

La evolución del concepto de radicales libres en biología y medicina

Discurso de ingreso en la Academia Iberoamericana de Farmacia

ALBERTO BOVERIS

Sevilla, 17 de marzo de 2005

RESUMEN

El concepto químico de radical libre estaba bien desarrollado en 1954, cuando Gerschman postuló a los radicales libres del oxígeno ($O_2^{\cdot-}$ y HO^{\cdot}) como responsables del mecanismo molecular de la toxicidad del oxígeno y la radiación. El descubrimiento de la superóxido dismutasa por McCord y Fridovich (1969) abrió la etapa actual de conocimiento del papel biológico de los radicales libres. El reconocimiento por Boveris, Cadenas y Chance en 1972-76, de que las mitocondrias producen $O_2^{\cdot-}$ y H_2O_2 en condiciones fisiológicas complementó las observaciones sobre las superóxido dismutasas y ambas líneas de investigación llevaron a un muy amplio interés en los radicales libres oxidativos en condiciones patológicas. El concepto de estrés oxidativo, definido como un aumento de oxidantes o una disminución de antioxidantes que conducen igualmente a un daño oxidativo y a una disfunción celular, permitió establecer la asociación entre el estrés oxidativo y una treintena de enfermedades y situaciones clínicas.

PALABRAS CLAVE: Radicales libres. Superóxido dismutasas. Mitocondrias. Estrés oxidativo. Antioxidantes. Vitamina C. Vitamina E.

1. El concepto de radical libre estaba bien desarrollado en la química orgánica de 1950.

Los estudios clásicos de Gomberg (1900) y de Paneth (1923) habían mostrado la existencia en fase gaseosa de arreglos moleculares relativamente estables conteniendo un electrón desapareado en sus órbitas de valencia. Estos arreglos moleculares, productos de rupturas hemolíticas, correspondían a los radicales trifenilmetilo y alquilo, los que se simbolizaron como $(Fen)_3-C^{\cdot}$ y como R^{\cdot} , para indicar con el punto al electrón desapareado, y se denominaron *radicales libres* para diferenciarlos de los idénticos grupos moleculares *fijos* en las moléculas orgánicas. En sus estudios de formación de ácido bromhídrico a partir de bromo e hidrógeno en fase gaseosa, Rice y Herzfeld (1934) clasificaron a las reacciones que involucran radicales libres en reacciones de iniciación, propagación, inhibición y terminación, en las que, respectivamente, se

forma un radical libre o centro de reacción, se conserva el número de radicales libres con formación de productos o desaparición de reactivos, se conserva el número de radicales libres con desaparición de producto, y desaparecen dos radicales libres por aniquilación y combinación de sus dos electrones desapareados. La nomenclatura de Rice-Herzfeld se utiliza actualmente en bioquímica, donde hablamos de reacciones de propagación o adición y de terminación para el proceso de peroxidación lipídica y el efecto de los antioxidantes. La reacción de formación de agua a partir de hidrógeno y oxígeno disparada por una chispa eléctrica había tenido perplejos a los químicos por años, dada su naturaleza explosiva o no, dependiendo de la forma y el tamaño del recipiente de reacción. Independientemente, Hinshelwood en Inglaterra y Semenov en Rusia, resolvieron el acertijo con una formulación basada en átomos o radicales libres del hidrógeno y del oxígeno, por lo

que recibieron el Premio Nobel de Química de 1956.

En 1939, Leonor Michaelis propuso que la oxidación de *todas* las moléculas orgánicas bivalentes ocurre con la formación de un radical libre intermediario y fue capaz de mostrar por titulación oxidante la formación de las semiquinonas en la oxidación de las benzoquinonas y naftoquinonas. En las palabras de Szent Gyorgyi, «si bien los electrones van de a dos, como los animales en el arca de Noé, cuando pasan de molécula a molécula, como los animales al pasar la puerta de entrada al arca, lo hacen de a uno, con una separación entre uno y otro». En 1946, Michaelis describió la reducción univalente secuencial del oxígeno como mecanismo molecular de cuatro pasos de transferencia de un electrón, con formación de radical superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), y radical hidroxilo ($HO\cdot$) como los intermediarios de la reducción parcial del oxígeno y con formación de agua como producto final y de reducción total.



Otra importante contribución de Michaelis, publicada en 1950 después de su muerte, fue la identificación de la semiquinona de la vitamina E. En ese tiempo, el concepto de la reducción parcial del oxígeno fue considerado teórico y no aplicable a la biología, opacado por el monumental trabajo de Warburg que había identificado al «fermento respiratorio», nuestra actual citocromo oxidasa, como responsable del consumo de oxígeno de animales y levaduras y al agua como el producto de la reducción del oxígeno.

2. La teoría de Gerschman de la toxicidad del oxígeno y de su mecanismo molecular.

En 1954, Rebeca Gerschman, discípula de Bernardo Houssay y trabajando en la Universidad de Rochester, publicó en Science un artículo imaginativo y trascendente «Oxygen poisoning and X-irradiation: a mechanism in common»⁽¹⁾. La hipótesis se basaba por un lado, en el efecto sinérgico del oxígeno hiperbárico y de la radiación X y en la prolonga-

ción de la vida de ratones sometidos a oxígeno hiperbárico (más de 101.3 kPa O_2) por tratamiento con radio-protectores conocidos (sustancias con grupos tioles y antioxidantes). Por otro lado la hipótesis integraba el conocimiento del similar daño histológico producido por la radiación y la hiperoxia, el concepto de la reducción parcial del oxígeno de Michaelis y el conocimiento de que la radiólisis del agua produce O_2^- , H_2O_2 y $HO\cdot$. La «teoría de Gerschman» como fue conocida en su momento postulaba que: (a) los radicales libres del oxígeno son el mecanismo común de las toxicidades del oxígeno y de la radiación; (b) un aumento en la presión parcial de oxígeno o una disminución de la defensa antioxidante llevan igualmente al daño celular y tisular; y (c) la toxicidad del oxígeno es un fenómeno continuo. Este último punto, el del efecto continuo, se ilustra en la Fig. 1 donde puede verse la supervivencia de ratones alineada en un gráfico doble logarítmico con la presión de oxígeno desde la presión de oxígeno del aire hasta 1 MPa.

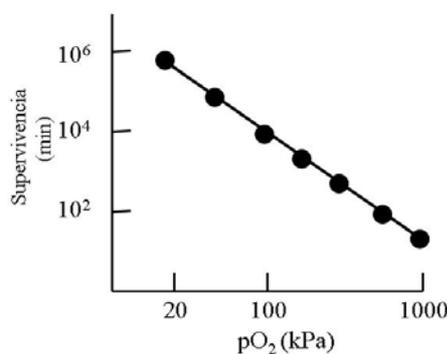


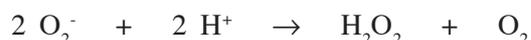
Fig. 1. Las presiones elevadas de oxígeno (hiperoxia) son tóxicas para los animales. La supervivencia de ratones está determinada por la presión parcial de oxígeno del aire inspirado. Tiempos de supervivencia: 0.2 atm, 18 semanas; 1 atm, 33 horas; 10 atm, 30 minutos. Datos de Gerschman y Boveris (1964)

La teoría de Gerschman no fue aceptada en su momento considerando que los radicales libres eran demasiado reactivos y tóxicos para existir en los sistemas biológicos en condiciones fisiológicas. Químicamente, el oxígeno era reconocido como un oxidante y la radiación era conocida como reductora debido a los electrones producidos en la radiólisis

del agua. Adicionalmente, en ese tiempo, no había un reconocimiento del papel de la mujer en la ciencia, como está consignado por F. Crick en «*The double helix*».

3. El descubrimiento de la superóxido dismutasa y de la producción mitocondrial de peróxido de hidrógeno.

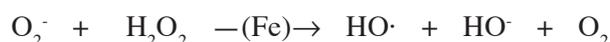
Es claro que el punto de partida del entendimiento y del conocimiento moderno del papel de los radicales libres en los sistemas biológicos esta dado por el descubrimiento de la enzima superóxido dismutasa (SOD) por McCord y Fridovich en 1969⁽²⁾. La enzima fue aislada de eritrocitos y se determinó que catalizaba la reacción:



La producción de O_2^- para determinar la actividad enzimática se hacia con xantino-oxidasa, una conocida enzima del hígado. La existencia de la superóxido dismutasa implicó el reconocimiento inmediato de la existencia fisiológica del radical superóxido, basado en la teleología de que la enzima implica la existencia del sustrato. Desde el punto de vista químico la reacción es una dismutación de dos moléculas de radical superóxido (O_2^-), donde una molécula se oxida a O_2 y la otra se reduce a H_2O_2 , con procesos simultáneos de oxidación y reducción. Interesantemente, la proteína ya había sido aislada por Keilin en 1943 y llamada eritrocupreína, y su acción enzimática, como atrapamiento de radicales de oxígeno, observada por Totter y Prodanov en Montevideo en 1955.

El descubrimiento de la Cu,Zn-SOD de los eritrocitos fue rápidamente seguido por el reconocimiento de similares Cu,Zn-SOD en el citosol de las células eucariotas y de Mn-SOD en las bacterias y en las mitocondrias de las células eucariotas. Al mismo tiempo fue adquiriendo vigencia el «dogma de Fridovich»⁽³⁾ donde las enzimas SOD y catalasa constituyen la defensa antioxidante principal de las células aerobias contra la toxicidad del oxígeno. Las dos enzimas poseen un efecto sinérgico al eliminar al O_2^- y al H_2O_2 de los siste-

mas biológicos. El mecanismo molecular por el cual ambos productos de la reducción parcial del oxígeno ejercen su toxicidad biológica se explicó (a) tomando reacciones descritas por Fenton (1890) y Haber y Weiss (1934) donde el O_2^- y el H_2O_2 reducen y oxidan al hierro (Fe), omnipresente en los sistemas biológicos, con generación de radical $HO\cdot$, como producto de la escisión hemolítica del H_2O_2 , y (b) considerando la altísima reactividad química del $HO\cdot$ que hace una abstracción de hidrógeno, una oxidación, en cualquier colisión molecular con una biomolécula.



El dogma de Fridovich se aplicó a las bacterias y generó una discriminación racional entre bacterias aerobias, que contienen SOD y catalasa, bacterias anaerobias, que no contienen ni SOD ni catalasa, y micro-aerófilas que contienen SOD y no contienen catalasa⁽⁴⁾. La Mn-SOD de la matriz mitocondrial se tomó como una marca del camino de la evolución biológica y de la simbiosis de bacterias y células eucariotas primitivas.

En 1972-73, Boveris y Chance describieron la producción mitocondrial de H_2O_2 en mitocondrias de hígado y corazón como un proceso fisiológico modulado por las condiciones energéticas de la célula^(5; 6). La observación revolucionó la concepción del mecanismo bioquímico de la reducción del oxígeno al establecer una significativa reducción parcial del oxígeno en la central energética de las células aeróbicas (las mitocondrias; Fig. 2).



Fig. 2. Las mitocondrias son la fuente fisiológica mas importante del H_2O_2 intracelular. Las mitocondrias producen H_2O_2 a velocidades que dependen del estado metabólico mitocondrial. En el estado controlado y altamente reducido, estado 4, la producción de H_2O_2 es máxima (2 %), y en el estado activo

y más oxidado, estado 3, la producción de H_2O_2 (0.1%) es mínima. Datos de Boveris y col., 1972 y de Boveris y Chance, 1973.

En 1975-77, Boveris y Cadenas identificaron al radical O_2^- como precursor estequiométrico del H_2O_2 mitocondrial en una reacción catalizada por la Mn-SOD de la matriz mitocondrial⁽⁷⁾. En trabajos clásicos, Boveris y Cadenas identificaron a la reacción de auto-oxidación no-enzimática de la ubisemiquinona ($UQH\cdot$), el intermediario michaeliano univalente de la oxidación del ubiquinol de la cadena respiratoria mitocondrial, como la fuente principal del radical O_2^- en los órganos de los mamíferos^(8; 9).



Unos años después, Boveris y Turrens encontraron que la reacción de autooxidación de la flavina semiquinona de la NADH-deshidrogenasa de la cadena respiratoria, en una reacción de auto-oxidación análoga a la descrita para la ubisemiquinona, produce radical O_2^- ⁽¹⁰⁾. Actualmente, se considera a la reacción de auto-oxidación de la ubisemiquinona como el marcapaso del proceso de envejecimiento en los órganos de los mamíferos, y a la reacción de auto-oxidación de la flavina semiquinona de la NADH-deshidrogenasa como un paso determinante en enfermedades neurodegenerativas, especialmente en la enfermedad de Parkinson⁽¹¹⁾.

Estas observaciones sobre la producción mitocondrial de O_2^- unificaron los campos de las superóxido dismutasas y de la producción de O_2^- y H_2O_2 en las células de mamíferos y abrieron el camino a la aplicación de los conceptos de producción, estados estacionarios, y utilización de radicales libres y especies químicas relacionadas en condiciones fisiológicas y patológicas en los órganos de los mamíferos.

Los tres intermediarios de la reducción parcial del oxígeno (O_2^- , H_2O_2 y $HO\cdot$) pasaron a ser denominados conjuntamente «ROS» (reactive oxygen species) a favor de efectos biológicos semejantes y aunados por el camino químico de Fenton/Haber-Weiss. El concepto de ROS pierde en la identificación química de las moléculas involucradas pero le impartió una operatividad biológica, médica y clínica

extraordinaria, la que favoreció el establecimiento del campo de la biología de los radicales libres oxidativos.

4. El advenimiento del óxido nítrico.

El descubrimiento de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS) por Ignarro y su identificación como el factor de relajación del endotelio llevaron a una extraordinaria actividad de investigación entre 1988 y 1995. Esas investigaciones identificaron a las tres enzimas genómicas clásicas de la familia de las NOS: la nNOS (NOS neuronal o NOS-1) encontrada en cerebro y tejido nervioso; la iNOS (NOS inducible o NOS-2) encontrada en macrófagos y células del sistema inmunológico; y la eNOS (NOS endotelial o NOS-3) del endotelio vascular⁽¹²⁾. La descripción, por Beckman, de la reacción de terminación entre el NO, un radical libre por su número impar de electrones, y el O_2^- para dar peroxinitrito ($NO + O_2^- \rightarrow ONOO^-$) enlazó a la bioquímica y la fisiología de los radicales libres del oxígeno y del NO⁽¹³⁾. La innovación conceptual fue instantánea, el peroxinitrito fue reconocido como parte del mecanismo molecular citotóxico de macrófagos y polimorfonucleares y el O_2^- fue reconocido como parte del mecanismo homeostático de regulación de la presión arterial, al observarse que la inyección intravenosa de SOD produce una disminución de la presión arterial. La relación tributaria entre los caminos bioquímicos iniciados por O_2^- , el camino de Fenton/Haber-Weiss, y por NO, el camino de Beckman-Radi-Freeman, hasta el punto de confluencia del radical $HO\cdot$, que inicia el proceso de lipoperoxidación es mostrado en la Fig. 3⁽¹⁴⁾. Esta figura también indica el papel de la ubiquinona, importante en la matriz mitocondrial, para producir O_2^- en sus reacciones con NO y con $ONOO^-$, camino químico conocido como el atajo de Cadenas-Poderoso. Las especies químicas listadas en la Fig. 2, comparten dos características principales, la de tener vidas medias cortas o, lo que es lo mismo, tiempos de recambio rápidos (en el rango de 10^{-1} - 10^{-9} seg), y la de estar presentes en estados estacionarios muy bajos (en el rango de 10^{-6} - 10^{-16} M) en los sistemas biológicos.

LA CADENA BIOLÓGICA DE REACCIONES DE RADICALES LIBRES

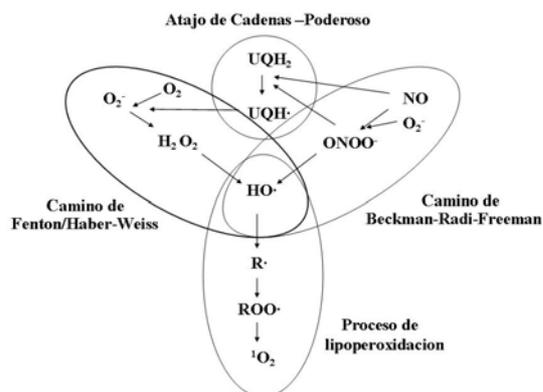


Fig. 3. Esquema de las reacciones de radicales libres en los sistemas biológicos. Obsérvese la confluencia de los caminos químicos iniciados con O_2^- y con NO en la formación del radical $HO\cdot$.

La inmuno-histoquímica había identificado en 1995-96 a una proteína mitocondrial reactiva con anticuerpos anti-NOS a la que se llamó «NOS mitocondrial ó mtNOS». Un par de años después, dos grupos de investigación independientes, Ghafourifar y Richter (1997)⁽¹⁵⁾ y Giulivi, Poderoso y Boveris (1998)⁽¹⁶⁾ determinaron una producción mitocondrial de NO . La nueva enzima mostró ser constitutiva y requerir Ca^{2+} para su actividad. Un cierto escepticismo, sospechando contaminación de las mitocondrias con NOS intracelulares, siguió a los estudios mencionados. La determinación de velocidades de producción de NO similares en mitocondrias aisladas de hígado, corazón, cerebro, riñón, timo y músculo por Boveris y su grupo y la secuenciación de la mtNOS de hígado de rata y su identificación como la variante ? de la nNOS fosforilada y miristilada por Giulivi y su grupo⁽¹⁷⁾, establecieron a la mtNOS como una proteína integral de la membrana interna mitocondrial.

La producción de NO por la mtNOS favorece la regulación inhibitoria de la citocromo oxidasa por el NO , en una reacción en la que hay competencia por el centro activo de la citocromo oxidasa entre el NO y el O_2 ⁽¹⁸⁻²⁰⁾. Actualmente, esta reacción de inhibición de la actividad de la citocromo oxidasa y la reacción de activación de la guanilato ciclasa son tomadas como el mecanismo molecular por el cual el NO ejerce sus efectos biológicos.

5. El estrés y el daño oxidativos

En 1985, H. Sies propuso el concepto de «estrés oxidativo» como un desbalance, en el que hay un aumento de oxidantes o una disminución de antioxidantes, en comparación con la situación definida como normal⁽²¹⁾. El concepto está inspirado en la idea de estrés de H. Selye instalada para el síndrome general de adaptación fisiológica, y en la idea de Gerschman de que tanto la hiperoxia como la disminución de antioxidantes llevan a daño tisular. El éxito del concepto fue inmediato y promovió la investigación biológica y clínica al incluir el término de disminución de antioxidantes y abrir la estrategia intervencionista de suplementación con compuestos y vitaminas antioxidantes. El concepto de estrés oxidativo fue aplicado experimentalmente a células, tejidos, y organismos enteros. En el último caso mencionado, considerando un estrés oxidativo sistémico y determinando los niveles de oxidantes y antioxidantes en sangre y plasma. En cuanto a los oxidantes cuyos niveles se deben determinar, cualquiera de las especies químicas incluidas en la Fig. 3 y que llevan a la formación de $HO\cdot$ y de 1O_2 es un oxidante cuyo aumento lleva a estrés oxidativo. En cuanto a los antioxidantes, las SOD y las vitaminas C y E son los determinados comúnmente. Como indicadores químicos de daño oxidativo normalmente se determinan los productos de reacción de radicales libres oxidativos con las biomoléculas, como el malonaldehído o sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) que son productos de la lipoperoxidación, la 8-HO-deoxiguanosina, producto de la oxidación de los ácidos nucleicos, y los grupos carbonilo de las proteínas oxidadas. Mediante la determinación de los mencionados indicadores se ha observado una asociación fenomenológica entre el estrés oxidativo y una muy larga lista de enfermedades, síndromes y situaciones clínicas (Tabla 1). La relación causa-efecto entre estrés oxidativo y situación clínica o enfermedad no esta resuelta y las dos posibilidades causales están en consideración. Una de las opciones, sostenida por M. Bergel, considera que el estrés oxidativo es un desbalance que permite el establecimiento de la enfermedad, y utiliza como argumento que dietas pro-oxidantes (con

alto contenido de lípidos auto-oxidables y bajo contenido de vitamina E) hace que las ratas, refractarias frente a ciertas infecciones (*Micobacterium leprae* y *Micobacterium tuberculosis*) se vuelvan susceptibles. La otra opción, apoyada por G. Deucher, considera que las enfermedades conducen a una «perturbación metabólica» y al estrés oxidativo, tomando los casos de las hepatitis y del SIDA, donde las virosis están asociadas a niveles titulares y plasmáticos disminuidos de antioxidantes. Cabe señalar que, cualquiera sea el mecanismo patogénico, la suplementación con antioxidantes en pacientes lleva a mejorar el estrés oxidativo, la disfuncionalidad metabólica y la condición clínica.

El proceso continuo de pérdida gradual de las funciones fisiológicas desde el inicio de la edad adulta se ha asociado al proceso continuo de producción mitocondrial de radicales libres y al desarrollo de una condición de estrés oxidativo (Tabla 1). En ratas y ratones se ha determinado que el envejecimiento conlleva un aumento del número de mitocondrias disfuncionales, que no llevan a cabo normalmente sus funciones fisiológicas, en cerebro, hígado, corazón y riñón. Las mitocondrias disfuncionales muestran una disminución de los parámetros que describen a la fosforilación oxidativa, un aumento de los productos de oxidación de biomoléculas mitocondriales y una disminución de una serie de actividades enzimáticas, las que a su vez, se consideran marcadores del envejecimiento (Fig. 4). Interesantemente, las disminuciones de las actividades marcadoras del envejecimiento y la acumulación de productos de oxidación en mitocondrias aisladas de cerebro se correlacionan con la declinación de la función neurológica en el animal entero, tal como esta actividad neurológica se expresa en pruebas de coordinación neuromuscular y de actividad exploratoria^(22; 23).

El envejecimiento aumenta el número de mitocondrias disfuncionales en los tejidos

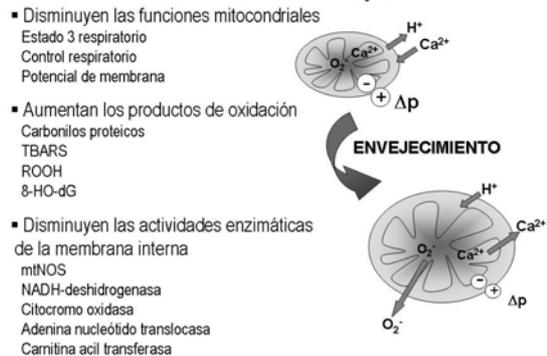


Fig 4. Diagrama indicando las modificaciones observadas en las mitocondrias durante el envejecimiento

6. La suplementación dietaria con antioxidantes

La suplementación con vitaminas antioxidantes como las vitaminas C y E constituye un tema de actualidad. Las vitaminas mencionadas, una especie de nutracéuticos, son de venta libre y susceptibles de «consejo farmacéutico». Si bien no hay criterio establecido por autoridad sanitaria u organización internacional (OMS o FIP), el papel del farmacéutico en favorecer «la automedicación responsable» y a través de la atención farmacéutica establecer una terapia farmacológica que mejore la salud y la calidad de vida⁽²⁴⁾, lleva a la consideración de las dosis recomendables de vitaminas C y E. En primer lugar, la OMS ha reconocido que dosis de hasta 1 g/día para las vitaminas C y E están libres de efectos tóxicos por el tiempo de duración de la vida. Asimismo se ha comprobado una disminución de los niveles plasmáticos de ambas vitaminas, aún con ingestas elevadas de vegetales, para sujetos normales y a partir de los 50 años para las mujeres y los 55 años para los hombres. La dosis recomendable para humanos normales de edades superiores a las mencionadas, es de 500 mg vitamina C/día y de 400 mg vitamina E/día. Los mismos niveles están recomendados para mujeres embarazadas, con mejora en la probabilidad de pre-eclampsia, para pacientes recibiendo quimioterapia, para pacientes con hepatitis o SIDA, y para la etapa pre-quirúrgica en casos de revascularización cardíaca o de trasplante de órganos.

7. Conclusiones

Investigaciones sistemáticas en los últimos 50 años han llevado al desarrollo del campo de los radicales libres en las ciencias biológicas y biomédicas. El campo de conocimiento se encuentra consolidado; para el período 2000-2004 y en las bases de datos internacionales, la entrada «radicales libres» indica 27200 trabajos científicos, la entrada «radical superóxi-

do y peróxido de hidrógeno» aparece con 10900 trabajos, la entrada «peróxidos y peroxidasa», remite a 15500 trabajos; y la entrada «óxido nítrico» indica 27600 trabajos. Sin embargo, las aplicaciones prácticas del uso de antioxidantes y otras drogas que lleven a terapias farmacológicas preventivas o coadyuvantes y que resulten efectivas, constituyen un capítulo que está en pleno proceso de desarrollo.

Tabla 1. Condiciones clínicas con participación de estrés oxidativo

Daño inflamatorio/inmune	Sistema cardiovascular
Glomerulonefritis	Aterosclerosis
Vasculitis	Toxicidad de adriamicina
Artritis reumatoidea	Enfermedad de Keshan (Se)
Síndromes autoinmunes	Síndrome metabólico
Lupus	Disfunción endotelial
Isquemia-reperfusion	Riñón
Post-infarto de miocardio	Síndrome nefrótico autoinmune
Post-shock cerebro-vascular	Nefrotoxicidad de Pb, Cd y Hg
Revascularización cardíaca	Hipertensión renal (SRA)
Transplante de órganos	Alcoholismo
Cerebro - SNC	Hepatopatía alcohólica
Hiperoxia	Miopatía alcohólica
Enfermedad de Parkinson	Neuropatía alcohólica
Enfermedad de Alzheimer	Ojos
Esclerosis múltiple	Cataratas
Sobrecarga de hierro/cobre	Fibroplasia retrolental
Hemocromatosis	Degeneración macular
Talasemia, multitransfusiones	Piel
Enfermedad de Wilson	Irradiación solar (porfiria)
Shock séptico y similares	Envejecimiento
Síndrome de inflamación sistémica	Envejecimiento normal
Shock séptico	Envejecimiento acelerado
Falla multiorgánica (MOF)	Progeria
Pulmón	Eritrocitos
Hiperoxia	Toxicidad de Pb
Toxicidad de paraquat y bleomicina	Toxicidad a la fenilhidrazina
Enfisema (ARDS, fumadores)	Fotooxidación de protoporfirinas
Tracto gastrointestinal	Malaria
Daño hepático por endotoxinas	Anemia de Fanconi
Hepatotoxicidad de hidrocarburos halogenados	Daño por radiaciones
Hepatopatía alcohólica	Exposiciones accidentales
Isquemia-reperusión del intestino	Radioterapia

BIBLIOGRAFÍA

1. Gerschman R, Gilbert DL, Nye SW, Dwyer P and Fenn WO. Oxygen poisoning and x-irradiation: a mechanism in common. *Science* 119: 623-626, 1954.
2. McCord JM and Fridovich I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem* 244: 6049-6055, 1969.
3. Fridovich I. Oxygen: boon and bane. *Am Sci* 63: 54-59, 1975.
4. McCord JM, Keele BB, Jr. and Fridovich I. An enzyme-based theory of obligate anaerobiosis: the physiological function of superoxide dismutase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 68: 1024-1027, 1971.
5. Boveris A, Oshino N and Chance B. The cellular production of hydrogen peroxide. *Biochem J* 128: 617-630, 1972.
6. Boveris A and Chance B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem J* 134: 707-716, 1973.
7. Boveris A and Cadenas E. Mitochondrial production of superoxide anions and its relationship to the antimycin insensitive respiration. *FEBS Lett* 54: 311-314, 1975.
8. Boveris A, Cadenas E and Stoppani AO. Role of ubiquinone in the mitochondrial generation of hydrogen peroxide. *Biochem J* 156: 435-444, 1976.
9. Cadenas E, Boveris A, Ragan CI and Stoppani AO. Production of superoxide radicals and hydrogen peroxide by NADH-ubiquinone reductase and ubiquinol-cytochrome c reductase from beef-heart mitochondria. *Arch Biochem Biophys* 180: 248-257, 1977.
10. Turrens JF and Boveris A. Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria. *Biochem J* 191: 421-427, 1980.
11. Boveris A and Cadenas E. Mitochondrial production of hydrogen peroxide regulation by nitric oxide and the role of ubiquinone. *IUBMB Life* 50: 245-250, 2000.
12. Ignarro LJ. *Nitric Oxide: Biology and Pathobiology*. New York: Academic Press, 2000.
13. Beckman JS. Ischaemic injury mediator. *Nature* 345: 27-28, 1990.
14. Valdez LB, Lores AS, Bustamante J, Alvarez S, Costa LE and Boveris A. Free radical chemistry in biological systems. *Biol Res* 33: 65-70, 2000.
15. Ghafourifar P and Richter C. Nitric oxide synthase activity in mitochondria. *FEBS Lett* 418: 291-296, 1997.
16. Giulivi C, Poderoso JJ and Boveris A. Production of nitric oxide by mitochondria. *J Biol Chem* 273: 11038-11043, 1998.
17. Elfering SL, Sarkela TM and Giulivi C. Biochemistry of mitochondrial nitric-oxide synthase. *J Biol Chem* 277: 38079-38086, 2002.
18. Brown GC and Cooper CE. Nanomolar concentrations of nitric oxide reversibly inhibit synaptosomal respiration by competing with oxygen at cytochrome oxidase. *FEBS Lett* 356: 295-298, 1994.
19. Cleeter MW, Cooper JM, Darley-Usmar VM, Moncada S and Schapira AH. Reversible inhibition of cytochrome c oxidase, the terminal enzyme of the mitochondrial respiratory chain, by nitric oxide. Implications for neurodegenerative diseases. *FEBS Lett* 345: 50-54, 1994.
20. Antunes F, Boveris A and Cadenas E. On the mechanism and biology of cytochrome oxidase inhibition by nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 16774-16779, 2004.
21. Sies H. *Oxidative Stress*. San Diego: Academic Press, 1985.
22. Navarro A, Sanchez Del Pino MJ, Gomez C, Peralta JL and Boveris A. Behavioral dysfunction, brain oxidative stress, and impaired mitochondrial electron transfer in aging mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 282: R985-R992, 2002.
23. Navarro A, Gomez C, Lopez-Cepero JM and Boveris A. Beneficial effects of moderate exercise on mice aging: survival, behavior, oxidative stress, and mitochondrial electron transfer. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 286: R505-R511, 2004.
24. Hepler CD and Strand LM. Opportunities and responsibilities in pharmaceutical care. *Am J Hosp Pharm* 47: 533-543, 1990.