

Radicales Libres, Alcoholismo y Daño Hepático

Dr. José Rubén Elvir Mairena

RESUMEN

En el presente artículo se presenta una revisión acerca del papel de los radicales libres en la producción de daño celular y tisular en general, pero particularmente en la producción de daño a nivel hepático inducido por el alcohol. Al mismo tiempo se revisa lo que son los radicales libres, las principales reacciones químicas que llevan a su formación en el organismo, así como, los distintos mecanismos de defensa que tiene este último para enfrentarlos.

PALABRAS CLAVES radicales libres, alcoholismo, hígado, etanol, peroxidación lipídica.

INTRODUCCIÓN

Los **radicales libres** son moléculas o fragmentos de moléculas que contienen uno o más electrones no apareados (algunos consideran que el o los electrones no apareados deben estar en el orbital más externo de **la molécula, pero esto excluye varios metales de transición**). Un radical libre (**R***) se puede considerar como un enlace abierto o la mitad de un enlace, por lo que es químicamente muy reactivo. Una molécula puede convertirse en radical libre tanto por ganancia como por pérdida de electrones, y también cuando un enlace se

Profesor Titular I del Depto. de Fisiología, U.N.A.H Magister Scientiarum en Fisiología y Biofísica. Estudiante de Doctorado en Fisiología y Biofísica en el Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas.

rompe simétricamente en dos fragmentos reteniendo cada uno de ellos un electrón.

Los radicales libres tienden a recuperar un estado estable aceptando o cediendo el electrón impar, reduciéndose u oxidándose respectivamente. Por consiguiente, si dos radicales libres reaccionan, ambos radicales se eliminan. Si un radical libre reacciona con un no radical, se produce otro radical libre, con lo cual se pueden originar reacciones en cadena (1,2,3).

Los radicales libres formados dentro de las células pueden oxidar biomoléculas y llevar a la muerte celular y daño tisular. Sin embargo, establecer el compromiso de los radicales libres en la patogénesis de una enfermedad es extremadamente difícil debido a la corta duración de estas especies (2,4).

RADICALES LIBRES DE OXIGENO Y ESPECIES DE OXIGENO REACTIVAS

La reducción del oxígeno por la transferencia a él de un electrón produce el anión radical libre superóxido:



Una reducción del oxígeno por dos electrones produce el peróxido de hidrógeno:



El peróxido de hidrógeno es a menudo generado en sistemas biológicos a través de la producción de superóxido: dos moléculas de superóxido pueden reaccionar juntas para formar peróxido de hidrógeno y oxígeno:

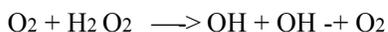


Debido a que en esta última reacción los radicales libres reaccionan para generar productos no-radicales ésta es conocida como una reacción de dismutación. Tal reacción puede tomar lugar espontáneamente o puede ser catalizada por la enzima superóxido dismutasa el peróxido de hidrógeno no es un radical libre pero cae dentro de la categoría de "especies reactivas de oxígeno" que incluye no solamente radicales libres de oxígeno sino también derivados de oxígeno no-radicales que están involucrados en la producción de radicales de oxígeno.

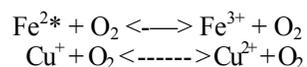
El peróxido de hidrógeno es un compuesto importante en bioquímica de radicales libres debido a que puede fácilmente romperse, particularmente en la presencia de iones de metales de transición, para producir el más reactivo y perjudicial de los radicales libres de oxígeno, el radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$):



Esta reacción es a menudo conocida como reacción de Haber-Weiss catalizada por hierro. La reacción de Haber-Weiss no catalizada, la cual es menos probable en sistemas biológicos, es la reacción de superóxido directamente con peróxido de hidrógeno:



Por otro lado, las reacciones de iones de metales de transición con oxígeno, las cuales pueden ser consideradas como reacciones redox reversibles, son extremadamente importantes en la promoción de reacciones de radicales libres:



Los principales "protagonistas" en la bioquímica de radicales libres de oxígeno son el oxígeno mismo, el superóxido, el peróxido de hidrógeno, los iones de metales de transición y el radical hidroxilo, los primeros

cuatro de los cuales conspiran por una variedad de reacciones para generar el último.

El superóxido, aunque un radical libre, no es una especie particularmente perjudicial; su significancia principal es probablemente como una fuente de peróxido de hidrógeno y como un reductor de iones de metales de transición.

El peróxido de hidrógeno es un agente oxidante pero no especialmente reactivo y su significancia principal radica en ser una fuente de radicales hidroxilo en la presencia de iones de metales de transición reactivos.

El radical hidroxilo es un radical oxidante extremadamente reactivo que reacciona con la mayoría de las biomoléculas. No difunde una distancia significativa dentro de una célula antes de reaccionar y tiene una vida media extremadamente corta pero es capaz de causar gran daño dentro de un pequeño radio de su sitio de producción.

Los radicales libres de oxígeno no son los únicos radicales libres importantes en bioquímica, aunque ellos son a menudo las especies iniciales formadas. Otros radicales libres de importancia son los radicales que surgen a partir del ataque de un radical oxidante, como el OH^* , sobre una molécula biológica (RH) tal como un lípido, un ácido nucleico, un carbohidrato o una proteína. Estos reaccionan muy rápidamente con el oxígeno para formar los correspondientes radicales peroxilos (ROO^*). A su vez estos radicales peroxilos pueden participar en reacciones que generan radicales alcoxilo (RO^*). Los átomos de sulfuro pueden también ser el centro para radicales libres (RS^*) formados, por ejemplo, en la oxidación del glutatión (2,3).

PRODUCCIÓN DE RADICALES LIBRES EN CÉLULAS

Con la excepción de circunstancias inusuales tales como la radiación ionizante, los radicales libres son generalmente producidos en células por reacciones de transferencia de electrones. Estas pueden ser mediadas por acción de enzimas o no-enzimáticamente, a menudo a través de la química redox de los iones de metales de transición.

La producción de radicales libres en células animales puede ser accidental o deliberada. Los radicales libres

son generados deliberadamente por células animales en ciertas circunstancias especiales. Algunas enzimas utilizan un radical libre en su sitio activo en el proceso de catálisis. En estos casos el radical libre no está realmente "libre" del todo y su reactividad es dirigida hacia una reacción específica. Los fagocitos activados también deliberadamente generan superóxido como parte de su papel bactericida. Aunque los radicales libres son producidos solamente en la interfase de la membrana plasmática del fagocito y la bacterias alguna fuga de superóxido, peróxido de hidrógeno y otras especies de oxígeno reactivas es inevitable.

Bajo circunstancias normales, la principal fuente de radicales libres en células es la "fuga" de electrones a partir de las cadenas transportadoras de electrones hacia el oxígeno molecular, tales como aquellas en mitocondria y retículo endoplásmico, generando superóxido. Otras enzimas pueden también producir superóxido o peróxido de hidrógeno, tales como las flavin oxidasas localizadas en peroxisomas. Otra fuente de superóxido en células animales es la autooxidación de ciertos compuestos incluyendo ácido ascórbico (vitamina C), tioles {como glutatión y cisteína-, adrenalina y flavin co-enzimas. Estas reacciones de autooxidación pueden ser grandemente aumentadas por el compromiso de iones de metales de transición. Esta producción accidental de radicales libres es mantenida al mínimo por la alta eficiencia de la transferencia de electrones mediada por enzimas y por el mantenimiento de iones de metales fuertemente secuestrados; éstos son los medios fundamentales de defensa antioxidante preventiva. Tales precauciones no pueden ser completamente eficientes y existen defensas antioxidantes enzimáticas y no enzimáticas para manejar la inevitable baja producción de radicales libres durante la actividad metabólica normal. Además, la producción de radicales libres en las células puede ser grandemente aumentada por ciertos compuestos tóxicos extraños (2,3).

REACCIONES PERJUDICIALES DE LOS RADICALES LIBRES

Todas las principales clases de biomoléculas pueden ser atacadas por radicales libres pero los lípidos son probablemente los más susceptibles. Las membranas celulares son fuentes ricas de ácidos grasos poliinsaturados, los cuales son fácilmente atacados por radicales oxidantes. La destrucción oxidativa de los

ácidos grasos poliinsaturados, conocida como peroxidación lipídica, es particularmente perjudicial debido a que procede como una reacción en cadena que se perpetúa a si misma. El proceso general de peroxidación lipídica se presenta esquematizado en la figura 3, donde LH es el ácido graso poliinsaturado blanco y R' el radical oxidante iniciador. La oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados genera un radical ácido graso (L*) que rápidamente adiciona oxígeno para formar un radical ácido graso peroxilo (LOO*). Los radicales peroxilo son los que llevan a cabo la reacción en cadena, ellos pueden posteriormente oxidar moléculas de ácidos grasos poliinsaturados e iniciar nuevas cadenas, produciendo hidroperóxidos lipídicos (LOOH) que pueden romperse para originar más radicales y un amplio rango de compuestos, notablemente aldehídos. La peroxidación lipídica es una reacción en cadena muy destructiva que puede directamente dañar la estructura de la membrana e indirectamente dañar otros componentes celulares por la producción de aldehídos reactivos.

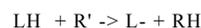


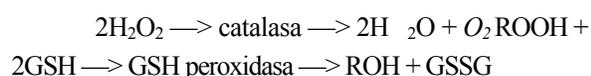
Figura 3_- Reacción en cadena durante la peroxidación lipídica.

Las proteínas y los ácidos nucleicos parecen ser menos susceptibles al ataque por radicales libres que los ácidos grasos poliinsaturados, en el sentido de que es menos probable un progreso rápido de reacciones en cadena destructivas (2,3).

DEFENSAS CONTRA LOS RADICALES LIBRES

Las dos principales categorías de defensas antioxidantes son aquellas cuyo papel es prevenir la generación de radicales libres y aquellos que interceptan los que son generados. Ellos existen tanto en compartimientos

acuosa como membranosos de células y pueden ser o no enzimas. Las defensas preventivas incluyen la eficiencia de la transferencia de electrones y la secuestro de iones de metales de transición. Otra forma de defensa antioxidante preventiva es la remoción de peróxidos. Esto incluye tanto el peróxido de hidrógeno como los hidroperóxidos lipídicos que son producidos durante la peroxidación lipídica. La catalasa, que está principalmente localizada en peroxisomas, actúa sobre el peróxido de hidrógeno; la glutatión peroxidasa (GSH peroxidasa), la cual es encontrada en el citosol de la mayoría de células, actúa tanto contra el peróxido de hidrógeno así como contra hidroperóxidos de ácidos grasos:



Otras defensas existen para interceptar, o "remover", radicales libres. Una de éstas es la ya mencionada superóxido dismutasa, que es la única enzima que se conoce que tiene como sustrato un radical libre. Sin embargo, la mayoría de los removedores de radicales libres no son enzimas. En membranas celulares, el mejor caracterizado y posiblemente el más importante es el α -tocoferol, el miembro principal de la familia de la vitamina E. Esta molécula intercepta radicales peroxilipídicos (LOO') y así termina las reacciones en cadena de la peroxidación lipídica:



El radical tocoperoxil resultante es relativamente estable y, en circunstancias normales, insuficientemente reactivo para iniciar la peroxidación lipídica por sí mismo.

En la fase acuosa otros compuestos actúan como removedores de radicales libres. El ácido ascórbico (vitamina C) es un importante antioxidante tanto dentro de las células como en el plasma. El ácido úrico en plasma y el glutatión en el citosol celular también poseen fuertes propiedades removedoras de radicales. Otra categoría de defensas antioxidantes naturales son los procesos de reparación, los cuales remueven biomoléculas dañadas antes de que ellas puedan acumularse y antes de que su presencia resulte en metabolismo o viabilidad celular alteradas. Los ácidos nucleicos dañados oxidativamente son reparados por enzimas específicas, las proteínas oxidadas son removidas por sistemas proteolíticos y sobre los lípidos

de membrana oxidados actúan lipasas, peroxidadas y ocurren aciltransferasas (2).

METABOLISMO DEL ETANOL

El hígado es el principal sitio de degradación del etanol, donde es convertido por alcohol deshidrogenasa a acetaldehído con reducción de nicotinamida adeninucleótido (NAD). El acetaldehído no se acumula sino que es posteriormente metabolizado a acetil coenzima A, principalmente por una deshidrogenasa mitocondrial. Contribuciones mucho más pequeñas a la degradación del etanol son hechas por el sistema microsomal oxidante del etanol y por la peroxidasa; además existen otras vías metabólicas cuantitativamente menores, tales como la formación de fosfatidiletanol y acil ésteres de etanol, pero las consecuencias de estos procesos todavía no han sido determinadas (5,6).

PAPEL DE LOS RADICALES LIBRES EN EL DAÑO HEPÁTICO POR ABUSO DE ALCOHOL

El daño hepático debido a abuso agudo o crónico en la ingesta de etanol (esteatosis más necrosis, inflamación y fibrosis en último caso) se ha demostrado que depende de su metabolismo oxidativo a nivel citosólico, peroxisomal y/o microsomal (7). Sin embargo, a pesar de una extensa investigación, los mecanismos moleculares que conducen al daño hepático todavía necesitan ser clarificados (4).

Usando espectroscopia de resonancia de espín del electrón en la presencia de un agente capaz de atrapar y entonces acumular radicales libres reactivos, Albano y colaboradores fueron capaces de detectar, en microsomas de hígado de rata incubados con etanol, el radical libre hidroxietilo ($\text{CH}_2 - \text{C}'\text{HOH}$). Posteriormente, estos autores demostraron que la formación de radical derivado del etanol fue principalmente debido a la actividad del sistema monooxigenasa dependiente de citocromo P450, y solamente una cantidad menor de formación del radical puede ser atribuida a reacción del etanol con radicales hidroxilo (OH^*) originándose a partir de degradación de peróxido de hidrógeno catalizada por hierro (4). Por otro lado, se ha demostrado que la formación del radical hidroxietilo también ocurre "in vivo", mediante su detección en el hígado y en la bilis de ratas ingiriendo etanol (4,8).

Albano y colaboradores también han examinado, más recientemente, el papel del citocromo P450 en catalizar

la activación del radical libre de etanol, mostrando que vesículas de membrana reconstituidas conteniendo citocromo P450 reductasa, en la presencia de fosfato de nicotinamida adeninucleótido reducido (NADPH), atrapan el espín y que no se forma el radical hidroxietilo a partir de etanol a menos que el citocromo P450 esté incorporado (9).

Además, una forma de citocromo P450 inducible por etanol ha sido caracterizada en el hígado de rata y mostrado ser principalmente responsable para la formación del radical libre hidroxietilo (10). De importancia primaria es la evidencia de la presencia de una forma análoga de citocromo P450 también en hígado humano (11).

El radical hidroxietilo, junto con los derivados de oxígeno reactivos cuya producción endógena en el retículo endoplásmico es fuertemente aumentada por la inducción del etanol relacionada con citocromo P450, puede en principio "disparar" el daño oxidativo en la intoxicación crónica con alcohol. En el caso de intoxicación aguda, es probable que el exceso de acetaldehído en el citosol hepático sea oxidado por vías alternativas, tal como xantina oxidasa y aldehído oxidasa, con la producción de radical superóxido (O_2^-).

PEROXIDACION LIPIDICA Y DAÑO HEPÁTICO POR ABUSO DE ALCOHOL

El mecanismo más activamente investigado de daño hepático inducido por radicales libres durante el metabolismo del etanol es la peroxidación lipídica.

Comporti y colaboradores en 1967 fueron los primeros en reportar evidencia de peroxidación lipídica y su papel en el efecto tóxico del alcohol (13). Desde entonces, un gran número de observaciones experimentales han confirmado que el envenenamiento con etanol aumenta la ruptura oxidativa de lípidos de membrana. Sin embargo, las bases moleculares de esta estimulación de la peroxidación lipídica no han sido todavía definidas. La figura 1 muestra esquemáticamente los posibles pasos bioquímicos relacionados a los efectos del etanol sobre la producción de radicales libres y sobre la peroxidación lipídica. Es importante considerar también que el etanol provoca una disminución significativa, sino dramática, del glutatión intracelular a través de una serie de mecanismos (ver Figura 1).

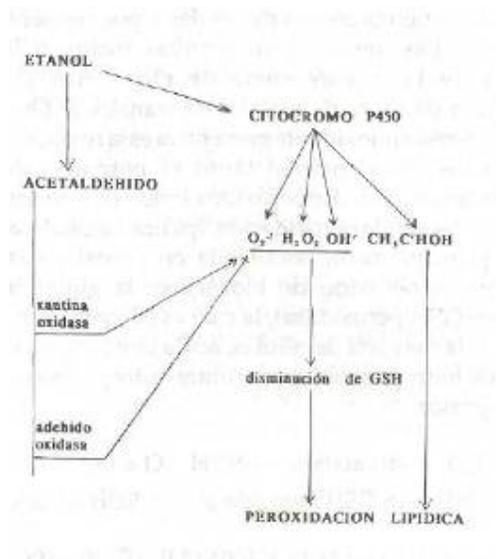


Figura 1.- Reacciones mediadas por radicales libres potencialmente involucradas en daño hepático inducido por etanol.

De manera pues que la sobrecarga de etanol hepático es seguida tanto de un aumento de las especies reactivas oxidantes, principalmente radicales libres, y por una declinación de las defensas antioxidantes. Obviamente lo último puede además o posteriormente deteriorarse una vez que la peroxidación lipídica ha sido estimulada. En otras palabras, uno puede afirmar que la intoxicación con etanol es capaz de inducir stress oxidativo, es decir, un aumento de la proporción entre reacciones prooxidantes y antioxidantes (4).

En personas que abusan del alcohol, diferentes marcadores de reacciones de peroxidación lipídica han mostrado un aumento significativo en relación a los no bebedores: aumento en los niveles hepático y plasmático de peróxidos lipídicos; aumento en los niveles hepático y plasmático de dienos conjugados; y exhalación de pentano en la respiración, el cual se origina a partir de la degradación oxidativa de ácido araquidónico. La estimación de peroxidación lipídica aumentada en alcohólicos por detección de malonaldehído en muestras plasmáticas usando el ensayo colorimétrico convencional (prueba del ácido tiobarbitúrico, TBA), involucra varios problemas metodológicos lo que hace que esta técnica no sea factible al presente. Más aún, la detección de malonaldehído en plasma o suero en términos de sustancias reactivas al TBA ha sido

mostrado sobreestima en cerca de 70 veces el contenido de peróxido plasmático tal como es medido por métodos más sofisticados pero específicos. Usando estas últimas técnicas ha sido posible mostrar que el daño oxidativo es un evento temprano en el alcoholismo (14).

Por otro lado, ya que el stress oxidativo resulta a partir de cualquier cambio de la proporción entre condiciones pro-oxidantes y defensas anti-oxidantes en los varios tejidos y órganos, parece esencial también evaluar los niveles de defensas anti-oxidantes cuando se explora el compromiso de daño de radicales libres en las diversas enfermedades. En la figura 2 se presenta un diagrama esquemático del balance oxidativo y stress oxidativo. Una disminución significativa de vitamina E hepática ha sido descrita en pacientes con daño hepático inducido por etanol. También una pérdida en el contenido de glutatión hepático ha sido observado en esta condición por varios autores. Más aún, en un análisis del estado antioxidante durante la enfermedad alcohólica hepática humana, Ward y colaboradores demostraron que el 6-caroteno es el primer antioxidante plasmático que disminuye, mientras que las vitaminas A y E solamente disminuyen con el ataque de cirrosis (4).

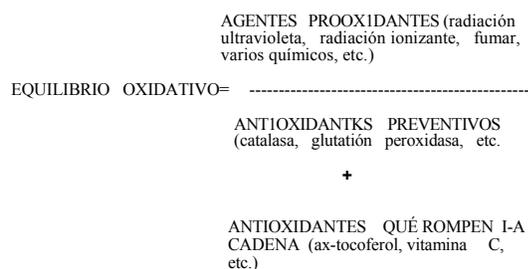


Figura 2- Esquema representando los factores que influyen en el mantenimiento de un equilibrio oxidativo.

En resumen, el compromiso de los radicales libres en el desarrollo de daño hepático en humanos inducido por el etanol es demostrado tanto por un aumento progresivo de daño oxidativo como por una disminución de al menos algunos antioxidantes definidos.

BIBLIOGRAFÍA

- 1.- Bullkley, G.B.: The role of oxygen free radicáis in human disease processes. *Surgery* 94(3):407-411,1983.
- 2.- Cheeseman,K.H. and Slater,T.F.: An introduction to free radical biochemistry. *British Medical Bulletin* 49<3):481^93,1993.
- 3.- Halliwell,B. and GutteridgeJ.M.C: Role of free radicalsandcatalytic metal ionsinhumandisease: an overview. *Methods in Enzimology* 186(1):1-85,1990.
- 4.- Polí,G.: Liver damage due to free radicáis. *British Medical Bulletin* 49{3):604-620,1993.
- 5.- Peters/r.I.: Ethanol metabolism. *British Medical Bulletin* 38(1):17-20,1982.
- 6.- Hoek, J.B. and Taraschi,T.F.: Cellular adaptation to ethanol. *Trends in Biochemical Sciences* 13{7):269-274,1988.
- 7.- Lieber,C.S.: Biochemical and molecular basis of alcohol-induced injury to liver and other tissues. *The New England Journal of Medicine* 319 (25): 1639-1650,1988.
- 8.- Reinke, L. A.; Dubosc,C.M. and McCay,P.B.: Re-active free radical generation "in vivo" in heart and liver of ethanol-fedrats;correlationwith radical formation "in vitro". *Proceedings of the National Academy Sciences USA* 84 (24):9223-9227,1987.
- 9.- Albano,E.; Tomasi,A.; PerssonJ. O. et aL: Role of ethanol-inducible cytochrome P-50 (P-SOIIIE1) in catalyging the free radical activation of aliphatic alcohols. *Biochemical Pharmacology* 41 (12):1895-1902,1991.
- 10.- Johansson,I.; Ekstrom,G.; Scholte,B.; Puzycky,D.; Jornall,H. and ingelmanSundberg M.: Ethanol-, fasting- and acetone-inducible cytochromes P-450 in rat liver: regulation and characterization of enzymes belonging to the IIB and HE gene sub-families. *Biochemistry* 27(6):1925-1934,1988.

- 11.- Ekstrom,G.; von Bahr,C. and Ingelman-Sundberg,M.: Human microsomal cytochrome P45011E1. Immunological evaluation of its contribution of microsomal ethanol oxidation, carbón tetrachloride reduction and NADPH oxidase activity. *Biochemical Pharmacology* 38(4):689-693,1989.
- 12.- Shaw,S- and Jayatilleke,E.: Acetaldehyde-mediated lipid peroxidation: role for superoxide and ferritin. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 143(3):984-990,1987.
- 13.- Comporti,M; Hartman, A. D. and Di Luzio,N. R.: Effects of "in vivo" and "in vitro" ethanol administration on liver lipid peroxidation. *Laboratory Investigation* 16 (4):616-624,1967.
- 14.- GutteridgeJ.M.C and Halliwell,B-: The measurement of mechanism of lipid peroxidation in biological systems. *Trends in Biochemical Sciences* 15(4):129135,1990

*El ir un poco Lejos es tan malo
como no ir todo lo necesario
(La virtud está en e(punto medio)*

Confusio