser atenuado por la aplicación de antioxidantes quelantes y catalasas<sup>(113)</sup>. En los casos familiares, se sugiere que las mutaciones en el gen APP son frecuentes ya que *beta* amiloide es producido por la proteólisis de APP y disminuye por el tráfico intracelular entre los compartimentos lisosomales y la membrana plasmática hacia los espacios extracelulares donde forman placas neuríticas.

Otra de las evidencias oxidativas es el contenido de hierro y ferritina incrementado en regiones corticales con disminución de GSH, SOD manganeso dependiente, con cambios similares en esclerosis múltiple, paraplejia espástica y esclerosis lateral amiotrófica, con aumento en el parénquima de hierro y aluminio y la presencia de defectos mitocondriales. Los niveles de vitamina A, E y *beta*-caroteno se encuentran disminuidos así como la actividad de glutatión transferasa en LCR ventricular, como parte de las alteraciones del sistema antioxidante. Esta demostrado que el hierro, en estado activo-redox, está directamente incrementado en las mezclas neurofibrilares y depósitos de *beta*-amiloide, catalizando la formación de  $\text{OH}^+$  a partir de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y la formación de productos finales de glicación avanzada; posteriormente, el aluminio, también acumulado en las inclusiones neuronales, estimula la peroxidación hierro-inducida, activando la microglia y representando una fuente más de NO y  $\text{O}^2$  y formando peroxinitrito, como parte del ciclo oxidativo identificable<sup>(113)</sup>.

Finalmente, se ha sugerido que el ácido ascórbico puede jugar un papel fundamental como pro-oxidante debido al hallazgo de niveles plasmáticos y en LCR menores en comparación con sujetos sanos, ya que en presencia de hierro, éste último se precipita con mayor facilidad y se acumula alrededor de placas seniles y en neuronas del hipocampo, formando las mezclas de estructuras neurofibrilares contribuyendo a la fisiopatología de la EA y sugiriendo la necesidad de restablecer los niveles séricos de vitamina C a través de la dieta<sup>(115)</sup>.

#### Medidas experimentales de tratamiento:

Recientemente se publicó que la etiología de esta enfermedad no esta del todo entendida, por lo tanto ninguna estrategia preventiva ni modalidad de tratamiento efectivo a largo plazo esta disponible, lo que representa un buen argumento en el desarrollo de diversas investigaciones al respecto, con resultados no alentadores y contradictorios. Sin embargo se ha reportado una serie de estudios con diferentes propuestas, debido a que todos los productos de las reacciones inflamatorias ( $\text{PGE}_1$  y  $\text{PGA}_1$ , RLO, citocinas y proteínas del complemento), son neurotóxicos, mencionando que los AINES pueden reducir la tasa de deterioro de las funciones cognitivas en etapas avanzadas, actuando con el mismo objetivo de drogas colinérgicas, y proponiendo que su combinación con antioxidantes y estrógenos también pueden ser benéfico en la prevención y efectividad del tratamiento usual<sup>(103,116,117)</sup>. Otros eliminadores de RLO como Ginkgo-biloba extracto Egb 761, desferrioxamina y vitamina E previenen el daño oxidativo inducido por *beta*-amiloide con el subsecuente desarrollo del déficit en la memoria, confirmando una disminución en el deterioro funcional con mejoría cognitiva leve a nivel experimental y demostrando sus efectos antioxidantes<sup>(114,116,118)</sup>.



Existe evidencia de que los medicamentos ó vitaminas que incrementan los niveles de catecolaminas y protegen contra el daño oxidativo pueden reducir el daño neuronal y progresión de la EA, y con este fin el *Alzheimer's Disease Cooperative Study*<sup>(118)</sup> realizó un estudio clínico, prospectivo, multicéntrico, doble ciego, controlado contra placebo, aleatorizado en pacientes con deterioro moderadamente severo que recibieron selegiline (inhibidor selectivo de MAO tipo B, 10mg/día), *alfa*-tocoferol (sintético 2000 UI/día), ambas ó únicamente placebo, con un seguimiento a 2 años, demostrando efectos benéficos con respecto a la tasa de deterioro de la función cognitiva en 3 de los 4 grupos de estudios, pero con un mayor beneficio con *alfa*-tocoferol ( $p=0.001$ ); de hecho, ambas reducen los niveles de RLO, pero por diferentes mecanismos: vitamina E protege a las neuronas por destrucción de radicales ya producidas (quelación), mientras que selegiline protege a las neuronas por prevención de la formación de radicales al inhibir el metabolismo oxidativo de las catecolaminas. De esta forma los resultados apoyan el concepto de que los RLO son uno de los intermediarios importantes en la progresión de la neurodegeneración, aunque se ha demostrado que el uso de *alfa*-tocoferol no produce los más óptimos beneficios, debido a que no atraviesa la barrera hemato-encefálica, en comparación con *alfa*-succinato de tocoferil que tiene mayor solubilidad y atraviesa con mayor rapidez la barrera<sup>(35)</sup>.

Sin embargo, para maximizar la eficacia de este tipo de tratamiento se recomienda al igual que en EP, el uso de antioxidantes múltiples en conjunto con la terapia estándar establecida, sugiriéndose grupos similares de tratamiento<sup>(35)</sup>:

- 1.- Alto riesgo de EA: 1g de vitamina C, 200UI de succinato de tocoferil y 250mg de N-acetilcisteína.
- 2.- Estadios tempranos de EA: 2g de vitamina C, 400UI de succinato de tocoferil, 15mg de beta caroteno, 500mg de N-acetilcisteína, 100mg de coenzima Q10, 10mg de NADH y 200gr de selenio.
- 3.- EA que requiere tratamiento: 4g de vitamina C, 600UI de succinato de tocoferil, 30mg de beta caroteno, 500mg de N-acetilcisteína, 200mg de coenzima Q10, 10mg de NADH y 200gr de selenio.

### 3.7.3.- Esclerosis lateral amiotrófica (ELA)

Dentro de los mecanismos relacionados con ELA se encuentran: estrés oxidativo, excitotoxicidad glutamato-inducida, alteraciones genéticas, ambientales, factores neurotróficos y fenómenos de autoinmunidad, todos provocando daño directo neuronal, pero considerándose de crucial importancia al estrés oxidativo; además, el ácido ascórbico como importante neuromodulador y neuroprotector por su acción antioxidante intra y extracelular e indirectamente regenerador de vitamina E (protector de membranas), se encuentra disminuido a nivel plasmático y LCR, como parte del mismo proceso, confirmado por investigadores griegos, mencionando que no reflejan la actividad de transporte a nivel del plexo coroideo como clave en la homeostasis de vitamina C en LCR (únicamente experimental)<sup>(115)</sup>. Otras alteraciones se encuentran codificadas en el cromosoma 21q, de la SOD cobre/ zinc, un importante indicador de su actividad disminuida, lo que puede considerarse como su causa<sup>(106)</sup>.

Experimentalmente se han demostrado beneficios parciales de vitamina C, en base a la hipótesis de que al restablecer sus concentraciones plasmáticas se previene la peroxidación y reduce la unión del glutamato a los receptores NMDA, protegiendo a las neuronas del daño excitotóxico pero sin reportar dosis y tiempos adecuados de tratamiento<sup>(115)</sup>. Por otra parte, recientes investigaciones han reconsiderado su interés en el uso de vitamina E como parte del tratamiento, ya que históricamente se ha confirmado que su uso en este tipo de enfermedad no tiene ningún beneficio (el caso

más comentado es el beisbolista Lou Gehring en los años 30's), a pesar del uso que ha tenido en síndromes deficitarios como encefalomalacia, distrofia muscular nutricional y debilidad muscular (utilizada en roedores), sin brindar hasta el momento datos consistentes sobre el tema<sup>(119)</sup>.

### 3.7.4.- Neurotrauma

Investigadores en Yugoslavia han estudiado la relación del estado oxidativo con la gravedad de los pacientes con traumatismo cerebral en sus primeras etapas, como parte de la evolución y ante la posibilidad de brindar alguna terapéutica que disminuya la incidencia de complicaciones; al estudiar a un grupo de 31 pacientes (8 con daño leve y Glasgow de 13-15, 10 con trauma penetrante extenso con Glasgow de 4-6 y 13 con trauma indirecto, secundario a explosión y sin daño craneal), y midiendo los niveles plasmáticos de magnesio, calcio y estado oxidativo en el momento del trauma y 7 días posterior al mismo, se demostró que estos se encuentran alterados, con aumento de los niveles de peroxidación y producción de superóxido (correlacionándose con disminución del magnesio plasmático), existiendo una relación directa con el grado de daño, ya que no se encuentra recuperación a los valores normales en pacientes con una escala de Glasgow menor, lo que podría representar un marcador de valor diagnóstico (en pacientes con trauma indirecto) y pronóstico en pacientes con neurotrauma<sup>(120)</sup>.

### 3.8.- Transplante de órganos

Aún con las importantes mejoras en transplante de órganos, técnicas quirúrgicas y soluciones de preservación, todos muestran un daño inevitable del injerto: isquemia y reperfusión; mientras la isquemia temporal depriva al órgano de oxígeno y sustratos metabólicos y previene la remoción de subproductos metabólicos dañinos, la reperfusión inicia una serie compleja de eventos que tienen el potencial de exacerbar el daño tisular por isquemia. Una característica pivote del daño por reperfusión es la generación de mediadores quimiotácticos e infiltración de células inflamatorias: la inhibición de la adhesión y/ó acumulación leucocitaria a las células endoteliales ofrece protección al tejido dañado en órganos transplantados.

#### Mecanismos de Daño por RLO

Los RLO generados durante isquemia y reperfusión, juegan un papel muy importante en el reclutamiento de células inflamatorias y disfunción microvascular subsecuente, dañando directamente al tejido (ataque sobre ácidos grasos, desnaturalización de proteínas y daño del DNA), estimulando la formación de mediadores inflamatorios con un poderoso potencial quimiotáctico, moléculas de adhesión sobre los leucocitos y células endoteliales y leucocitos para aumentar la producción de enzimas proteolíticas y RLO.

En la mayoría de los estudios clínicos, los niveles séricos de malondialdehído, estuvieron incrementados inmediatamente después de la reperfusión del órgano transplantado, así como el consumo pronunciado de la capacidad antioxidante sérica. Estos cambios se han implicado también en la función a corto y largo plazo de aloinjertos, ya que la isquemia y reperfusión estimulan la expresión de moléculas MCH, particularmente de clase II, transformando al injerto postisquémico en un órgano más inmunogénico; de hecho, la isquemia temporal por sí sola, estimula la expresión de MCH clase I y II en injertos renales y pulmonares a nivel experimental,

llevando a una mayor efectividad en el reconocimiento de células T y a una apropiada respuesta efectora.

La respuesta de las células T citotóxicas contra el órgano injertado podría, aumentar por otro evento inducido por la reperfusión: la inactivación mediada por RLO del NO, que tiene diversos papeles en la regulación de los parámetros cardiovasculares; entre otras propiedades, estimula la agregación plaquetaria y adhesión leucocitaria a las células endoteliales, y también inhibe significativamente el desarrollo de la respuesta linfocitaria citotóxica aloespecífica, y consecuentemente su inhibición incrementa la proliferación mitogeno-inducida de los linfocitos.

El rechazo crónico ha sido definido como un deterioro progresivo en su función, ocurriendo a los meses y años después del injerto y asociado a los cambios morfológicos característicos en el árbol vascular, y ésta resulta de la infiltración de la íntima por células mononucleares, migración y proliferación de células de músculo liso y su depósito subsecuente en la matriz extracelular. Los mediadores involucrados en el reclutamiento leucocitario dentro de la pared vascular son similares a los mediadores involucrados en la adhesión leucocitaria durante isquemia/ reperfusión: varios mediadores inflamatorios (y RLO), son generados en el tejido postisquémico prolongando el daño y predisponiendo a la pérdida del injerto debido a la aterosclerosis crónica y obliteración vascular, observándose en injertos aórticos experimentales que la duración de la isquemia se correlaciona significativamente con la severidad de la arteriosclerosis del trasplante<sup>(121)</sup>.

Dentro de este capítulo, se ha considerado a la colocación de injertos coronarios arteriales (bypass cardiopulmonar), que demuestra la presencia de una exacerbada respuesta inflamatoria sistémica que incluye: activación del complemento, aumento de citocinas y activación leucocitaria con la consiguiente producción de moléculas de adhesión y RLO, lo que contribuye al desarrollo de complicaciones postoperatorias, incluyendo disfunción renal, respiratoria, neurológica, hepática, alteraciones hemorrágicas e incluso falla orgánica múltiple, lo que ha sugerido que la respuesta antiinflamatoria puede ser inhibida durante y después de la colocación. La activación leucocitaria resulta en el incremento de gran cantidad de RLO, incluyendo  $O^2$ ,  $H_2O_2$ ,  $OH^+$  y  $^1O_2$ , que actúan sobre lípidos de la membrana, para incrementar su permeabilidad, disminuyendo de esta manera la función cardíaca y pulmonar, observándose correlación entre el grado de activación del complemento y el incremento en la peroxidación. Finalmente, los RLO aumentan la capacidad del NO precipitando vasoespasmo y trombosis post-reperfusión del corazón isquémico<sup>(122)</sup>.

#### Terapéutica empleada experimentalmente:

Las vitaminas antioxidantes han sido usadas clínica y experimentalmente en trasplantes renales, hepáticos, pulmonares y cardiovasculares, para inhibir de forma efectiva la severidad del daño por reperfusión y mejorar la función a corto plazo del aloinjerto y su supervivencia. Desafortunadamente ningún estudio se ha enfocado a resultados a largo plazo y el impacto potencial sobre aterosclerosis de los aloinjertos.

Aún antes del trasplante, los niveles circulantes de glutatión, vitamina A, E, carotenos y licopene están significativamente disminuidos en comparación con pacientes normales (principalmente los dos últimos). Es bien sabido que las vitaminas antioxidantes son consumidas durante el daño por reperfusión de órganos transplantados, y que la peroxidación puede ser efectivamente prevenida con estas vitaminas a corto plazo, principalmente en receptores de trasplantes hepáticos (reportado por Bachman y Sánchez, en revistas especializadas sobre tema).

Se reportó que la mitocondria hepática es una fuente adicional de RLO en la reperfusión, y es controversial el papel de las oxidasas citosólicas (XO), en la generación del daño, lo que parece un importante componente de la reoxigenación de aloinjertos hepáticos; fuentes adicionales pueden ser la infiltración leucocitaria y

células de Kupffer activadas. Tomando en cuenta esos datos, una solución fue desarrollada para la preservación de aloinjertos hepáticos (*Carolina Rinse Solution*) que contiene antioxidantes diversos (alopurinol, desferrioxamina y glutatión, entre otros), con el objeto de prevenir la activación de células Kupffer y precursores de la generación de ATP (adenosina, glucosa y fructuosa), encontrando mejoría de los resultados del injerto después del trasplante hepático<sup>(123)</sup>.

Aunque teóricamente vitamina C y E pueden funcionar como pro-oxidantes, su uso amplio en diversas condiciones clínicas, incluyendo situaciones de isquemia/reperfusión ha demostrado que son relevantes *in vivo* y hay argumentos de peso para su efecto protector como antioxidantes. Por ejemplo, 500mg de vitamina C han sido utilizados de forma segura, en inyección intravenosa en receptores de alo-injertos renales inmediatamente antes de la reperfusión del injerto renal, resultando en una protección significativa para ellos, siendo su única limitante el uso conjunto con vitamina E en transplantados con coagulopatía por deficiencia de vitamina K, la cual puede exacerbarse con altas dosis de vitamina E<sup>(121)</sup>.

La administración de barredores de RLO ha demostrado beneficio experimental en trasplantes cardíacos; la vitamina E oral preoperatoria ha sugerido tener beneficios en la colocación de injertos coronarios, aunque ha diferencia de vitamina C, sus niveles no disminuyen significativamente, después de 24 horas de la cirugía. Su administración preoperatoria en combinación con vitamina C y alopurinol, puede reducir la morbilidad preoperatoria y daño miocárdico, especialmente en pacientes hemodinámicamente inestables que requieren de la cirugía. Finalmente, la adición de coenzima Q<sub>10</sub> ha demostrado tener efecto antioxidante y preservar la vasodilatación endotelio-dependiente, lo cual puede reducir el daño por isquemia/reperfusión durante el secuestro circulatorio hipotérmico severo<sup>(114)</sup>.

Así mismo, se ha reportado que pacientes sometidos a trasplante de médula ósea pueden recibir tratamiento con suplementos antioxidantes, considerándose por investigadores alemanes, dosis de 45mg de *beta*-caroteno, 85mg de *alfa*-tocoferol y 450mg de ácido ascórbico al día, 3 semanas antes de la terapia de acondicionamiento, ya que se ha demostrado que el estado antioxidante plasmático aumenta de forma significativa, reduciendo las alteraciones presentadas posterior a la terapia de acondicionamiento<sup>(124)</sup>; además se ha referido que en pacientes que son sometidos a quimio- y radioterapia previos a este tipo de trasplante, pueden recibir nutrición parenteral durante el mismo, para aumentar su estado antioxidante<sup>(125)</sup>, ya que se ha demostrado que glutatión, *alfa*- y *gamma*-tocoferol plasmáticos disminuyen después de la terapia de acondicionamiento, aunque no existe diferencia entre este tipo de tratamiento y la administración de micronutrientes de forma aislada. De igual manera el tratamiento con manitol y clorpromacina previenen el daño por reperfusión y mejora el pronóstico de los trasplantes renal y hepático<sup>(4)</sup>.

### 3.9.- Complicaciones crónicas de la diabetes

Datos recientes han sugerido un papel protector de los carotenoides en el desarrollo de la diabetes mellitus (DM) tipo 2, posiblemente a través de la inhibición de mecanismos redox involucrados; sin embargo, el efecto profiláctico a largo plazo de *beta*-caroteno en la prevención de ésta, ya se determinó en un estudio aleatorizado doble ciego, controlado contra placebo en el análisis del PHS, donde se tomó *beta*-caroteno 50 mg en días alternos, por un lapso de 12 años, demostrando la ausencia de asociación entre la suplementación y la incidencia, evidenciando la ausencia de beneficio preventivo aún con el incremento en la duración del tratamiento, quedando descartada esta situación<sup>(126)</sup>.

Aunque, DM es una enfermedad con manifestaciones y complicaciones vasculares propias, asociadas a la enfermedad microvascular que contribuye a la presencia de retinopatía y nefropatía, donde la aterosclerosis, incluyendo cardíaca, cerebral y de vasculatura periférica, se desarrolla tempranamente y favorece la morbilidad y mortalidad en este tipo de pacientes, el estrés oxidativo es una vía común de todas ellas, por lo que esta línea de investigación continua abierta<sup>(127)</sup>. El incremento en la glucosilación no enzimática (glicación), y glucosilación autooxidativa, el estrés resultante de cambios del metabolismo energético, alteraciones en la vía del sorbitol, de mediadores inflamatorios y el estado antioxidante, así como el daño tisular localizado (resultado de hipoxia, isquemia/ reperfusión y modificaciones oxidativas de proteínas y lípidos, con énfasis en la colágena), son algunos de los mecanismos implicados en la presencia de estas complicaciones<sup>(39)</sup>.

### Mecanismos de daño

Aunque no existe evidencia directa de que el daño oxidativo ocurra, se han reportado observaciones sobre proteínas de larga vida (colágeno, elastina, laminina y mielina), que se acumulan con el tiempo y producen alteraciones en estructura y función de proteínas endoteliales, contribuyendo al desarrollo de angiopatía; sus modificaciones y los cambios estructurales en tejidos ricos (cristalino, pared vascular y membranas basales), están asociados con el desarrollo de complicaciones como cataratas, aterosclerosis y nefropatía.

Los cambios físicos en la colágena están relacionados directamente con sus modificaciones químicas, dependiendo de la severidad y duración de la enfermedad, acompañados por alteraciones funcionales como fragilidad capilar, permeabilidad vascular, movilidad articular y cicatrización de heridas; sin embargo, la limitada información ó ausencia de evidencia directa sobre la naturaleza de los cambios químicos y aún menos sobre la naturaleza de la colágena diabética, no dan validez a todas estas consideraciones, ya que los compuestos carbonilo, formados de aminoácidos durante la oxidación metalo-catalizada de proteínas, son inestables en sistemas biológicos y no se acumulan, debido a que pueden reaccionar con aminas, ó ser oxidados a ácidos carboxílicos antes de poderse medir de forma objetiva; además, algunos productos estables de la oxidación, como aspartato (producido en la oxidación de histidina), son indistinguibles de aminoácidos naturales, por lo que la evidencia no es realmente detectada, existiendo pocos marcadores bien definidos, sin demostrar plenamente su elevación en la diabetes.

Hasta el momento, el único tipo de evidencia directa es el reporte de la elevación de hidroxiperóxidos plasmáticos en pacientes diabéticos<sup>(128)</sup> sin encontrarse correlación con el resto de alteraciones en el metabolismo del paciente (concentración de colesterol total, triglicéridos, glucosa en ayunas y HbA<sub>1c</sub>), confirmando que su presencia demuestra que la diabetes se asocia a estrés oxidativo, corroborado por un reporte reciente que asocia estos hidroperóxidos con resistencia a la insulina (analizada en sujetos sanos no diabéticos), correlacionándose con la disminución en las concentraciones séricas de carotenoides y tocoferoles, y sugiriendo que la peroxidación se incrementa en estadios previos al desarrollo de intolerancia a la glucosa y DM tipo 2 manifiesta. De aquí la propuesta inicial de *beta*-caroteno en su prevención<sup>(129)</sup>.

La evidencia indirecta aportada hasta el momento, es diversa, e incluye estudios sobre glicación de proteínas y reacciones *Maillard* de proteínas glicadas que se incrementan en las modificaciones oxidativas de la colágena en diabetes. Además, de las sustancias de *Amadori* (fructosa-lisina y fructosa-hidroxilisina, formadas por glicación de residuos de lisina e hidroxilisina en colágena, y fuente potencial de O<sup>2</sup>), existen 3 productos de oxidación derivados de carbohidratos, que están incrementados sólo en pacientes diabéticos (*N*-carboximetil-lisina, *N*-carboximetil-

hidroxilisina y pentosidina), llamados **productos de autooxidación**, formados en reacciones en las cuales, el oxidante es una forma de RLO, que puede ser inhibido por quelantes y barredores de radicales en sistemas aeróbicos; aunque su presencia en la colágena no es sorprendente debido a que son estimulados por oxígeno y metales de transición y pueden ser inhibidos por ascorbato normalmente.

Asumir que el incremento de estos productos significa un incremento en el daño oxidativo subyacente de las proteínas es razonable ya que su glicación *in vitro* puede ser acompañada por fragmentación oxidativa de proteínas y peroxidación de lípidos asociados, y es posible que mucho del incremento en la colágena sea el resultado de reacciones autooxidativas favorecidas por su asociación con glicación. Esto es, el proceso de glucosilación autooxidativa que involucra azúcares reducidos como catalizadores de modificaciones químicas de proteínas de enlace, inicia por la oxidación de una cetosa ó aldosa a un azúcar *di*-carbonilo más reactivo (glucosona), que puede reaccionar con proteínas (los RLO formados incluyen  $O^2$  y  $H_2O_2$ , que en presencia de metales pueden causar daño oxidativo a moléculas vecinas y llevar a la fragmentación de proteínas, y a la oxidación asociada de lípidos durante las reacciones de glicación).

Debido a la interrelación entre glicación y oxidación en su formación, se ha denominado a todas estas sustancias, **productos de glucoxidación**, debido a que pueden ser considerados biomarcadores del daño medlado por carbohidratos a proteínas e indicadores de las modificaciones químicas extensas causadas por azúcares reducidos; se acumulan en la colágena normalmente en función de la edad y en la diabetes acelerada (experimental), por lo que la diabetes puede ser legítimamente descrita a nivel químico como una enfermedad caracterizada por envejecimiento acelerado del colágeno (2-3 veces mayor que en pacientes no diabéticos) tanto por mecanismos oxidativos como mecanismos de glicación.

Sin embargo, la glicación aislada no es suficiente para causar complicaciones, por que aunque los productos de glucoxidación, se acumulan gradual e irreversiblemente en la colágena, se han encontrado en concentraciones mínimas en la proteína y no es común que afecten sus propiedades físicas a esas concentraciones ni su resistencia a las proteasas.

Los cambios significativos en el metabolismo de lípidos y su estructura también ocurren en la diabetes, particularmente en pacientes con complicaciones vasculares. Aunque sus cambios estructurales son claramente oxidativos y su oxidación en lipoproteínas y membranas celulares está asociada con el desarrollo de enfermedad vascular, los estudios epidemiológicos sugieren que el nivel de  $H_2O_2$  en plasma está más asociado con hipertrigliceridemia y enfermedad vascular por sí misma, que directamente con DM<sup>(128)</sup>. Es por eso que la administración de probucol, sin efecto sobre la hiperlipidemia, inhibe el desarrollo de la aterosclerosis, aunque su efectividad en el tratamiento de la enfermedad vascular diabética no haya sido probada.

Así el incremento en la glicación del colágeno y proteínas plasmáticas en diabetes puede estimular la oxidación de lípidos, lo cual podría así mismo, estimular reacciones autooxidativas de azúcares<sup>(39)</sup>, aumentando el daño a los lípidos y proteínas de la circulación y pared vascular, continuando y reforzando el ciclo del estrés oxidativo y daño.

Hasta el momento no se han mencionado diferencias entre DM tipo 1 y tipo 2, aunque existen elementos característicos en cada una de ellas, donde los mecanismos patogénicos marcan elementos importantes, por ejemplo, el incremento en la formación de RLO y su asociación a cambios en las variables hemostáticas relacionadas al daño endotelial han sido encontrados sólo en DM tipo 2 con microalbuminuria<sup>(130)</sup>, refiriéndose a esta última condición como predictor temprano de mortalidad, predominantemente de enfermedades cardiovasculares; marcador de daño renal temprano en DM tipo 1, en tipo 2 existe una clara asociación con mortalidad por causas cardiovasculares y su alta prevalencia en ellos, no puede ser

explicada solo por factores de riesgo, y es posible que las alteraciones en la actividad de los RLO puedan ser importante en la patogénesis, realizándose su búsqueda y demostrando que está incrementada, junto con una alteración hemostática.

Las fuentes más comunes del incremento de RLO, son los neutrófilos y células endoteliales; los neutrófilos muestran una actividad incrementada en diabetes (evidenciada por un incremento en la concentración de elastasa de neutrófilos plasmáticos). Posteriormente, hay una reducción de la eficacia de Inhibidores como Inhibidor *alfa*-1-proteinasa, resultando en un incremento en el potencial de la elastasa lisosomal neutrofila, para causar daño vascular. Además, el endotelio vascular, particularmente durante períodos de Isquemia puede generar un incremento en la actividad de RLO.

Aunque los cambios en la peroxidación, demostrados en estudios al inicio de la década de los 90's, pueden estar relacionado a los cambios en los factores hemostáticos (aumento en la agregación plaquetaria, inhibición de la actividad de antitrombina III, produciéndose actividad pro-coagulante), la peroxidación *per se* ha sido implicada en el daño vascular, sin demostrarse tal asociación; además, el factor de vonWillebrand (elevado en pacientes con micro-albuminuria), está incrementado en células endoteliales dañadas, favoreciendo la adhesión y agregación plaquetaria en altas proporciones, y llevando a trombosis arteriales. Finalmente el incremento en el nivel de fibrinógeno en diabéticos, resultante de la adhesión de monocitos a células endoteliales dañadas, con aumento de citocinas como IL-6, que incrementan la síntesis hepática de fibrinógeno, y otras proteínas de fase aguda, favorecen el alto riesgo de estos pacientes a todo tipo de enfermedades cardiovasculares, como neuropatía autonómica cardiovascular<sup>(131)</sup>, una complicación seria y con mal pronóstico, evidenciada por pruebas cardiovasculares reflejas, en base a la variabilidad de la frecuencia cardiaca y de la presión arterial dentro de la rutina clínica, detectándose aún en fases tempranas en diabéticos asintomáticos y reportándose únicamente su prevención con una terapia intensiva de insulina ó bien largos períodos de normoglicemia (2 años ó más).

### Terapéutica empleada experimentalmente

Se ha demostrado que la normoglicemia ó lo más cercano a ella, es una medida de prevención de neuropatía diabética y otras complicaciones, sin embargo, en estadios avanzados, relativamente largos períodos de normoglicemia por varios meses ó aún años, pueden ser necesarios para retardar su progresión. El tratamiento de los síntomas dolorosos neuropáticos para mantener la calidad de vida del paciente, aún con antidepresivos tricíclicos, anticonvulsivantes, mexiletina y capsaicina tópica que no han sido del todo efectivos, han demostrado solo beneficios parciales, con potenciales efectos neurotóxicos secundarios a largo plazo. En 1997 se reportó en Alemania que el tratamiento antioxidante previene la disfunción nerviosa en diabetes experimental<sup>(131)</sup>; la actividad de los RLO se incrementa en el nervio ciático y el tratamiento con ácido *alfa*-lipoico<sup>(132)</sup>, potente barredor de radicales, lipofílico, resultó prevenir alteraciones neurovasculares asociadas a DM, ya que reduce la velocidad de conducción nerviosa y normaliza el flujo sanguíneo nervioso (reducido por el efecto inhibitorio del anión O<sup>2</sup> sobre óxido nítrico-sintetasa), y los niveles de glutathion, así como reduce la peroxidación del tejido neural, de forma dosis-dependiente, sugiriéndose que la mejoría es inducida por su acción antioxidante.

Desde hace 2 décadas, se han realizado estudios usando preparaciones oral e intravenosa de ácido *alfa*-lipoico; en 1980, para reportar su eficacia, se realizó un estudio doble ciego, por 3 semanas, usando 300mg/ día, vía oral en 10 pacientes diabéticos, sin reportar mejoría en la sintomatología y corroborándose 6 años después en Alemania, en 31 diabéticos tipo 1 a los que se administró 200mg/ día vía IV por 15 días, pero notando mejoría en las latencias motoras de los nervios medio, peroneo y

tibial. Un estudio posterior (2 años después), con duración de 12 semanas, Jörg y cols, trataron 35 pacientes insulino-dependientes, con 600mg/ día VO, sin demostrarse efecto terapéutico alguno; pero, no fue sino hasta 1993 cuando se reportó mejoría de la sintomatología dolorosa y parestésica, durante un período de 3 semanas de tratamiento IV con 600mg/día, preservándose el efecto hasta por 12 semanas, mientras el índice cuantitativo de la función nerviosa autonómica y periférica permanece sin cambios hasta por 15 semanas.

Un estudio a gran escala, multicéntrico, aleatorizado, doble ciego, controlado, contra placebo (*Alpha-Lipoic Acid in Diabetic Neuropathy [ALADIN] Study*)<sup>(133)</sup>, asumió que la respuesta de estudios previos al placebo era de aproximadamente 30% y de la droga del 60%, valorando la eficacia y seguridad de la infusión intravenosa, en DM tipo 2, usando 3 dosis (1200, 600 y 100mg al día) y basándose en síntomas como dolor, parestesias, debilidad y disestesias, previo y posterior a la infusión. Se demostró que el tratamiento parenteral con ácido *alfa*-lipoico 600mg/día por 3 semanas, está asociado con reducción significativa de varios síntomas incluyendo dolor. Posteriormente se evidenció que 100mg/día no muestra efecto superior al placebo y 1200mg/día está asociado con aumento en el tasa de efectos secundarios (principalmente gastrointestinales), más que con el aumento de su eficacia. Con el mismo objetivo, a menor escala, en 1997 en Alemania, se evaluó en un estudio doble ciego, multicéntrico, controlado contra placebo, su eficacia y seguridad en neuropatía cardíaca autonómica, llamado DEKAN (*Deutsche Kardiale Autonome Neuropathie*)<sup>(134)</sup>, en pacientes con DM tipo 2 de 18-70 años de edad, tratados con dieta, hipoglucemiantes orales y/ ó Insulina, y evaluando la variabilidad de la frecuencia cardíaca, su coeficiente de variabilidad, PAM y concentraciones de HbA<sub>1c</sub> (estas últimas sin variación entre los grupos de estudio), y el intervalo QT corregido, como parte de la evaluación eléctrica del aparato cardiovascular. El tratamiento con 800mg/día vía oral (200mg cada 6 horas), por 4 meses, con buena tolerabilidad asociada a mejoría significativa de la frecuencia cardíaca.

De igual manera, el deterioro de la vasodilatación endotelio-dependiente ha demostrado mejoría con la administración de vitamina C<sup>(127)</sup>, ya que el endotelio juega un importante papel en el mantenimiento del tono vascular y su función, debido a la síntesis y aumento de sustancias vasoactivas como NO, contribuyendo a las anomalías vasculares en estos pacientes, incluso antes de que la aterosclerosis pueda ser detectada tanto en DM tipo 1 como 2, aunque el mecanismo exacto es desconocido. Hasta el momento en modelos animales se ha podido restaurar completamente la relajación endotelio-dependiente con el tratamiento y con el fin de evaluar su compatibilidad con humanos, en 1996 se reportó que pacientes tipo 2 sin otros factores de riesgo cardiovascular, ni uso de complementos antioxidantes, se sometieron a un protocolo, en el cual se administró una infusión de vitamina C (a dosis constante, de 24mg/min y una tasa de 0.4ml/min para una dosis total en 24 horas de menos de 1gr, que in vitro ha demostrado protección contra la peroxidación), confirmando que la vasodilatación endotelio-dependiente está deteriorada en pacientes diabéticos y que puede mejorar significativamente con la administración aguda de vitamina C, restaurándose hasta en un 60% la vasodilatación en el músculo liso y células endoteliales.

Otro estudio que confirma la utilidad de vitamina C en DM, fue publicado este año, estudiando los efectos oxidantes de la hiperglucemia sobre membrana eritrocitaria, demostrándose un significativo incremento de la peroxidación local, que disminuye al agregar altas concentraciones de ácido ascórbico<sup>(135)</sup> y sulfato ferroso de forma dosis-dependiente, comparable con los efectos antioxidantes de vitamina E, trimetazidina, ginkocer y probucol (estas últimas sin referir dosis efectivas ni utilidad en pacientes diabéticos).

Finalmente, confirmando los datos previos, se han reportado los efectos de suplementos antioxidantes sobre anomalías inducidas por hiperglucemia<sup>(136)</sup>,



principalmente en el desarrollo de complicaciones cardíacas, refiriendo que un incremento del estrés oxidativo en miocardio produce elevación de productos lipídicos en ventrículo izquierdo, elevando la actividad de la proteína-quinasa (PKC) y alterando la actividad de Na-K-ATPasa y calcio-ATPasa; la administración de suplementos antioxidantes con una mezcla de ácido ascórbico, *alfa*-tocoferol, *N*-acetilcisteína, *beta*-caroteno y selenio previene la elevación del estrés oxidativo, regulando la actividad de estas enzimas miocárdicas, demostrando que las anomalías metabólicas no son únicas de la diabetes *per se*, sino secundarias a los niveles elevados de hexosas sanguíneas, y que los suplementos antioxidantes regularían estas anomalías metabólicas, además de contribuir a inhibir el desarrollo de cardiopatías en DM.

### 3.10.- Fotoenvejecimiento

El envejecimiento cutáneo es resultado de cambios determinados genéticamente (envejecimiento intrínseco) agregados a cambios degenerativos debido a la radiación actínica, llamados fotoenvejecimiento, causada por luz ultravioleta (UV) en partes expuestas diariamente; además de la exposición a numerosos agentes ambientales químicos y físicos que causan estrés oxidativo, resultando en varios efectos adversos a largo y corto plazo como eritema, edema, adelgazamiento cutáneo, arrugas y el incremento en la incidencia de cáncer de piel ó lesiones precursoras. Sin embargo, la influencia del fotoenvejecimiento es uno de los efectos más dañinos de la producción continua de radicales en la piel, incluyendo inflamación cutánea, procesos autoinmunes, alteraciones en la queratinización y vasculitis.

La generación de RLO por luz UV y otras fuentes, como infiltraciones celulares ó reacción de XO, puede ser detectado por métodos directos e indirectos, como la disminución de antioxidantes como glutatión, vitamina E y CoQ<sub>10</sub>, antioxidante celular endógeno, que se encuentra en declive en casos de fotoenvejecimiento, que indican que el balance prooxidativo/antioxidante puede ser mayor en el estrés oxidativo crónico y agudo inducido por la radiación solar<sup>(137)</sup>, demostrándose la aparición de efectos adversos como quemaduras solares, fotosensibilidad ó supresión inmunológica, fotoenvejecimiento ó tumores malignos, a través de RLO, eicosanoides y citocinas, por lo que su inhibición podría reducir el daño cutáneo.

Aunque la prevención del envejecimiento cutáneo es un objetivo de las industrias cosméticas y farmacéuticas, las características bioquímicas y clínicas predominantes de la edad cutánea atribuibles al fotoenvejecimiento más que a la cronología, han despertado gran interés de los investigadores en el área. La exposición cutánea crónica es la mayor determinante de arrugas y lentiginosis actínicas y el principal producto farmacéutico disponible para su prevención es el uso continuo de pantallas solares. Recientemente la evidencia apunta a la importancia de la radiación UV tipo A (UVA) y tipo B (UVB) en su etiología, y por supuesto la necesidad de pantallas que bloqueen ambos tipos de radiación. Su tratamiento a través de drogas puede ser categorizado como: antioxidantes, *alfa*-hidroxilácidos y retinoides tópicos, pero de ellos, sólo los retinoides tópicos, particularmente tretinoína (ácido *all-trans*-retinoico), han documentado su habilidad para reparar la piel dañada, representando el estándar de oro de tratamiento en esta situación<sup>(138)</sup>.

Sin embargo, el interés actual se ha centrado en la modulación farmacéutica del proceso, a través del conocimiento de todos los mecanismos conocidos<sup>(139)</sup>, y la suplementación antioxidante representa un medio para la prevención ó al menos retardo del envejecimiento cutáneo prematuro<sup>(140)</sup>. Muchos estudios han documentado que vitamina E ocupa una posición central como antioxidante de alta eficacia a este nivel, con posibilidades de disminuir la frecuencia y severidad de eventos cutáneos<sup>(137)</sup>, ya que puede proteger las membranas celulares del daño UV-inducido, y funcionar como profiláctico en fotohemólisis eritrocitaria, fotoeritema,

fotoenvejecimiento y fotocarcinogénesis, donde el daño fotooxidativo a membranas tiene radical importancia<sup>(141)</sup>.

También aquí existe controversia sobre resultados que mencionan que la vitamina E es útil, ya que tiene ventajas en la manera de su administración, especialmente en las aplicaciones tópicas, lo cual no parece claro<sup>(142)</sup>; un ejemplo es el reporte desde 1995, que demostró por resonancia paramagnética de electrones (RPE), que la radiación UV induce la formación de RLO en animales de experimentación y que el fotodaño subsecuente podría disminuir por la suplementación de la piel con antioxidantes, usando tanto el radical ascorbato libre y la RPE, para detectar radicales de corta vida, y evaluando el efecto de su aplicación tópica en 3 presentaciones: tocoferol-sorbato, *alfa*-tocoferol y tocoferol-acetato, demostrando que el primero disminuye significativamente el flujo de radicales en la piel, y la mayor protección contra fotoenvejecimiento en comparación con las otras presentaciones, lo que confirma las observaciones previas sobre la generación de radicales cutáneos e indican la utilidad de tocoferol-sorbato como un antioxidante fotoprotector<sup>(144)</sup>.

En comparación, en Alemania, hace 2 años se reportó que ácido ascórbico y *d*-*alfa*-tocoferol son fotoprotectores en estudios *in vitro* y experimentos animales y para demostrarlo en humanos, se realizó un estudio para valorar su efecto pero en forma sistémica, contra quemaduras solares, en un doble ciego, controlado contra placebo, con 10 sujetos que tomaron 2g/día de ácido ascórbico combinados con 1000U de *d*-*alfa*-tocoferol, por 8 días y valorando la dosis de radiación UV a través de la dosis mínima de eritema (MED) y flujo sanguíneo cutáneo de la piel radiada; se demostró que la MED de aquellos que tomaron vitaminas incrementó ( $p < 0.01$ ), y el flujo sanguíneo cutáneo disminuye significativamente ( $p < 0.05$ ) en aquellos que tomaron vitaminas, concluyendo que vitamina C y E reducen la reacción a las quemaduras solares, lo cual podría indicar un menor riesgo de secuelas tardías por daño UV-inducido, con su administración sistémica<sup>(145)</sup>.

Sin embargo, para continuar con la controversia a cerca de su administración y una vez demostrado que tienen efectos benéficos, se reportó en piel de cerdo, que vitamina C es capaz de brindar efectos aditivos contra el daño agudo de la radiación UVB, cuando se combinó con una pantalla contra el mismo tipo de radiación. Una combinación tanto de vitamina E y C son efectivas, atribuyéndose mayor beneficio a vitamina E; sin embargo, vitamina C es significativamente mejor en la protección contra el daño mediado por radiación UVA en modelos animales, mientras su combinación es ligeramente más efectiva que vitamina C sola. Cuando son formuladas con una pantalla comercial, una aparente mayor protección aditiva es notada, confirmando la utilidad de antioxidantes como fotoprotectores pero sugiriéndose la importancia de la combinación con compuestos con fotoprotección conocida como la de pantallas solares para maximizar los resultados<sup>(146)</sup>. En este mismo sentido, tan grande como lo es la visión de la belleza ante la sociedad como un signo de éxito se podría requerir enfatizar la prevención a través de la educación y uso de productos de protección solar interna y externa, lo que podría ser demostrado por la presuplementación con *beta*-caroteno combinado con pantallas tópicas, asociación más efectiva, aunque esto no ha sido totalmente confirmado<sup>(147)</sup>.

También de forma tópica, para determinar la eficacia del ácido ascórbico (3 gotas, 0.5ml/día de las formulaciones utilizadas) en el tratamiento del fotodaño leve a moderado en piel facial, se diseñó un estudio doble ciego, vehículo controlado, aleatorizado (del lado izquierdo y derecho de la cara), durante 3 meses, en salas privadas de cirugía plástica facial, en voluntarios con piel tipo I,II y III de Fitzpatrick, tomándose fotografías como referencia, con mejoría significativa total del 73.7% y mejoría por la disminución de la aparición de arrugas, mejorando la textura, tono, brillo y calidad de la piel en un 84.2%, y fotográficamente mejoría en 57.9% de los

casos, concluyendo que un régimen de 3 meses, con aplicación tópica diaria del ácido ascórbico brinda mejoría objetiva y subjetiva en la piel fotodañada a nivel facial<sup>(148)</sup>.

Finalmente, se ha investigado en Alemania, que la aplicación tópica de CoQ<sub>10</sub> tiene efectos benéficos para la prevención del fotoenvejecimiento, ya que es capaz de penetrar dentro de las capas viables de la epidermis y reduce el nivel de oxidación medida por la emisión de fotones pIco, con posterior reducción en arrugas profundas seguidas de su aplicación; ha demostrado su efectividad contra el estrés oxidativo mediado por radicación UVA en queratinocitos en términos de la depleción de los grupos tiol, activación de la fosfotirosina-cinasa específica y la prevención del daño oxidativo del DNA; es capaz de suprimir significativamente la expresión de colagenasas en fibroblastos dérmicos humanos posterior a la radiación UVA, por lo que los resultados indican que tiene la eficacia para prevenir muchos de los efectos detrimentales del fotoenvejecimiento<sup>(149)</sup>.

### 3.11.- Artritis reumatoide (AR)

La artritis Inflamatoria parece representar la condición ideal, en la cual se han relacionado mecanismos mediados por RLO en la fisiopatología tisular, ya que la inflamación articular puede ser inducida por una diversidad de alteraciones dentro: complejos Inmunes, productos bacterianos y cristales, representan estímulos potenciales para la activación de polimorfonucleares y la consecuente producción de radicales que dañan al ácido hialurónico, presente en las uniones cartilaginosas, y líquido sinovial, degradando al igual que otros proteoglicanos, colágeno y elastina, además de inactivar inhibidores de proteasas y activar colagenasas latentes potenciando el daño.

Específicamente en artritis reumatoide se ha identificado que O<sup>2</sup> producido por la estimulación de polimorfonucleares puede liberar hierro de la ferritina, dañando al cartílago y disminuyendo la síntesis de proteoglicanos, peroxidasas de membrana celular y despolimerizando al ácido araquidónico, además de atribuírseles la capacidad de modificar IgG y ser los disparadores para la formación de anticuerpos IgM contra IgG (factor reumatoide)<sup>(2,6)</sup>.

No es sorprendente que concentraciones excesivas de radicales se encuentren involucradas en la inflamación crónica provocando daño a DNA, incluso en otras enfermedades autoinmunes, con activación y proliferación de células T aloantígeno-inducidas, por lo que los beneficios terapéuticos de los barredores, aun en artritis reumatoide están por valorarse y los agentes quelantes puede ser los más prometedores.

### 3.12.- Toxicidad por medicamentos

De manera general, se menciona que muchos xenobióticos, como quinonas y compuestos nitro- y azo-aromáticos, pueden ser sometidos a reducción intracelular, seguidos por oxidación para generar RLO; de hecho, los efectos tóxicos de las quinonas han sido relacionados a la formación intracelular de las semiquinonas correspondientes, y sus reacciones con oxígeno para la formación de O<sup>2</sup>. Aunque complicado, esto se aplica de una forma más sencilla a tóxicos con mayor difusión y aplicabilidad.

El paraquat, conocido por sus efectos tóxicos secundarios a nivel del SNC y periférico, es rápidamente convertido por reducción a la forma de radical libre, que reacciona con oxígeno para regenerar bupiridil y convertir al oxígeno en radical O<sup>2</sup>; tal ciclo de oxido/reducción causa una alteración celular que depleta de NADH/ NADPH y

disminuye los niveles de glutathion intracelular, favoreciendo el aumento de calcio a este nivel, disparando la citotoxicidad. Los glucopéptidos antitumorales, como bleomicina también actúan de esta manera y se cree causan una secuencia específica de anclaje del DNA a través de mecanismos que involucran estos sistemas aumentando el daño oxidativo sistémico (aunque puede existir daño órgano-específico). La toxicidad farmacológica a nivel cardiaco, se debe a la formación de RLO, y la doxorubicina es la mayor causa de cardiomiopatía cuando se acumula la dosis, ya que se reduce por semiquinonas que liberan hierro de la ferritina<sup>(4,6)</sup>.

Aunque la toxicidad de fármacos como bleomicina, isoniacina, halotano y sustancias como tetracloruro de carbono deben su efecto a la lipoxidación a nivel hepático, otras como la ciclosporina A aún se encuentran en estudio para determinar los mecanismos de producción de radicales, mencionándose que estos no son formados directamente por la molécula de ciclosporina, principalmente a nivel renal (donde disminuye la tasa de filtración), y se reporta en estudios experimentales que su producción debe a la depleción de GSH a través de su metabolismo, lo que favorecerá aún más la nefro y hepatotoxicidad del tratamiento en pacientes transplantados (aún con dosis de 25mg/kg/día), lo que parece apoyar la idea de que el metabolismo mediado por el sistema enzimático mitocondrial CYP lleva a la generación de radicales (principalmente  $\text{OH}^+$  y  $\text{O}_2$ ), introduciéndose la hipótesis de que la adición de antioxidantes del tipo de vitamina E y *N*-acetilcisteína, previene sus efectos secundarios. Otros mecanismos formadores de radicales, (predominante en hígado y quizás tejidos extrahepáticos, aunque en menor grado a nivel renal), parece estar derivado del ácido araquidónico en conexión con lipoxigenasa, que además de atrapar radicales  $\text{O}^2$  por NO, llevan a la formación del radical peroxinitrico y la inactivación de la prostaciclina-sintetasa vía nitración de la tirosina<sup>(150)</sup>.

#### 4.- CONCLUSIONES

Antes de redactar conclusiones acerca del valor protector de los antioxidantes, es importante mencionar sus beneficios relativos para establecer intervenciones de promoción a la salud, debido al reporte de que incluso el ejercicio parece incrementar los RLO (demostrando elevaciones de malondialdeído en sangre y pentano en respiración, como indicadores de la peroxidación, en el ejercicio intenso, sin adecuado entrenamiento<sup>(151)</sup>), reportándose que suplementos de vitaminas C, E, otros antioxidantes ó mezclas de ellos, pueden reducir el estrés oxidativo, pero mencionando que una adecuada instrucción parece ser una medida antioxidante más efectiva y demostrada en atletas entrenados.

Por esto, parece claro que la mayor reducción en el riesgo de enfermedades es a través de los cambios en los hábitos de estilo de vida, y sus beneficios han sido demostrados más allá de cualquier duda: los beneficios de suspender el tabaquismo en la reducción de la mortalidad de enfermedades vasculares y cáncer son significativos; relativamente pequeñas disminuciones en colesterol total corresponden con reducción en el riesgo cardiovascular, así como, el tratamiento de la hipertensión leve a moderada disminuye el riesgo de EVC e IAM (esto, aún si se sustenta la promesa de que las intervenciones antioxidantes parecen benéficas como un tratamiento adjunto, pero no alternativo); sin embargo, mucha gente parece preferir la prescripción de drogas (ó suplementos), más que cambiar su estilo de vida.

También, es cierto que preguntas concernientes a mecanismos, interacciones y beneficios de los antioxidantes tomaran muchos más años para responderse, a través de pruebas a gran escala, aleatorizadas, bien diseñadas para evitar los sesgos reportados en la mayoría de los actuales para enfermedades crónicas severas y acumulados por más de 20 años<sup>(12)</sup>, observándose que en la evaluación de los

disminuye los niveles de glutatión intracelular, favoreciendo el aumento de calcio a este nivel, disparando la citotoxicidad. Los glucopéptidos antitumorales, como bleomicina también actúan de esta manera y se cree causan una secuencia específica de anclaje del DNA a través de mecanismos que involucran estos sistemas aumentando el daño oxidativo sistémico (aunque puede existir daño órgano-específico). La toxicidad farmacológica a nivel cardíaco, se debe a la formación de RLO, y la doxorubicina es la mayor causa de cardiomiopatía cuando se acumula la dosis, ya que se reduce por semiquinonas que liberan hierro de la ferritina<sup>(4,6)</sup>.

Aunque la toxicidad de fármacos como bleomicina, isoniacina, halotano y sustancias como tetracloruro de carbono deben su efecto a la lipoxidación a nivel hepático, otras como la ciclosporina A aún se encuentran en estudio para determinar los mecanismos de producción de radicales, mencionándose que estos no son formados directamente por la molécula de ciclosporina, principalmente a nivel renal (donde disminuye la tasa de filtración), y se reporta en estudios experimentales que su producción debe a la depleción de GSH a través de su metabolismo, lo que favorecerá aún más la nefro y hepatotoxicidad del tratamiento en pacientes transplantados (aún con dosis de 25mg/kg/día), lo que parece apoyar la idea de que el metabolismo mediado por el sistema enzimático mitocondrial CYP lleva a la generación de radicales (principalmente  $\text{OH}^+$  y  $\text{O}_2$ ), introduciéndose la hipótesis de que la adición de antioxidantes del tipo de vitamina E y *N*-acetilcisteína, previene sus efectos secundarios. Otros mecanismos formadores de radicales, (predominante en hígado y quizás tejidos extrahepáticos, aunque en menor grado a nivel renal), parece estar derivado del ácido araquidónico en conexión con lipoxigenasa, que además de atrapar radicales  $\text{O}^2$  por NO, llevan a la formación del radical peroxinitrico y la inactivación de la prostaciclina-sintetasa vía nitración de la tirosina<sup>(150)</sup>.

#### 4.- CONCLUSIONES

Antes de redactar conclusiones acerca del valor protector de los antioxidantes, es importante mencionar sus beneficios relativos para establecer intervenciones de promoción a la salud, debido al reporte de que incluso el ejercicio parece incrementar los RLO (demostrando elevaciones de malondialdeído en sangre y pentano en respiración, como indicadores de la peroxidación, en el ejercicio intenso, sin adecuado entrenamiento<sup>(151)</sup>), reportándose que suplementos de vitaminas C, E, otros antioxidantes ó mezclas de ellos, pueden reducir el estrés oxidativo, pero mencionando que una adecuada instrucción parece ser una medida antioxidante más efectiva y demostrada en atletas entrenados.

Por esto, parece claro que la mayor reducción en el riesgo de enfermedades es a través de los cambios en los hábitos deletéreos en el estilo de vida, y sus beneficios han sido demostrados más allá de cualquier duda: los beneficios de suspender el tabaquismo en la reducción de la mortalidad de enfermedades vasculares y cáncer son significativos; relativamente pequeñas disminuciones en colesterol total corresponden con reducción en el riesgo cardiovascular, así como, el tratamiento de la hipertensión leve a moderada disminuye el riesgo de EVC e IAM (esto, aún si se sustenta la promesa de que las intervenciones antioxidantes parecen benéficas como un tratamiento adjunto, pero no alternativo); sin embargo, mucha gente parece preferir la prescripción de drogas (ó suplementos), más que cambiar su estilo de vida.

También, es cierto que preguntas concernientes a mecanismos, interacciones y beneficios de los antioxidantes tomaran muchos más años para responderse, a través de pruebas a gran escala, aleatorizadas, bien diseñadas para evitar los sesgos reportados en la mayoría de los actuales para enfermedades crónicas severas y acumulados por más de 20 años<sup>(12)</sup>, observándose que en la evaluación de los

beneficios potenciales, se debe incluir un espectro completo de evidencias científicas (estudios en animales, pruebas clínicas y estudios epidemiológicos); así cada disciplina y estrategia de investigación contribuye de manera relevante y complementaria para las decisiones clínicas sobre su prescripción en una patología determinada, aunque aún no se ha llegado a una conclusión de su utilidad al respecto.

Aunque, los estudios de investigación básica pueden dar un alto grado de precisión en el análisis, la extrapolación de resultados de experimentos *in vitro* y en animales a humanos, han presentado problemas para sus aplicaciones directas, ya que no existe correlación entre las diferentes ramas de investigación en una patología y una recomendación antioxidante, tratándose por el momento del auge únicamente, de los hallazgos reportados de forma experimental y que en los últimos años no se han podido confirmar a nivel poblacional con grupos específicos de estudio. Es decir, las investigaciones epidemiológicas son inexactas y confusas, y aunque los estudios observacionales ofrecen información de utilidad acerca de múltiples asociaciones con otros factores del consumo y duración del mismo, las valoraciones nutricionales son instrumentos que no pueden realmente distinguir entre los efectos de un alimento y aquellos de cualquier otro constituyente específico de la dieta. En cambio, el valor de las pruebas clínicas es más relevante para detectar beneficios aún pequeños, aunque en un tiempo relativamente corto (5-7 años), para su aplicación clínica en la población, pero los estudios epidemiológicos (con frecuencia, ampliamente difundidos entre la población), maximizan los efectos, y la industria farmacéutica los enfoca hacia la vía de la suplementación, último mensaje que llega a los pacientes.

Incluso, la evidencia de que las vitaminas antioxidantes juegan un papel importante en la reducción del riesgo de enfermedades crónicas, ha llevado a serias consideraciones acerca de la revisión de sus recomendaciones dietéticas. De hecho, inicialmente, su potencial eficacia se revisó durante la *Primer Conferencia Internacional sobre Vitaminas Antioxidantes y Beta caroteno en la Prevención de Enfermedades*, llevada a cabo en 1989 en Londres, y revalorándose en su segunda edición en 1994 en Berlín<sup>(17)</sup>, sin llegar a una conclusión.

Así, por ejemplo, a través del análisis de los datos disponibles, otros investigadores han propuestos que la disminución del riesgo de enfermedades isquémicas cardíacas a través de la nutrición puede ser posibles, cuando las concentraciones plasmáticas de vitamina C son >50 micromol/L, vitamina E es >30 micromol/L (estandarizado a los lípidos), y beta caroteno es >4 micromol/L, consistentes con otros reportes asociados con la reducción del riesgo de angina pectoris, y aunque es difícil especificar el consumo necesario de nutrientes para alcanzar estas concentraciones en un individuo, Gey<sup>(12)</sup>, intentó asociarlo con un consumo diario promedio de aproximadamente 150mg de vitamina C, 30mg de vitamina E y 3mg de beta caroteno, curiosamente mayores que las recomendaciones dietéticas permitidas, por lo que este año, la *Academia Nacional de Ciencias*, recomendó el moderado incremento en antioxidantes en la dieta, pero se abstuvo de prescribir megadosis de vitaminas y minerales para prevenir enfermedades crónicas, debido a la ausencia científica de bases para sus recomendaciones, y los resultados contradictorios en muchos de ellos, limitando la recomendación al consumo adecuado de frutas y vegetales, sin variar desde 1941, ya que al revisar estas recomendaciones se encuentra que todos los valores son fáciles de alcanzar con los mismos alimentos, sin necesidad de suplementos; además, es importante mencionar que el informe no recomienda un consumo diario ó tolerabilidad de beta-caroteno y otros carotenoides, citándose únicamente la ausencia de evidencia, y sugiriéndose que su suplementación podría ser usada sólo para prevenir la deficiencia de vitamina A. Por otra parte, las nuevas recomendaciones<sup>(152)</sup>, sustancialmente mayores a las necesarias para prevenir deficiencias, están basadas en un 80% de saturación de los leucocitos, nivel en el cual algunos científicos sienten podría tener beneficios preventivos más amplios, pero el problema es la ausencia de datos sólidos. Por ejemplo, una compañía en la

elaboración de licopene (un carotenoide encontrado en los tomates), anunció por vía Internet que previene el cáncer de próstata, citando entre otros estudios, uno publicado en 1995 en el *Journal of the National Cancer Institute*, aunque este estudio, como muchos otros en su campo, examinaba el consumo de alimentos, no de tabletas. Es decir, existe muy poca evidencia sobre el beneficio de los suplementos, por lo que podría pensarse que las dosis combinadas de multivitamínicos, así como un cambio en el estilo de vida, ejercicio y el diseño de pruebas en la que los individuos se sinergisen con estos 3 elementos, resuelvan la incógnita de algunos resultados ya publicados. De hecho, en México aún no existen datos disponibles a este respecto, ya que las correlaciones entre la elaboración de cuestionarios de frecuencias y concentraciones séricas de antioxidantes están apenas en investigación<sup>(153)</sup>.

Por lo tanto, aunque hemos encontrado múltiples usos de los antioxidantes, a dosis y tiempos bastante diversos, sin encontrar un punto común en la mayoría de los reportes, no hemos encontrado ninguna indicación absoluta de su uso (en cualquiera de sus modalidades), incluso se ha encontrado su uso en patologías donde se ha demostrado que no existe beneficio a base de suplementos, como es el caso de cáncer, diabetes y sus complicaciones (por lo menos a base de vitaminas), catarata, AVC, cardiopatía isquémica, hipertensión; en general, enfermedades en las que se ha encontrado un mayor beneficio del uso de medidas antioxidantes (que en algunas ocasiones forman parte del tratamiento subyacente, como en el caso de la EICI y aterosclerosis), y donde empieza una nueva línea de investigación al respecto.

## REFERENCIAS

1. Ewy GA; Antioxidant therapy for coronary artery disease: don't paint the walls without treating the termites!; *Arch Intern Med* 1999 Jun 28; 159: 1279-1280.
2. Radicales libres; *Nutrición y Salud. Lederle* 1996: 10-11.
3. Fernández-Bañares, F; Papel de los metabolitos de oxígeno reactivos en la patogenia de la enfermedad inflamatoria crónica intestinal; *Gastroenterología y Hepatología* 1995; 18 (10): 526-532.
4. Lozano-Nuevo, JJ; Rubio-Guerra AF; Rodríguez-López L; Radicales libres de oxígeno: Paradoja biológica; *Medicina Interna de México* 1993;9(2): 39-45.
5. Fuentes del Toro, S.; Antioxidantes; *Nutrición Clínica*; 1998. 1; Supp.1:10-12.
6. Cross, CE; Halliwell, B; et.al.; Oxygen Radicals and human disease; *Ann Intern Med* 1987; 107: 526-545.
7. Diplock AT; Safety of antioxidant vitamins and beta carotene; *Am J Clin Nutr* 1995; 62 (suppl):1510S-65S.
8. Sies H, Stahl W; Vitamins E and C, beta-carotene, and other carotenoids as antioxidants; *Am J Clin Nutr* 1995; 62 (suppl):1315S-21S.
9. Traber MG, Packer L; Vitamin E: beyond antioxidant function; *Am J Clin Nutr* 1995; 62(suppl): 1501S-95S.
10. Meyers DG, Maloley PA, Weeks D, et al.; Safety of antioxidants vitamins; *Arch Intern Med*, 1996; 156: 925-935.
11. Frei B; Reactive oxygen species and antioxidant vitamins: mechanisms of action; *Am J Med* 1994 Sep 26 97(suppl 3A): 5S-13S.
12. Blumberg JB; Considerations of the scientific substantiation for antioxidant vitamins and beta carotene in disease prevention; *Am J Clin Nutr* 1995; 62 (suppl): 1521S-1526S.
13. Wang X, Quinn PJ; Vitamin E and its function in membranes; *Prog Lipid Res* 1999; 38: 309-36.
14. Zhang X, Liu Q, Ha J; Protection of vitamine E against testis lipid peroxidation induced by iron and ethanol; *Wei Sheng Yen Chiu* 1998 May; 27 (3): 184-6.
15. Azzl A, Boscoboinik D, Marilley D; et al.; Vitamin E: a sensor and an information transducer of the cell oxidation state; *Am J Clin Nutr* 1995; 62(suppl):1337S-46S.
16. vanTits LJ, Demacker PN, De Graaf J; et al.; Alfa-tocopherol supplementation decreases production of superoxide and cytolines by leukocytes ex vivo in both normolipidemic and hipertriglyceridemic individuals; *Am J Clin Nutr* 2000;71:458-64.
17. Levine M, Rumsey SC, Daruwala R; et al.; Criteria and recommendations for vitamin C intake; *JAMA* 1999; 281: 1415-1423.
18. Carr AC, Frei B; Toward a new recommended dietary allowance for vitamin C based on antioxidant and health effects in humans; *Am J Clin Nutr* 1999 Jun; 69(6):1086-1107.
19. Simon JA, Hudes ES; The Third National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III): Serum ascorbic acid and gallbladder disease prevalence among US adults; *Arch Intern Med* 2000; 160: 931-936.
20. Simon JA, Grady D, Snabes MC; et al.; Ascorbic acid supplement use and the prevalence of gallbladder disease; *J Clin Epidemiol* 1998; 51:257-265.
21. Zollinger PE, Tuinebreijer WE, Kreis RW; et al.; Effect of vitamin C on frequency of reflex sympathetic dystrophy in wrist fractures: a randomised trial; *Lancet* 1999 Dec 11; 354: 2025-28.
22. Pradeep JK, Kehinde EO; Syntomatic response to ascorbic acid; *Br J Urol* 1996; 77: 319-320.
23. Greenberg ER, Sporn MB; Antioxidant vitamins, cancer, and cardiovascular disease; *N Engl J Med* 1996, 334 (18): 1189-90.
24. Russell RM; The vitamin A spectrum: from deficiency to toxicity; *Am J Clin Nutr* 2000; 71:878-84.
25. Neurenberg DW, Dain BJ, Mott LA; et al.; Effects of 4 y of oral supplementation with beta-carotene on serum concentrations of retinol, tocopherol, and five carotenoids; *Am J Clin Nutr* 1997 Aug; 66(2):315-9.
26. Niki E, Noguchi N, Tsuchihashi H, Gotoh N; Interaction among vitamin C, vitamin E, and beta-carotene; *Am J Clin Nutr* 1995; 62(suppl):1322S-1326S.
27. Rowe PM; Beta-carotene takes a collective beating; *The Lancet* ;Jan 27 1996, 347:249.



28. Hughes DA; Effects of carotenoids on human immune function; *Proc Nutr Soc* 1999 Aug; 58(3):713-8.
29. Paolini M, Cantelli-Forti G; Co-carcinogenic effect of beta-carotene; *Nature* 1999; 398:760-761.
30. Vatassery GT; Vitamin E and other endogenous antioxidants in the central nervous system; *Geriatrics* 1998; 53 (suppl 1): 255-275.
31. Martínez-Lascano JC, Pérez-Severiano F, Galván-Arzate S, et al.; Efecto protector del cobre en un modelo experimental de la enfermedad de Huntington inducido por ácido quinolinico en rata; *Arch Neuroc*, 1998, 3 (suppl): sinv-56.
32. Boli-Woehnen C, Sotelo-Morales J, Ríos-Castañeda C; Reducción de la actividad ferroxidasa de la ceruloplasmina (CP) en el LCR de pacientes con enfermedad de Parkinson. *Arch Neuroc* 1998: sinv-61.
33. Girodon F; Galan P, Monget A-L; et al.; Impact of trace elements and vitamin supplementation on immunity and infections in institutionalized elderly patients; *Arch Intern Med* 1999; 159: 748-754.
34. Gillissen A, Nowak D; Characterization of N-acetylcysteine and ambroxol in anti-oxidant therapy; *Respir Med* 1998 Apr, 92(4): 609-23.
35. Prasad KN, Cole WC, Hovland AR, et al.; Multiple antioxidants in the prevention and treatment of neurodegenerative disease: analysis of biologic rationale; *Curr Opin Neurol* 1999; 12: 761-770.
36. van Schayck CP, Dekhuijzen PNR, Gorgels WJM; et al.; Are anti-oxidant and anti-inflammatory treatments effective in different subgroups of COPD? A hypothesis; *Resp Med* 1998: 1259-1264.
37. Ito M, Suzuly Y, Ishihara M; Anti-ulcer effects of antioxidants: effect of probucol; *Eur J Pharmacol*, 1998 Aug, 354: 2-3, 189-96.
38. Denton CP, Bunce TD, Darado MB, et al.; Probuco improves symptoms and reduces lipoprotein oxidation susceptibility in patients with Raynaud's phenomenon; *Rheumatology (Oxford)*, 1999 Apr, 38 (4):309-15.
39. Baynes JW; Role of oxidative stress in development of complications in diabetes; *Diabetes* 1991, 40: 405-12.
40. Rocchi E, Casalgrandi G, Masini A; et al.; Circulating pro- and antioxidant factors in iron and porphyrin metabolism disorders; *Ital J Gastroenterol Hepatol* 1999 Dec; 31(9):861-7.
41. Kokcam I, Naziroglu M; Antioxidants and lipid peroxidation status in the blood of patients with psoriasis; *Clin Chim Acta* 1999 Nov; 289 (1-2): 23-31.
42. Ogihara H; Ogihara T, Miki M; et al.; Plasma Koper and antioxidant status in Wilson's disease; *Pediatr Res* 1995 Feb; 37(2): 219-226.
43. Cerruti PA; Oxy-radicals and cancer; *The Lancet* 1994 Sep 24; 344(8926): 862-3.
44. Mates JM, Sánchez-Jiménez FM; Role of reactive oxygen species in apoptosis: implications for cancer therapy; *Int J Biochem Cell Biol* 2000 Feb; 32(2): 157-70.
45. Ahmad MI, Fayed ST, Hossein H, et al.; Lipid peroxidation and antioxidant status in human cervical carcinoma; *Dis Markers* 1999 Dec; 15(4): 283-91.
46. Muto Y, Fuji J, Shidoji Y; et al.; Growth retardation in human cervical dysplasia-derived cell lines by beta-carotene through down-regulation of epidermal growth factor receptor; *Am J Clin Nutr* 1995; 62(suppl):1535S-40S.
47. Wei Q, Matanoski GM, Farmer ER; et al.; Vitamin supplementation and reduced risk of basal cell carcinoma; *J Clin Epidemiol* 1994; 47:829-36.
48. M van Dam Rob, Huang Z, Giovannucci E; et al.; Diet and basal cell carcinoma of the skin in a prospective cohort of men; *Am J Clin Nutr* 2000; 71:135-41.
49. Zhang S, Hunter DJ, Forman MR; et al.; Dietary carotenoids and vitamins A, C, and E and risk of breast cancer; *J Natl Cancer Inst* 1999 Mar 17; 91(6):547-56.
50. Botterweck AA, van den Brandt PA, Goldbohm RA; Vitamins, carotenoids, dietary fiber, and the risk of gastric carcinoma: results from a prospective study after 6.3 years of follow-up; *Cancer* 2000 Feb 15; 88(4): 737-48.
51. Voornips LE, Goldbohm RA, Brants HA; et al.; A prospective cohort study on antioxidant and folate intake and male lung cancer risk; *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2000 Apr; 9(4):357-65.
52. 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 cancers in male smokers; *N Engl J Med* 1996; 330:1029-35.

53. Hennekens CH, Buring JE, Manson JE; et al.; Lack of effect of long-term supplementation with beta carotene on the incidence of malignant neoplasms and cardiovascular disease; *N Engl J Med* 1996; 334:1145-9.
54. 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; 334:1150-5.
55. Hennekens CH; Antioxidant vitamins and cancer; *Am J Med* 1994 Sep 26; 97 (suppl 3A):2S-4S.
56. Lamson DW, Brignall MS; Antioxidants in cancer therapy; their actions and interactions with oncologic therapies; *Altern Med Rev* 1999 oct; 4(5): 304-29.
57. Weisburger JH; Mechanisms of action of antioxidants as exemplified in vegetables, tomatoes and tea; *Food Chem toxicol*, 1999 Sep; 37(9-10): 943-8.
58. Taddei S, Virdis A, Ghiadoni L; et al.; Vitamin C improves endothelium-dependent vasodilation by restoring nitric oxide activity in essential hypertension; *Circulation* 1998 Jun 9; 97: 2222-2229.
59. Wen Y, Killalea S, McGettigan P, Feely J; Lipid peroxidation and antioxidant vitamins C and E in hypertensive patients; *Ir J Med Sci* 1996 Jul-Sep; 165 (3):210-212.
60. Duffy SJ, Gokce N, Holbrook M, et al.; treatment of hypertension with ascorbic acid; *The Lancet* 1999 Dec 11; 354: 2048-2049.
61. Fotherby MD, Williams JC, Forster LA; et al.; Effect of vitamin C on ambulatory blood pressure and plasma lipids in older persons; *J Hypertens* 2000 Apr; 18 (4): 411-415.
62. Carr AC, Zhu B-Z, Frei B; Potential antiatherogenic mechanisms of ascorbate (vitamin C) and alpha-tocopherol (vitamin E); *Circulation Res* 2000; 87:349.
63. Thomas SR, Neuzil J, Mohr D; Coantioxidants make alpha-tocopherol an efficient antioxidant for low-density lipoprotein; *Am J Clin Nutr* 1995; 62(suppl):1357S-1364S.
64. Kritchevsky SB, Shimakawa T, Tell GS; et al.; Dietary antioxidants and carotid artery wall thickness: The ARIC study; *Circulation* 1995 Oct 15; 92(8):2141-2150.
65. Kritchevsky SB, Tell GS, Shimakawa T; et al.; Provitamin A carotenoid intake and carotid artery plaques: the Atherosclerosis Risk in Communities Study; *Am J Clin Nutr* 1998 Sep; 68(3): 726-733.
66. Klipstein-Grobush K, Launer LJ, Geleijnse JM, et al.; Serum carotenoids and atherosclerosis. The Rotterdam Study; *Atherosclerosis* 2000 Jan; 148(1): 49-56.
67. Lonn EM, Yusuf S, Doris CI; et al.; Study design and baseline characteristics of the study to evaluate carotid ultrasound changes in patients treated with ramipril and vitamin E: SECURE. *Am J Cardiol* 1996 Oct 15; 78(8): 914-9.
68. Gale CR, Martyn CHN, Winter PD; et al.; Vitamin C and risk of death from stroke and coronary heart disease in cohort of elderly people; *BMJ* 1995 Jun 17; 310:1563-1566.
69. Leppala JM, Virtamo J, Fogelholm R; et al.; Different risk factors for different stroke subtypes: association of blood pressure, cholesterol, and antioxidants; *Stroke* 1999 Dec; 30(12): 2535-2540.
70. El Kossi MM, Zakhary MM; Oxidative stress in the context of acute cerebrovascular stroke; *Stroke* 2000 Aug; 31 (8): 1889-1892.
71. Leppala JM, Virtamo J, Fogelholm R; et al.; Controlled trial of alpha-tocopherol and beta-carotene supplements on stroke incidence and mortality in male smokers; *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000 Jan; 20(1): 230-235.
72. Yochum LA, Folsom AR, Kushi LH; Intake of antioxidant vitamins and risk of death from stroke in postmenopausal women; *Am J Clin Nutr* 2000 Aug; 72(2):476-483.
73. Ascherio A, Rimm EB, Hernan MA; et al.; Relation of consumption of vitamin E, vitamin C, and carotenoids to risk for stroke among men in the United States; *Ann Intern Med* 1999 Jun 15; 130(12): 963-970.
74. Ford ES; Serum copper concentration and coronary heart disease among US Adults; *Am J Epidemiol* 2000;151: 1182-1188.
75. Padayatty SJ, Levine M; Vitamin C and myocardial infarction: the heart of matter; *Am J Clin Nutr* 2000; 71: 1027-1028.
76. Stephens NG, Parsons A, Schofield PM; Randomised controlled trial of vitamin E in patients with coronary disease: Cambridge Heart Antioxidant Study (CHAOS); *The Lancet* 1996 March 23; 347: 781-786.
77. Stampfer MJ, Hennekens CH, Manson JE; Vitamin E consumption and the risk of coronary disease in women; *N Engl J Med* 1993, May 20; 328(20):1444-9.

78. Klipstein-Grobusch K, Geleijnse JM; Dietary antioxidants and risk of myocardial infarction in the elderly: The Rotterdam Study; *Am J Clin Nutr* 1999 Feb; 69(2):261-6.
79. Zakirova AN; Shamaev AG, Mirinkova NA; Antioxidant probucol: effects on free radical lipid peroxidation, blood rheology and course of angina pectoris; *Ter Arkh* 1998, 70(1): 29-32.
80. Rumi G Jr, Szabo I, Vincza A; et al.; Decrease of serum carotenoids in Crohn's disease; *J Physiol Paris* 2000 Mar-Apr; 94(2): 159-61.
81. Christen WG; Antioxidants and eye disease; *Am J Med* 1994 Sep 26; 97(suppl 3A): 145-175.
82. Wynn M, Wynn A; Can improved diet contribute to prevention of cataract?; *Nutr Health* 1996; 11(2):87-104.
83. Knekt P, Heliövaara M, Rissanen A; et al.; Serum antioxidant vitamins and risk of cataract; *BMJ* 1992 Dec 5; 305: 1392-4.
84. Hesecker H; Antioxidative vitamins and cataracts in the elderly; *Z Ernährungswiss* 1995 Sep; 34(3): 167-76.
85. Jacques PF; The potential preventive effects of vitamins for cataract and age-related macular degeneration; *Int J Vitam Nutr Res* 1999 May; 69(3):198-205.
86. Seddon JM, Christen WG, Manson JE; et al.; The use of vitamin supplements and the risk of cataract among US male physicians; *Am J Public Health* 1994 May; 84 (5): 788-92.
87. Seddon JM, Ajani UA, Sperduto RD; et al.; Dietary carotenoids, vitamins A, C, and E, and advanced age-related macular degeneration. Eye Disease Case-Control Study Group; *JAMA* 1994 Nov 9; 272 (18): 1413-20.
88. Lyle BJ, Mares-Perlman JA, Klein BE; et al.; Serum carotenoids and tocopherols and incidence of age-related nuclear cataract; *Am J Clin Nutr* 1999 Feb; 69 (2):272-7.
89. Lyle BJ, Mares-Perlman JA, Klein BE; et al; Antioxidant intake and risk of incident age-related nuclear cataracts in the Beaver Dam Eye Study; *Am J Epidemiol* 1999 May 1; 149 (9):801-9.
90. Bates CJ, Chen SJ, Macdonald A; et al.; Quantitation of vitamin E and a carotenoid pigment in cataractous human lenses, and the effect of a dietary supplement; *Int J Vitam Nutr Res* 1996; 66(4):316-21.
91. Tavani A, Negri E, La Vecchia C; Food and nutrient intake and risk of cataract; *Ann Epidemiol* 1996 Jan; 6(1):41-6.
92. Johnson EJ, Hammond BR; Yeum KJ; et al.; Relation among serum and tissue concentrations of lutein and zeaxanthin and macular pigment density; *Am J Clin Nutr* 2000 Jun; 71(6):1555-62.
93. Buhl R; Meyer A; Vogelmeier C; Oxidant-protease interaction in the lung: Prospects for antioxidant therapy; *Chest* 1996; 110: 2675-2725.
94. Gadek JE, Pacht ER; The interdependence of lung antioxidants and antiprotease defense in ARDS; *Chest* 1996 Dec (suppl); 110(6): 2735-2775.
95. Powell CV, Nash AA, Powers HJ, Primhak RA; Antioxidant status in asthma; *Pediatr Pulmonol* 1994 Jul; 18(1):34-8.
96. Gibbs BF, Schmutzler W, Vollrath IB, et al.; Ambroxol inhibits the release of histamine, leukotrienes and cytokines from human leukocytes and mast cells; *Inflamm Res*, 1999 Feb, 48(2): 86-93.
97. Suzuki M, Teramoto S, Matsuse T, et al.; Inhibitory effect of ambroxol on superoxide anion production and generation by murine lung alveolar macrophages; *J Asthma* 1998, 35(3): 267-72.
98. Alonso de la Vega JM, Díaz J, Serrano E, et al.; Plasma redox status relates to severity in critically ill patients; *Crit Care Med* 2000; 28(6):1812-1814.
99. Victor VV; Gauerbas N; Puerto M; et al.; Ascorbic acid modulates in vitro the function of macrophages from mice with endotoxic shock; *Immunopharmacology* 2000 Jan; 46(1):89-101.
100. Goldring JP; Ramoshebi LN; Glucocorticoids, antioxidants and staurosporine modulate the adherence between monocytes and malaria infected erythrocytes; *Inflamm Res* 1999 Dec; 48 (12): 657-61.
101. Freeman BD, Reaume AG, Swanson PE; et al.; Role of CuZn superoxide dismutase in regulating lymphocyte apoptosis during sepsis; *Crit Care Med* 2000; 28 (6): 1701-1708.

102. Molnar Z, Shearer E, Lowe D; N-acetylcysteine treatment to prevent the progression of multisystem organ failure: A prospective, randomized, placebo-controlled trial. *Crit Car Med* 1999; 27:1100-1104.
103. Prasad NK, Hovland AR, Coie WC, et al.; Multiple antioxidants in the prevention and treatment of Alzheimer disease: analysis of biologic rationale; *Clin Neuropharmacol* 2000 Jan-Feb; 23 (1): 2-13.
104. Delanty N, Dichter MA; Antioxidant therapy in neurologic disease; *Arch Neurol* 2000; 57: 1265-1270.
105. Rojas-Castañeda P, Hidalgo-Pareja J; Participación de la metalotioneína I+II en los mecanismos de protección en un modelo experimental de la enfermedad de Parkinson; *Arch Neurol*, 1998, 3 (suppl): sinv-4.
106. Jenner P; Oxidative damage in neurodegenerative disease; *The Lancet* 1994 Sep 17; 344: 796-98.
107. The Rotterdam Study; Dietary antioxidants and Parkinson disease; *Arch Neurol* 1997 Jun; 54: 762-765.
108. Logroscino G, Marder K, Cote L; et al.; Dietary lipids and antioxidants in Parkinson's disease: a population-based, case-control study; *Ann Neurol* 1996 Jan; 39(1):89-94.
109. Morens DM, Grandinetti A, Waslien CL; et al.; Case-control study of idiopathic Parkinson's disease and dietary vitamin E intake; *Neurology* 1996 May; 46(5): 1270-1274.
110. Shoulson I; DATATOP: a decade of neuroprotective inquiry. Parkinson Study Group. Deprenyl And Tocopherol Antioxidative Therapy Of Parkinsonism; *Ann Neurol* 1998 Sep; 44(3 suppl 1): S160-6.
111. Fahn S; A pilot trial of high-dose alpha-tocopherol and ascorbate in early Parkinson's disease; *Ann Neurol* 1992; 32:S128-132.
112. Vatassery GT, Fahn S, Kuskowski MA; Alpha tocopherol in CSF of subjects taking high-dose vitamin E in the DATATOP study. Parkinson Study Group; *Neurology* 1998 Jun; 50(6): 1900-2.
113. Smith MA, Rottkamp CA, Nunomura A; et al.; Oxidative stress in Alzheimer's disease; *Bioch et Biophy Act (BBA)/ Mol Basis of Dis* 2000; 1502: 139-144.
114. Grundman M; Vitamin E and Alzheimer disease: the basis for additional clinical trials; *Am J Clin Nutr* 2000 Feb; 71 (2): 630S-636S.
115. Paraskevas GP, Kapaki E; Libitaki G; et al.; Ascorbate in healthy subjects, amyotrophic lateral sclerosis and Alzheimer's disease; *Acta Neurol Scand* 1997; 96: 88-90.
116. Christen Y; Oxidative stress and Alzheimer disease; *Am J Clin Nutr* 2000 Feb; 71(2): 621S-629S.
117. Burke JR, Morgenlander JC; Update on Alzheimer's disease: Promising advances in detection and treatment; *Postgrad Med* 1999 Oct 15; 106(5): 85-94.
118. Sano M, Ernesto C, Thomas RG, et al.; A controlled trial of selegiline, alpha-tocopherol, or both as treatment for Alzheimer's disease. The Alzheimer's Disease Cooperative Study; *N Engl J Med* 1997 Apr 24; 336(17):1216-22.
119. Reider CR, Paulson GW; Lou Gehring and Amyotrophic lateral sclerosis: is vitamin E to be revisited?; *Arch Neurol* 1997 Jun; 54:527-28.
120. Cernak I, Savic VJ, Kotur J; et al.; Characterization of plasma magnesium concentration and oxidative stress following graded traumatic brain injury in humans; *J Neurotrauma* 2000 Jan; 17(1): 53-68.
121. Leer HA, Messmer K; Rationale for the use of antioxidant vitamins in clinical organ transplantation; *Transplantation* 1996 Nov 15; 62(9): 1197-9.
122. Wan S; LeClerc J-L; Vincent J-L; Inflammatory response to cardiopulmonary bypass: mechanisms involved and possible therapeutic strategies; *Chest* 1997; 112 (3):676-92.
123. Sokol RJ, Hoffenberg EJ; Antioxidants in pediatric gastrointestinal disease; *Pediatr Clin North Am* 1996 Apr; 43 (2): 471-88.
124. Clemens MR, Waladkhani AR, Bublitz K; et al.; Supplementation with antioxidants prior to bone marrow transplantation; *Wien Klin Wochenschr* 1997 Oct 17; 109(19): 771-6.

125. Jonas CR, Puckett AB, Jones DP; et al.; Plasma antioxidant status after high dose chemotherapy: a randomized trial of parenteral nutrition in bone marrow transplantation patients; *Am J Clin Nutr* 2000 July; 72(1): 181-189.
126. Liu S, Ajani U, Chae C; et al.; Long-term beta-carotene supplementation and risk of type 2 diabetes mellitus: a randomized controlled trial; *JAMA* 1999; 282: 1073-1075.
127. Ting HH, Timimi FK, Boles KS; et al.; Vitamin C improves endothelium-dependent vasodilation in patients with non-insulin-dependent Diabetes Mellitus; *J Clin Invest* 1996, 97 (1):22-28.
128. Nourooz-Zadeh J, Tajaddini-Sarmadi J, McCarthy S; et al.; Elevated levels of authentic plasma hydroperoxides in NIDDM; *Diabetes* 1995, 44:1054-1058.
129. Facchini FS, Hemphreys MH, DoNascimento CA; et al.; Relation between insulin resistance and plasma concentrations of lipid hydroperoxides, carotenoids, and tocopherols; *Am J Clin Nutr* 2000 Sep; 72(3):776-779.
130. Collier A, Rumley A, Rumley AG; et al.; Free radical activity and hemostatic factors in NIDDM patients with and without microalbuminuria; *Diabetes* 1992, 41: 909-913.
131. Ziegler D, Gries FA; Alfa-lipoic acid in the treatment of diabetic peripheral and cardiac autonomic neuropathy; *Diabetes* 1997 46(suppl 2):S62-S66.
132. Nagamatsu M, Nickander KK, Schmelzar JD; et al.; Lipolic acid improves nerve blood flow, reduces oxidative stress and improves distal nerve conduction in experimental diabetic neuropathy; *Diabetes Care* 1995, 18: 1160-1167
133. Ziegler D, Hanefeld M, Ruhnau KJ; et al.; The ALADIN Study Group: Treatment of symptomatic diabetic peripheral neuropathy with the anti-oxidant alpha-lipoic acid: a 3-week randomized controlled trial (ALADIN Study). *Diabetologia* 1995, 38: 1425-1433.
134. Ziegler D, Conrad F, Ulrich H; et al.; The DEKAN Study Group: Effects of treatment with the antioxidant alpha-lipoic acid on cardiac autonomic neuropathy in NIDDM patients: a 4-month randomized controlled multicenter trial (DEKAN Study). *Diabetes Care* 1997, 20: 369-373.
135. Niaz MA, Singh RB; Modulation of free radical stress in human red blood cell membrane by forskoll and the prospects for treatment of cardiovascular disease and diabetes; *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 1999 Dec; 45 (8): 1203-7.
136. Kowluru RA, Engerman RL, Kern TS; Diabetes-induced metabolic abnormalities in myocardium: effect of antioxidant therapy; *Free Radic Res*, 2000 Jan; 32 (1): 67-74.
137. Nachbar F, Korting HC; The role of vitamin E in normal and damaged skin; *J Mol Med* 1995 Jan; 73(1): 7-17.
138. Kligman AM; Topical treatments for photoaged skin: separating the reality from the hype; *Postg Med*; 1997 Aug; 102 (2):115-126.
139. Griffiths CE; Drug treatment of photoaged skin; *Drugs Aging* 1999 Apr; 14(4):289-301.
140. Emerit I; Free radicals and aging of the skin; *EXS* 1992; 62: 328-41.
141. Fryer MJ; Evidence for the photoprotective effects of vitamin E; *Photochem Photobiol* 1993 Aus; 58 (2):304-12.
142. Wolf R, Wolf D, Ruocco V; Vitamin E: the radical protector; *J Eur Acad Dermatol Venereol* 1998 Mar; 10(2):103-17.
143. Jurkiewicz BA, Bissett DL, Buettner GR; Effect of topically applied tocopherol on ultraviolet radiation-mediated free radical damage in skin; *J Invest Dermatol* 1995 Apr; 104 (4): 484-8.
144. Eberlein-Konig B, Placzek M, Przybilla B; Protective effect against sunburn of combined systemic ascorbic acid (vitamin C) and d-alpha-tocopherol (vitamin E); *J Am Acad Dermatol* 1998 Jan; 38 (1):45-8.
145. Darr D, Dunston S, Faust H, Pinnell S; Effectiveness of antioxidants (vitamin C and E) with and without sunscreens as topical photoprotectants; *Acta Derm Venereol* 1996 Jul; 76(4):264-8.
146. Darr D, Dunston S, Faust H; Effectiveness of antioxidants (vitamin C and E) with and without sunscreens as topical photoprotectants; *Acta Derm Venereol* 1996 Jul; 76(4):264-8.
147. Grundmann JU, Gollnick H; Prevention of ultraviolet ray damage: external and internal sunscreens; *Ther Umsch* 1999 Apr; 56 (4):225-32.
148. Traikovitch SS; Use of topical ascorbic acid and its effects on photodamaged skin topography; *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1999 Oct; 125(10): 1091-8.

149. Hoppe U, Bergemann J, Diembeck W; et al.; Coenzyme Q10, a cutaneous antioxidant and energizer; *Biofactors* 1999; 9(2-4): 371-8.
  150. Buetier TM, Cottet-Maire F, Krauskopf A; Does cyclosporin A generate free radicals?; *Trends in Pharmacological Sciences* 2000; 21:288-290.
  151. Clarkson PM; Thompson HS; Antioxidants: what role do they play in physical activity and health?; *Am J Clin Nutr* 2000 Aug; 72(2):637-646.
  152. Reynolds T; Antioxidants and cancer: what is the evidence?; *J Natl Cancer Inst* 2000 July 5, 92 (13): 1033-34.
  153. Romieu I, Parra S, Hernández JF; et al.; Questionnaire assessment of antioxidants and retinol intakes in Mexican women; *Arch Med Res* 1999 May-Jun; 30 (3):224-39.
- Blot WJ, Li J-Y, Taylor PR; et al.; Nutrition intervention trials in Lixian China: supplementation with specific vitamin/ mineral combinations, cancer incidence and disease-specific mortality in the general population; *J Natl Cancer Inst* 1993; 85:1483-92.
  - Chasan-Traber L, Willett WC, Seddon JM; et al.; A prospective study of carotenoid and vitamin A intakes and risk of cataract extraction in US women; *Am J Clin Nutr* 1999 Oct; 70(4): 509-16.
  - Brown L, Rimm EB, Seddon JM; et al.; A prospective study of carotenoid and vitamin A intake and risk of cataract extraction in US men; *Am J Clin Nutr* 1999 Oct; 70(4): 517-524.
  - Mortality in DATATOP: a multicenter trial in early Parkinson's disease. Parkinson Study Group; *Ann Neurol* 1998 Mar; 43(3):318-325.
  - Watkins ML, Erickson JD, Thun MJ, et al.; Multivitamin use and mortality in a large prospective study; *Am J Epidemiol* 2000 Jul 15; 152(2): 149-162.