



## Patogénesis del estrés oxidativo: Consecuencias y evaluación en salud animal

### Pathogenesis of oxidative stress: Consequences and evaluation in animal health

Ricardo H. Chihuailaf\*  
Pedro A. Contreras\*  
Fernando G. Wittwer\*

---

#### Abstract

Oxygen derived free radicals are normally generated in many metabolic pathways. These radicals may interact with various cellular components and induce cell injury. However, there is an efficient antioxidant system that protects the organism against free radical-induced cell injury. Oxidative stress results when there is a serious imbalance between generation of free radicals and the antioxidant capacity. When free radicals exceed the antioxidant capacity, cell injury causes diverse physiologic and pathologic changes. This paper reviews the mechanisms involved in the production, classification and effects that oxygen stress causes in the organism, as well as in the protective mechanism. Finally, analytical techniques and biochemical markers used to monitor oxidative stress are also described in this paper.

**Key words: FREE RADICALS, LIPOPEROXIDATION, TRACE MINERALS, OXIDATIVE STRESS, ANTIOXIDANTS.**

#### Resumen

Los radicales libres del oxígeno son continuamente generados en las diferentes vías metabólicas, son capaces de interactuar con diferentes biomoléculas y provocar daño celular. No obstante, los organismos poseen una poderosa red antioxidante que protege de los efectos nocivos de los radicales libres. El estrés oxidativo es consecuencia de un desequilibrio entre la producción de radicales libres y la capacidad antioxidante de un organismo. Cuando los radicales libres exceden la defensa antioxidante, se produce lesión celular, trastornos fisiológicos y cambios patológicos. Aquí se revisan los conocimientos sobre producción, clasificación, efectos de los radicales libres y función protectora de los antioxidantes; también se abordan aspectos relacionados con diferentes técnicas analíticas y marcadores bioquímicos propuestos para evaluar el desarrollo de un estrés oxidativo y sus efectos en la salud animal.

**Palabras clave: RADICALES LIBRES, LIPOPEROXIDACIÓN, MINERALES TRAZA, ESTRÉS OXIDATIVO, ANTIOXIDANTES.**

---

Recibido el 18 de septiembre de 2001 y aceptado el 6 de diciembre de 2001.

\*Instituto de Ciencias Clínicas Veterinarias, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Austral de Chile, Casilla 567, Valdivia, Chile.

Autor para correspondencia y solicitudes de sobretiros: Ricardo H. Chihuailaf, Instituto de Ciencias Clínicas Veterinarias, Universidad Austral de Chile. E-mail: rchihuailaf@uach.cl Tel. 56-63-22 15 76, Fax: 56-63-22 13 54.



## Introduction

**F**ree radicals (FR) have an important function in several homeostatic processes. They act as intermediate agents in essential oxidation-reduction (redox) reactions. Some examples are the destruction of microorganisms through phagocytosis, synthesis of inflammatory mediators and detoxification. FR in low concentrations are useful and even essential, however, in high concentrations they are toxic. If biological molecules are oxidized, they are altered and can trigger cellular metabolism disorders.<sup>1-3</sup>

Luckily aerobic organisms count on a protective antioxidant (AO) system that limits damage caused by FR. This protective system includes enzymes and essential nutrients that avoid FR generation, trap those that already exist and remove or repair damaged biomolecules. The AO system and the generation of FR coexist in a balanced way, when this equilibrium is altered the result will be oxidative stress, which can cause cell injury, trigger physiologic disorders and promote pathologic processes.<sup>4</sup>

Considering the importance of these issues in veterinary medicine, this paper reviews the updated knowledge of the elements that participate in an oxidative stress process and the methods available for evaluating the consequences of that damage.

### **Free radicals and reactive oxygen species**

A FR represents any chemical species that exists independently and has one or more unmatched (odd) electrons rotating in its external atomic orbits.<sup>5-7</sup> This highly unstable configuration causes this chemical species to be very aggressive and to have a short life span.<sup>5</sup> There is an inverse correlation between the magnitude of this reactivity and its life span and ability to diffuse through cells. Chemically, a FR can be generated through different pathways, but the most frequent in living organisms is the addition of an electron to a stable molecule.<sup>6</sup> Most of an organisms' molecules are non-radical, which means they only have even electrons in their atomic orbits.

Once generated, FR interact with other molecules through redox reactions to obtain a stable electronic configuration. In a redox reaction, electron transference between the participating chemical species will take place. One loses free electrons (oxidation process) and the other gains them (reduction process). The oxidation of one chemical species implies the reduction of another. The mole-

## Introducción

**L**os radicales libres (RL) cumplen una importante función en variados procesos homeostáticos como intermediarios en reacciones de oxidación-reducción (redox) esenciales para la vida. La destrucción de microorganismos por fagocitosis, la síntesis de mediadores inflamatorios y la detoxificación constituyen algunos ejemplos relevantes. Las concentraciones bajas de RL son beneficiosas e incluso indispensables; sin embargo, en cantidades excesivas son tóxicos, ya que al oxidar moléculas biológicas las alteran y desencadenan trastornos en el metabolismo celular.<sup>1-3</sup>

Afortunadamente los organismos aeróbicos poseen un sistema antioxidante (AO) protector que limita la acción nociva de los RL. Este sistema protector se compone de enzimas y nutrimentos esenciales cuya función es evitar la formación de RL, capturar aquellos que se han formado y remover o reparar las biomoléculas dañadas. La generación de RL y la defensa AO se encuentran en equilibrio; al romperse este equilibrio se crea una situación llamada estrés oxidativo, que puede producir daño celular, desencadenar trastornos fisiológicos y favorecer la presentación de procesos patológicos.<sup>4</sup>

En atención a la importancia que revisten estos tópicos para la medicina veterinaria, el objetivo de este artículo es revisar los conocimientos actuales de los elementos que intervienen en la instauración de un estrés oxidativo y las metodologías disponibles para evaluar las consecuencias del daño.

### **Radicales libres y especies reactivas del oxígeno**

En sentido estricto, un RL representa cualquier especie química de existencia independiente que posee uno o más electrones desapareados (o sea, un número impar) girando en sus orbitales atómicos externos.<sup>5-7</sup> Esta configuración, electroquímicamente muy inestable, le confiere la propiedad de ser una especie química altamente agresiva y de corta vida.<sup>5</sup> Se ha observado que la magnitud de esta reactividad se correlaciona inversamente con su vida media y con su capacidad de difusión en el medio celular. Desde el punto de vista químico, un RL puede originarse por distintos mecanismos, pero el más frecuente en los organismos vivos es mediante la adición de un electrón a una molécula estable.<sup>6</sup> La mayoría de las moléculas en un organismo son no radicales, o sea, sólo contienen electrones apareados en sus orbitales atómicos.

Una vez formados, los RL interactúan con otras moléculas a través de reacciones redox con el propósito de lograr una configuración electrónica estable. En una reacción redox ocurre una transferencia de electrones entre las especies químicas participantes. Una de ellas cede electrones libres (proceso denominado oxida-

cule losing electrons is a reducing agent, while the molecule gaining electrons is an oxidant agent. When a FR reacts with a non-radical molecule, it can lose or gain electrons, or simply join the molecule. In any case, the non-radical molecule turns into a FR and a chain reaction is triggered: one FR generates another FR. The reaction will stop only when two FR meet.<sup>8,9</sup>

### **Free radical classification**

Several authors have classified FR according to the functional group in their molecule.<sup>5,9-11</sup> The most frequent one is an oxygen FR, in which oxygen is the functional center. Thiol radicals are less important, their reactive group contains sulfur. Other radicals contain carbon, phosphorous or nitrogen in their reactive groups.

Due to the importance of oxygen in aerobic processes, FR with reactive oxygen are the most common.<sup>10</sup> Most FR are generated from normal metabolic reactions, and exogenous factors can increase them.<sup>12</sup> This group is formed by one superoxide anion, one hydroxyl radical and FR that come from organic compounds: alkoxy and peroxy.<sup>5</sup> Reactive compounds such as hydrogen peroxide and singlet oxygen are also included.<sup>11</sup> Therefore, the general denomination Reactive Oxygen Species is used nowadays to include those chemical species that act like oxidants (hydrogen peroxide, hypochlorous acid, hydroperoxides and epoxide metabolites) but that are not FR (Table 1).<sup>8-10</sup>

### **Origin of reactive oxygen species**

In living organisms, ROS have endogenous and exogenous origins. The first group includes FR generated intracellularly, that act inside and outside of the cell.<sup>13</sup> Their generation, accidental or deliberate, will take place in four well-defined sources:<sup>4,11</sup> a) During normal aerobic metabolism, mitochondria consume molecular oxygen and sequentially reduce it until they produce water. A small fraction of oxygen is metabolized via a univalent reaction and will inevitably result in intermediate products such as superoxide radicals, hydrogen peroxide and hydroxyl. b) Peroxisomes containing acyl coA oxidase, dopamine  $\beta$ -hydroxylase, urate-oxidase and others, generate hydrogen peroxide as intermediate products. c) The enzymatic cytochrome P-450 system constitutes a primary defense against several xenobiotics and endogenous substances that increase FR production. d) Superoxide anions can be deliberately

and other, necessarily, they receive (process denominated reduction). Every oxidation of a chemical species implies the reduction of another. The molecule that gives electrons receives the name of reducing agent and the molecule that accepts them is called oxidizing agent. When a RL reacts with a non-radical molecule it can give or capture electrons, or simply join to it. In any of these cases the molecule that is not a radical becomes a RL and a chain reaction is started: a RL generates another RL. Only when two RL are found the chain reaction is stopped.<sup>8,9</sup>

### **Clasificación de los radicales libres**

Diversos autores han clasificado a los RL de acuerdo con el grupo funcional presente en la molécula.<sup>5,9-11</sup> El tipo más frecuente de encontrar es el RL del oxígeno, en cuya estructura está presente el oxígeno como centro funcional. De menor preponderancia son los radicales tioles, que se caracterizan por contener azufre como grupo reactivo. Otros radicales descritos contienen carbono, fósforo o nitrógeno como centro reactivo.

Debido a la relevancia del oxígeno en los procesos aeróbicos, los RL con oxígeno reactivo son los más comunes.<sup>10</sup> La mayoría de ellos proceden de las reacciones metabólicas normales y se pueden incrementar por efecto de factores exógenos.<sup>12</sup> Este grupo está constituido por el anión superóxido, el radical hidroxilo y los RL derivados de compuestos orgánicos: peróxido y alcoxilo.<sup>5</sup> También se incluyen los compuestos reactivos tales como el peróxido de hidrógeno y el oxígeno singlete.<sup>11</sup> Esto último ha llevado a preferir la denominación general de Especies Reactivas del Oxígeno (ERO) con el fin de incorporar a aquellas especies químicas que se comportan como oxidantes (peróxido de hidrógeno, ácido hipocloroso, hidroperóxidos y metabolitos epóxido) y que no son RL.<sup>8-10</sup> (Cuadro 1).

### **Origen de las especies reactivas del oxígeno**

En los organismos vivos, las ERO tienen orígenes endógenos y exógenos. El primer grupo abarca a los RL generados intracelularmente y que actúan tanto dentro como fuera de la célula.<sup>13</sup> Su producción, accidental o deliberada, se localiza en cuatro fuentes claramente definidas:<sup>4,11</sup> a) Durante el metabolismo aeróbico normal, las mitocondrias consumen oxígeno molecular y lo reducen secuencialmente hasta producir agua. Una pequeña fracción del oxígeno se metaboliza vía reducción univalente y los inevitables productos intermedios de esta reacción son el radical superóxido, el peróxido de hidrógeno y el hidroxilo. b) Los peroxisomas que contienen acil coA oxidasa, dopamina  $\beta$ -hidroxilasa, urato oxidasa y otras generan peróxido de hidrógeno como producto intermedio. c) El sistema enzimático citocromo P-450 constituye una defensa primaria contra varios xenobióticos y sustancias

**Cuadro 1**  
**CARACTERÍSTICAS DE LAS PRINCIPALES ESPECIES REACTIVAS DE LOXÍGENO (EROS)**  
**CHARACTERISTICS OF THE MAIN REACTIVE OXYGEN SPECIES (ROS)**

<i>ROS</i>	<i>Symbol</i>	<i>Characteristics</i>
Superoxide	$O_2^{\cdot -}$	Intermediate in $O_2$ reduction to $H_2O$ . Good reductant and bad oxidant. It is important because it generates more ROS, such as OH $\cdot$ and $H_2O_2$ .
Hydroxyl	HO $\cdot$	The most powerful oxidant in biological systems. It is generated from Fenton and Haber-Weiss reactions.
Peroxyl	ROO $\cdot$	Low oxidant ability, but high diffusibility.
Alkoxy	RO $\cdot$	Medium oxidant ability with lipids.
Hydrogen peroxide	$H_2O_2$	Originated from $O_2^{\cdot -}$ dismutation by the SOD enzyme. Can originate very reactive FR when it reacts with transition metals.
Hypochlorous acid	HClO	Formed through myeloperoxidase action, it is present in neutrophils on $H_2O_2$ .
Singlet oxygen	$^1O_2$	Molecularly excited oxygen through sunlight and radiation. Highly oxidant.

Adapted from Yu, 1994.

produced when phagocytes (monocytes, neutrophils and macrophages) destroy cells infected by bacteria or viruses through an oxidizing discharge composed basically of hydrogen peroxide, hypochlorite and nitric oxide, together with superoxide anion.

Exogenous sources outstandingly increase ROS production.<sup>12</sup> It has been established that a high intake of some transition metals such as Fe and Cu promote FR generation from peroxides.<sup>7,11</sup> These ions' ability to gain and lose electrons is the basis for the creation and propagation of several toxic reactions.<sup>5,8</sup> Other exogenous sources are radiation, cigarette smoke, certain organic solvents and pesticides,<sup>13,14</sup> products obtained from food lipid oxidation,<sup>15</sup> sun radiation, mycotoxins,<sup>12</sup> trauma, hyperoxia and over-exercising.<sup>9</sup>

### **Action of ROS on macromolecules**

Almost every biological macromolecule can be oxidized by FR<sup>10,16,17</sup> (Figure 1), however, the most labile biomolecules are lipids.<sup>6,8</sup>

The mechanism, measurement and interpretation of lipid peroxidation (LPO) have been widely reviewed.<sup>7,8</sup> It has been proven that it can take place in biological systems under enzymatic control or without it. When it happens without it, it is related to oxidative stress and cell injury.<sup>18</sup>

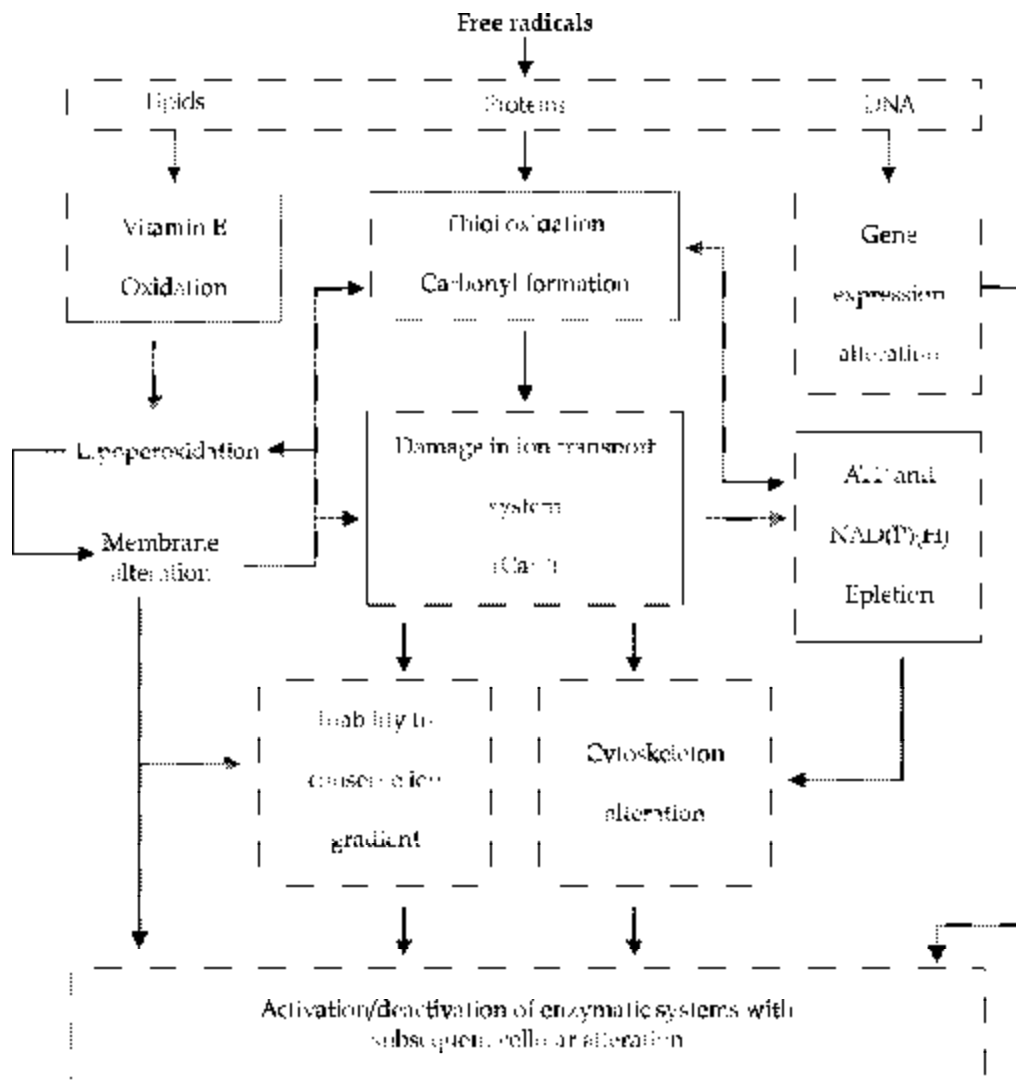
endógenas que aumentan la producción de RL. *d)* Los aniones superóxido pueden ser producidos deliberadamente cuando los fagocitos (monocitos, neutrófilos y macrófagos) destruyen células infectadas con bacterias o virus, mediante una descarga oxidante compuesta básicamente por el peróxido de hidrógeno, hipoclorito y óxido nítrico, además del anión superóxido.

Las fuentes exógenas incrementan en forma notable la producción de las ERO.<sup>12</sup> Se ha establecido que altas ingestas de algunos metales de transición como el Fe y Cu promueven la generación de RL a partir de peróxidos.<sup>7,11</sup> La capacidad de estos iones para aceptar y donar electrones constituye la base para la formación y propagación de muchas reacciones tóxicas.<sup>5,8</sup> Otras fuentes exógenas descritas son la radiación, humo del cigarro, algunos solventes orgánicos y pesticidas,<sup>13,14</sup> los productos de la oxidación de lípidos en alimentos,<sup>15</sup> la radiación solar, las micotoxinas,<sup>12</sup> el trauma, la hiperoxia y el sobreejercicio.<sup>9</sup>

### **Acción de las especies reactivas del oxígeno sobre macromoléculas**

La mayoría de las macromoléculas biológicas pueden ser oxidadas por los RL<sup>10,16,17</sup> (Figura 1); sin embargo, las biomoléculas más lábiles son los lípidos.<sup>6,8</sup>

La peroxidación de lípidos (LPO) es un proceso cuyo mecanismo, medición e interpretación han sido ampliamente revisados.<sup>7,8</sup> Se ha precisado que en los sistemas biológicos puede ocurrir bajo control enzimático o no enzimático; esta última forma es la que se relaciona con el estrés oxidativo y el daño celular.<sup>18</sup>



**Figura 1.** Mecanismos involucrados en el daño celular provocado por la acción de los radicales libres (Adaptado de Kehrer, 1993).  
Mechanisms involved in cell injury caused by the action of free radicals (Adapted from Kehrer, 1993).

LPO is particularly destructive, for it develops as a self-perpetrating chain reaction.<sup>6</sup> It starts when ROS attack a polyunsaturated fatty acid (PFA) and snatch one hydrogen atom from the methylene group adjacent to the double bond, creating the acetylacid fatty FR. Oxygen is quickly added to this molecule and it is transformed into a peroxide fatty acid FR that acts as a transporter in the chain reaction, attacking more PFA and therefore triggering new reactions. If there are transition metal ions<sup>9,11</sup> and double bonds in the PFA chain, this mechanism will be facilitated.<sup>8</sup> LPO end products are peroxidized lipids; when these are degraded, they generate new FR and several cytotoxic compounds such as aldehydes, for example 4-hydroxynonenal (4-HNE) and malondialdehyde (MDA),<sup>6,11,18</sup> though it has been proved that this last one has a low toxicity.<sup>19</sup> The consequences of damage in the molecular structure of PFA are

La LPO es particularmente destructiva, ya que se desarrolla como una reacción en cadena autopropagante.<sup>6</sup> Se inicia cuando las ERO atacan un ácido graso polinsaturado (AGP) y le arrebatan un átomo de hidrógeno al grupo metileno adyacente al doble enlace, para formar el RL acilácido graso. Rápidamente esta molécula adiciona oxígeno y se transforma en un RL peróxido ácido graso que actúa como transportador de la reacción en cadena ya que ataca a otros AGP e inicia nuevas reacciones. Este mecanismo se facilita con la presencia de iones de metales de transición<sup>9,11</sup> y por los dobles enlaces contenidos en la cadena AGP.<sup>8</sup> Los productos finales de la LPO son lípidos peroxidados que al degradarse originan nuevos RL y una amplia variedad de compuestos citotóxicos como los aldehídos, entre ellos 4-hidroxinonenal (4-HNE) y malondialdehído (MDA),<sup>6,11,18</sup> aunque se ha comprobado que este último posee una baja toxicidad.<sup>19</sup> Las consecuencias del daño en la estructura molecular del AGP son más evidentes cuando estos lípidos forman parte de las

more evident when these lipids are part of the cell and subcell membranes, because it alters their cohesion, fluidity, permeability and metabolic function.<sup>4,16</sup>

ROS action is more dramatic with lipids even though proteins, peptides and aminoacids are also their targets; these reactions have a slower progress.<sup>6,11</sup> It has been noticed that a significant amount of aromatic or sulfurate aminoacids in a protein structure make it more vulnerable to FR.<sup>11</sup> *In vitro* observations determine that proteins will be altered in those places binded to transition metals. These sites are very sensitive because hydrogen peroxide easily reacts with binded metals to form hydroxyl ions, which will in turn attack adjacent aminoacids.<sup>6</sup>

To exemplify the changes triggered by ROS on proteins, Kehrer<sup>10</sup> describes the effects on Ca<sup>+2</sup> ion gradient. Usually, the intracellular content of this ion is 10 000 times less compared to the extracellular concentration, any alteration in its transportation will significantly alter the cell's function. The calcium ATPase enzyme, which maintains Ca<sup>+2</sup> ion gradient, contains thiol groups that can be inactivated by ROS. If this happens, the enzyme loses its catalytic activity and Ca<sup>+2</sup> homeostasis is modified. The increased intracellular concentration of these ions activates proteases that attack the cytoskeleton, as well as nucleases, which fragment DNA.<sup>9</sup> Nowadays this fact is considered as one of the main causes of metabolic alterations.<sup>16</sup> Oxidative injury in proteins produces peroxides and carbonyls.<sup>6</sup>

Carbohydrates, such as glucose and other related monosaccharide, are peroxidized under certain conditions and form dicarbonylic compounds and hydrogen peroxide.<sup>15</sup> This fact is important because once activated, these biomolecules can interact with one another and form new molecular associations.

Another target for ROS is DNA, mainly mitochondrial DNA.<sup>13,16</sup> Due to its location, this DNA is exposed to a high, constant flow of ROS from the respiratory chain. Furthermore its structure lacks histones, which makes it less stable. Also, it has been observed that its repair mechanisms are less efficient.<sup>1,20</sup> Amongst the alterations experienced by DNA, the following are described: desoxyribose oxidation, chain intercrossing and nitrogen bases modification. However, these alterations will be significant if they are intense and incapable of avoiding repair mechanisms before replication occurs.<sup>6</sup>

membranas celulares o subcelulares, ya que se altera su cohesión, fluidez, permeabilidad y función metabólica.<sup>4,16</sup>

Si bien las proteínas, péptidos y aminoácidos también constituyen un blanco para las ERO, su acción es menos dramática que frente a los lípidos, debido al lento progreso de las reacciones.<sup>6,11</sup> Se ha observado que la presencia de cantidades significativas de aminoácidos aromáticos o sulfurados en una estructura proteínica la tornan más vulnerable a los RL.<sup>11</sup> Estudios realizados *in vitro* precisan que las proteínas sufren alteraciones localizadas en los sitios ligados a metales de transición. Estos sitios son particularmente susceptibles debido a la facilidad con que los metales ligados reaccionan con el peróxido de hidrógeno para formar iones hidroxilo los que, posteriormente, atacan a los aminoácidos adyacentes.<sup>6</sup>

Kehrer<sup>10</sup> plantea un ejemplo de los cambios que pueden desencadenar las ERO en su acción sobre las proteínas al describir los efectos sobre la gradiente de iones Ca<sup>+2</sup>. El contenido intracelular de este ion es habitualmente diez mil veces menor en comparación con su concentración extracelular, y cualquier perturbación que afecte su transporte altera significativamente la función celular. La enzima calcio ATPasa, encargada de mantener la gradiente de iones Ca<sup>+2</sup>, contiene grupos tioles que pueden ser inactivados por las ERO. Cuando ello ocurre, se pierde la actividad catalítica de la enzima y se modifica de esta manera la homeostasis del Ca<sup>+2</sup>. El incremento en la concentración intracelular de estos iones estimula la activación de proteasas, que atacan el citoesqueleto, y de nucleasas que fragmentan el ADN.<sup>9</sup> Actualmente este hecho se considera como una de las principales causas de alteración metabólica.<sup>16</sup> Los productos del daño oxidativo de proteínas son la formación de peróxidos y carbonilos.<sup>6</sup>

Los carbohidratos, como la glucosa y otros monosacáridos relacionados, sufren peroxidación bajo ciertas condiciones y forman compuestos dicarbonylicos y peróxido de hidrógeno.<sup>15</sup> La importancia de este hecho radica en que estas biomoléculas una vez activadas pueden interactuar con otras y conformar nuevas asociaciones moleculares.

El ADN también constituye un blanco de ataque por parte de las ERO, principalmente el ADN mitocondrial.<sup>13,16</sup> Este ADN, por su localización, se encuentra expuesto a un flujo constante y elevado de ERO provenientes de la cadena respiratoria; además, carece de histonas en su estructura lo que le resta estabilidad. Por otra parte, se ha observado que sus mecanismos de reparación son menos eficientes.<sup>1,20</sup> En general, dentro del espectro de alteraciones que puede sufrir el ADN se describe la oxidación de desoxirribosas, ruptura y entrecruzamientos de cadenas y la modificación de bases nitrogenadas, principalmente. Sin embargo, estas alteraciones serán significativas en la medida que sean intensas y capaces de eludir los sistemas de reparación antes de que ocurra la replicación.<sup>6</sup>

En resumen, la lesión celular acontece como producto del daño que sufren las biomoléculas que confor-

In short, cell injury is produced when damage occurs in biomolecules that conform the cell's different structures, mostly when changes in the membrane alter its metabolic function. This can have several causes: loss of catalytic activity, changes in protein and enzyme polarity, modification of ionic channels; hormone response receptors and neurotransmitters are altered, or the covalent union between FR and receptors or biomolecules that modifies the cellular antigenic structure.<sup>13,17</sup>

### **Antioxidants**

Due to the constant production of ROS and other FR during metabolic processes, the cell has developed a powerful, complex defense system that limits its exposure to these agents these are the so-called antioxidants<sup>4</sup> (AO). Molecules that prevent an unlimited generation of FR or inhibit their reaction with biological structures.<sup>20</sup>

### **Classification**

Several antioxidants are enzymes or essential nutrients, or include these in their molecular structure.<sup>13</sup> An essential nutrient is a compound that must be eaten because the organism is unable to synthesize it. Based on this characteristic, some authors classify AO as non-enzymatic and enzymatic.<sup>2,20,21</sup> However, another frequently used classification is based on the protective mechanism used by the AO, grouping them in those that prevent FR generation and those that trap FR.<sup>6,12</sup> They are also classified according to their intracellular or extracellular location.<sup>2</sup>

### **Antioxidant net**

To maximize protection, plasmatic and intracellular AO are tuned to achieve the utmost suppression of those reactions that generate FR.<sup>4,12</sup> They are distributed mostly in the cell's organelles where, due to intense activity and metabolic functions, FR generation will be higher, both in membranes and cytosol.<sup>6</sup> It is agreed that AO defense in aerobic organisms involves preventive AO (which limit ROS formation or traps intermediate FR thus stopping chain reactions), as well as an enzymatic complex that removes or repairs those cellular components that were injured or altered.<sup>4,11,13</sup>

man sus distintas estructuras, pero particularmente por las alteraciones producidas en la membrana que alteran su función metabólica ya sea por la pérdida de la actividad catalítica o cambios en la polaridad de proteínas y enzimas de membrana, modificación de canales iónicos, alteración de los receptores asociados a respuestas hormonales y neurotransmisores, la unión covalente de los RL con receptores o con biomoléculas que modifican la estructura antigénica celular.<sup>13,17</sup>

### **Antioxidantes**

Dado que las ERO y otras formas de RL se producen constantemente en forma inevitable durante los procesos metabólicos, la célula ha desarrollado un poderoso y complejo sistema de defensa para limitar la exposición a estos agentes que reciben el nombre genérico de antioxidantes<sup>4</sup> (AO), y pueden definirse como moléculas que previenen la formación descontrolada de RL o inhiben sus reacciones con estructuras biológicas.<sup>20</sup>

### **Clasificación**

Muchos de los AO son enzimas o nutrientes esenciales, o incorporan nutrientes esenciales en la estructura de sus moléculas,<sup>13</sup> entendiéndose como nutriente esencial a aquel compuesto que debe ser ingerido porque el organismo es incapaz de sintetizarlo. Esta característica es tomada por algunos autores para clasificarlos en AO no enzimáticos y enzimáticos.<sup>2,20,21</sup> No obstante, otro criterio de clasificación comúnmente empleado se basa en el mecanismo mediante el cual los AO ejercen su acción protectora, agrupándolos en aquellos que cumplen una función preventiva en la formación de los RL y en aquellos que interceptan o capturan los que ya se han producido.<sup>6,12</sup> También es posible clasificarlos conforme a su localización, ya sea en intra o extracelulares.<sup>2</sup>

### **Red antioxidante**

Para proveer el máximo de protección, los AO plasmáticos e intracelulares están armónicamente integrados para lograr la máxima supresión de las reacciones que generan RL.<sup>4,12</sup> Estos últimos se distribuyen preferentemente en los organelos que, por la intensidad de su actividad y su función metabólica, generan una mayor producción de RL, localizados tanto en membranas como en el citosol.<sup>6</sup> Existe consenso de que la defensa AO en los organismos aerobios involucra no sólo a los AO preventivos que limitan la formación de ERO o capturan los RL intermediarios deteniendo las reacciones en cadena, sino también al complejo enzimático encargado de remover o reparar a los constituyentes celulares dañados o alterados.<sup>4,11,13</sup>

Un componente adicional en la red AO son las proteínas de almacén y transporte de iones metálicos, cuya

Some proteins are also part of the AO net, such as those in charge of storage and transport of metallic ions; they trap and limit exposure to  $\text{Fe}^{+3}$  and  $\text{Cu}^{+2}$  ions. An excess of these can promote FR generation. Proteins with this function are ferritin, transferrin, lactoferrin, ceruloplasmin, heptoglobin, metallothioneine, hemopexine and carnosine.<sup>9,11</sup>

### **Non-enzymatic antioxidants**

Non-enzymatic antioxidants constitute a heterogeneous group of hydrophobic and hydrophilic molecules that trap FR and create chemical species that are less noxious to cell integrity.<sup>16</sup> Essentially, they give an electron to a FR to stabilize it.<sup>2</sup>

Hydrophilic non-enzymatic antioxidants are located mainly in the cytosol, mitochondrial and nuclear matrices and in extracellular fluids. They are vitamin C, glutathione, uric acid, ergothioneine and polyphenolic flavonoids.

#### **Vitamin C**

It can be found intra and extracellularly as ascorbate. It reacts directly with superoxide, hydroxyl and several lipidic hydroperoxide FR. It also acts on tocopheroxyl FR, returning it to vitamin E. This process transforms ascorbate into dehydroascorbate FR, which returns to its original form through enzymatic action or thiolic cell substrates.<sup>9,22</sup> Even with this evident AO characteristic, ascorbate can turn into a powerful prooxidant if there are high concentrations of  $\text{Fe}^{+3}$  and  $\text{Cu}^{+2}$  ions.<sup>4,9,16</sup>

#### **Glutathione**

Its reduced form is a tripeptide (GSH) that has variable tissue distribution. It has a low molecular weight and is the most abundant thiolic compound in mammalian cells.<sup>22</sup> Due to its chemical properties, it reacts with several oxidant compounds, such as hydrogen peroxide, superoxide, hydroxyl and reactive carbon species;<sup>4,7</sup> it can also reduce tocopheroxyl FR and dehydroascorbate to their original forms.<sup>22</sup>

#### **Uric acid**

It has traditionally been considered as an end product of purine metabolism. Its function as an intra and extracellular biological AO has been accepted recently. It seems to prevent vitamin C oxidation and forms complexes with Fe and Cu.<sup>4,12</sup>

acción es secuestrar y limitar la exposición a los iones  $\text{Fe}^{+3}$  y  $\text{Cu}^{+2}$ , ya que su exceso promueve la generación de RL. Las proteínas que cumplen esta función son: Ferritina, transferrina, lactoferrina, ceruloplasmina, haptoglobina, metalotioneína, hemopexina y carnosina.<sup>9,11</sup>

### **Antioxidantes no enzimáticos**

Los AO no enzimáticos constituyen un heterogéneo grupo de moléculas hidrófobas e hidrófilas que capturan RL y originan especies químicas menos nocivas para la integridad celular.<sup>16</sup> En esencia, el mecanismo de acción involucrado es la donación de un electrón a un RL con el fin de estabilizarlo.<sup>2</sup>

Los AO no enzimáticos hidrófilos se ubican principalmente en el citosol, matriz mitocondrial y nuclear y en fluidos extracelulares; éstos incluyen vitamina C, glutati6n, 6cido 6rico, ergotione6na y flavonoides polifen6licos.

#### **Vitamina C**

Se encuentra bajo la forma de ascorbato, distribuido intra y extracelularmente. Reacciona en forma directa con los RL super6xido, hidroxilo y varios hidroper6xidos lip6dicos. Tambi6n act6a sobre el RL tocoferoxilo regener6ndolo a vitamina E. Este proceso transforma el ascorbato en el RL deshidroascorbato. El retorno a su forma nativa es por acci6n enzim6tica o por sustratos celulares ti6licos.<sup>9,22</sup> A pesar de su manifiesta propiedad AO, el ascorbato puede desempe6arse como un potente prooxidante en presencia de excesivas concentraciones de iones  $\text{Fe}^{+3}$  y  $\text{Cu}^{+2}$ .<sup>4,9,16</sup>

#### **Glutati6n**

Su forma reducida (GSH) es un trip6ptido que presenta una distribuci6n tisular variable y constituye el compuesto ti6lico de bajo peso molecular m6s abundante en las c6lulas de mam6feros.<sup>22</sup> Sus propiedades qu6micas le permiten actuar frente a numerosos compuestos oxidantes, tales como per6xido de hidr6geno, super6xido, hidroxilo y especies reactivas del carbono;<sup>4,7</sup> adem6s, reduce el RL tocoferoxilo y deshidroascorbato y los reconvierte a su forma original.<sup>22</sup>

#### **6cido 6rico**

Aunque tradicionalmente ha sido considerado un producto terminal del metabolismo de las purinas, su funci6n como AO biol6gico, tanto intra como extracelular, ha comenzado a reconocerse. Su mecanismo de acci6n aparentemente ser6a prevenir la oxidaci6n de la Vitamina C y formar complejos con los metales Fe y Cu.<sup>4,12</sup>

#### **Ergotione6na**

Llega a las c6lulas de los mam6feros a trav6s de la ingesta de vegetales. Es un poderoso capturador de



## Ergothioneine

It reaches mammalian cells through vegetable intake. It is very powerful in capturing ROS produced by mieloperoxidase in neutrophils, and can react with peroxinitrites and their derivatives and trap hydroxyl ions. Its intermediate oxidized forms are rapidly regenerated when there is ascorbate.<sup>22</sup>

## Polyphenolic flavonoids

This is a wide group of phenolic compounds (catechins, cyanins, quercines), which act as potent metal chelants and trap ROS and reactive nitrogen species (RNS) *in vitro*. They are located intra and extracellularly and can be lipo or hydrosoluble.<sup>2</sup>

Hydrophobic non-enzymatic AO are located in membranes and generally block hydroperoxide formation or interrupt LPO propagation.<sup>8</sup> These include: a) Vitamin E. Its generic name refers to its eight structural tocopherol isomers, of which the  $\alpha$ -tocopherol isomer is the most potent AO. It is, together with  $\gamma$ -tocopherol, essential for cell defense. It traps superoxide, hydroxyl and lipid peroxyl FR in cell and sub-cell membranes (mitochondria and smooth endoplasmic reticulum), and stops LPO propagation. It is thought that  $\gamma$ -tocopherol is more efficient against RNS.<sup>23</sup> To stabilize a FR, tocopherol is transformed into tocopheroxyl FR.<sup>20</sup> Fortunately, tocopheroxyl, returns to its original form through reactions mediated mostly by coenzyme Q and, to a lesser extent vitamin C and A.<sup>23</sup> Some researchers state that an overproduction of ROS can cause a significant drop of vitamin E tissue concentration.<sup>22</sup> b) Vitamin A. This generic term includes those animal origin compounds that show vitamin A biological activity. In vegetables, it exists as  $\beta$ -carotene, a provitamin.<sup>24</sup> Their structures makes them excellent FR traps. They protect against LPO, mostly when this is induced by the xantine oxidase system and they eliminate superoxide ion and peroxy radicals. Like Vitamin C, it has dual behavior, for it acts as a prooxidant under high oxygen partial pressures.<sup>4,11</sup> c) Ubiquinone, also called coenzyme Q, is a quinone derivate. It has a similar structure to tocopherol and it has been identified as an additional carrier in the respiratory chain.<sup>24</sup> Almost 50% of cellular ubiquinone is formed in mitochondria.<sup>22</sup> Though its AO function *in vivo* is being discussed,<sup>20</sup> its reduced form, ubiquinol, has a strong AO activity compared to the oxidized form. When exposed to FR, it is consumed

ERO producido por la acción de la mieloperoxidasa presente en neutrófilos. Puede reaccionar con peroxinitritos y sus derivados y capturar iones hidroxilos. Sus estados oxidados intermedios son rápidamente regenerados en presencia de ascorbato.<sup>22</sup>

## Flavonoides polifenólicos

Se designa con este nombre a un amplio grupo de compuestos fenólicos (catequinas, cianidinas, quercetinas) que actúan como potentes quelantes de metales y capturadores *in vitro* de ERO y especies reactivas del nitrógeno (ERN). Pueden ser lipo o hidrosolubles y se localizan tanto intra como extracelularmente.<sup>2</sup>

Los AO no enzimáticos de naturaleza hidrófoba se ubican en membranas y, generalmente, bloquean la formación de hidroperóxidos, o interrumpen la propagación de la LPO;<sup>8</sup> éstos incluyen: a) Vitamina E, su nombre genérico hace referencia a sus ocho isómeros estructurales de tocoferol, de los cuales el  $\alpha$ -tocoferol es el isómero de mayor potencia AO y, junto al  $\gamma$ -tocoferol, se le considera esencial en la defensa celular. La captura de RL superóxido, hidroxilo y peroxilos lipídicos la desarrolla en membranas celulares y subcelulares (mitocondria y retículo endoplásmico liso) y detiene la propagación de la LPO. Se ha informado que el  $\gamma$ -tocoferol resulta más eficiente contra ERNs.<sup>23</sup> Para estabilizar un RL, el tocoferol se convierte en el RL tocoferoxilo.<sup>20</sup> Afortunadamente, el tocoferoxilo retorna a su estado original a través de reacciones mediadas por la coenzima Q y en menor grado por las vitaminas C y A.<sup>23</sup> Algunos investigadores sostienen que una sobreproducción de ERO puede llevar a una disminución significativa de la concentración tisular de vitamina E.<sup>22</sup> b) Vitamina A, es un término genérico que abarca a los compuestos de origen animal que presentan actividad biológica de vitamina A. En los vegetales, existe como provitamina llamada  $\beta$ -caroteno.<sup>24</sup> Por su conformación estructural son excelentes capturadores de RL. Protegen contra la LPO, sobre todo la inducida por el sistema de la xantina oxidasa, y elimina el ion superóxido y radicales peroxilo. Al igual que la vitamina C, tiene un comportamiento dual al actuar como prooxidante en condiciones de altas presiones parciales de oxígeno.<sup>4,11</sup> c) Ubiquinona, también llamada coenzima Q, es un derivado de la quinona. Su estructura es semejante al tocoferol y se le ha identificado como un portador adicional en la cadena respiratoria.<sup>24</sup> Aproximadamente 50% de la ubiquinona celular se encuentra en la mitocondria.<sup>22</sup> Aunque su función antioxidante *in vivo* está en discusión,<sup>20</sup> su forma reducida, el ubiquinol, tiene una fuerte actividad AO, comparado con su forma oxidada, llegando a consumirse antes que la vitamina E frente a una situación de exposición a RL. El ubiquinol impide que las ERO desencadenen la LPO

before vitamin E. Ubiquinol stops ROS from triggering LPO and it participates as well in the recycling of vitamin E inside mitochondria.<sup>9,22</sup>

Compounds such as albumin, lipic acid,<sup>22</sup> fibrinogen,<sup>25</sup> bilirubin and glucose have also been thought to have AO activity.<sup>4</sup>

### **Enzimatic antioxidants**

Some researchers state that the AO function performed by enzymes has advantages compared to AO compounds, for this activity is regulated according to cellular requirements: they can be induced, inhibited or activated by endogenous effectors.<sup>26</sup> Ho *et al.*<sup>27</sup> submit evidence of the importance of AO enzymes in protection against oxidant agents. When using transgenic mice designed to overexpress the activity of some AO enzymes, it was noticed that there is a notorious tolerance of certain tissues when they are exposed to toxics and pathologic conditions that would promote ROS action.

Enzymatic AO catalyze electron transference from a substrate towards FR. Later, the substrates or reducing agents used in these reactions are regenerated to be used again, they achieve this by using the NADPH produced in different metabolic pathways.<sup>20</sup> A prolonged exposure to ROS can result in diminished NADPH concentration, which is needed in other important physiologic processes,<sup>12</sup> even though some enzymatic AO do not consume cofactors.

### **Superoxide dismutase (SOD)**

This enzyme is a metalloprotein present in aerobic cells and extracellular fluids. Its function is to catalyze FR superoxide dismutation into hydrogen peroxide, which does not require cosubstrates.<sup>16</sup> SOD has three isoforms, depending on the metal it contains. The predominant isoforms are SOD-Cu and SOD-Zn, which are found mostly in cytosol, while isoform SOD-Mn is located in the mitochondrial matrix.<sup>20</sup> Biosynthesis of this enzyme is strongly regulated by the substrate concentration on which it acts.<sup>4</sup>

### **Catalase**

This hemoprotein contains four heme groups. It has a wide intracellular distribution, and it concentrates mainly in peroxisomes and mitochondria,<sup>22,24</sup> where it catalyzes hydrogen peroxide (originated from su-

también participa en el reciclaje de la vitamina E en el ámbito mitocondrial.<sup>9,22</sup>

Otros compuestos sugeridos con actividad AO son la albúmina, el ácido lipoico,<sup>22</sup> el fibrinógeno,<sup>25</sup> la bilirubina y la glucosa.<sup>4</sup>

### **Antioxidantes enzimáticos**

Según algunos investigadores, la función AO desempeñada por enzimas puede presentar ventajas frente a los compuestos AO en el sentido de que su actividad es regulada acorde con los requerimientos celulares: pueden ser inducidas, inhibidas o activadas por efectores endógenos.<sup>26</sup> Ho *et al.*<sup>27</sup> presentan una evidencia directa de la importancia de las enzimas AO en la protección contra agentes oxidantes. Al emplear ratones transgénicos diseñados para sobreexpresar la actividad de algunas enzimas AO, observaron una marcada tolerancia de ciertos tejidos expuestos a tóxicos y condiciones patológicas que favorecerían la acción de las ERO.

El grupo de AO enzimáticos cataliza la transferencia de electrones desde un sustrato hacia los RL. Posteriormente los sustratos o agentes reductores empleados en estas reacciones se regeneran para ser nuevamente activos y lo hacen a expensas del NADPH producido en las diferentes vías metabólicas.<sup>20</sup> Frente a una situación de exposición prolongada a ERO puede ocurrir una disminución en las concentraciones del NADPH necesario en otros importantes procesos fisiológicos,<sup>12</sup> a pesar de que algunos AO enzimáticos no consumen cofactores.

### **Superóxido dismutasa (SOD)**

Esta enzima es una metaloproteína presente en las células aerobias y fluidos extracelulares. Su función es catalizar la dismutación del RL superóxido a peróxido de hidrógeno, lo que no requiere de cosustratos.<sup>16</sup> La SOD presenta tres isoformas, dependiendo del metal que contenga. Las isoformas predominantes son la SOD-Cu y SOD-Zn, localizadas preferentemente en el citosol. La isoforma SOD-Mn se encuentra en la matriz mitocondrial.<sup>20</sup> La biosíntesis de esta enzima se encuentra fuertemente regulada por la concentración del sustrato sobre el cual actúa.<sup>4</sup>

### **Catalasa**

Es una hemoproteína que contiene cuatro grupos hem. De amplia distribución intracelular, se concentra principalmente en peroxisomas y mitocondrias<sup>22,24</sup> para catalizar la descomposición del peróxido de hidrógeno —proveniente de la dismutación del superóxido— en agua y oxígeno. Esta función es compartida con la enzima glutatión peroxidasa que no requiere de cofactores. En general las bajas concentraciones de peróxido de hidrógeno estimulan la actividad de peroxidasa, mientras que las altas concentraciones de peróxido son preferentemente catalizadas por la catalasa.<sup>4</sup>

peroxide dismutation) decomposition into water and oxygen. This function is shared with an enzyme, glutathione peroxidase, which does not require co-factors. Generally, low concentrations of hydrogen peroxide stimulate peroxidase activity, while high peroxide concentrations will be preferentially catalyzed by catalase.<sup>4</sup>

### **Glutathione peroxidase (GSH-Px)**

This selenoprotein is located in the mitochondrial matrix and cytosol of animal cells. When GSH acts as a reductant, it catalyzes the reduction of hydrogen peroxide and other organic hydroperoxides into water and alcohol respectively.<sup>22</sup> Like other selenoproteins, its active site contains selenium (Se), in the form of selenocysteine residues incorporated into a polypeptide chain formed by 21 aminoacids.<sup>28</sup> Four GSH-Px isoforms have been described, they are all found in different locations and vary in substrate specificity.<sup>29</sup> Three have a tetrameric structure.<sup>30,31</sup> The first one, cellular or classic GSH-Px, is found in almost every cell; it can reduce hydrogen peroxide and free organic hydroperoxides to turn them into water and alcohol. A high correlation between its blood activity and the Se plasmatic concentration allows us to use it as an indicator for evaluating the nutritional metabolic balance of this mineral in different species, mostly in dairy cows<sup>32,33</sup> and sheep.<sup>34</sup> The second isoform is plasmatic or extracellular GSH-Px, a purified glycoprotein characterized from human plasma that is synthesized in the kidney's proximal tubular cells. The third one is phospholipid hydroperoxide GSH-Px, its primary biological function is to protect against LPO by reducing fatty acid hydroperoxides in cell membranes and prevent the oxidation of low density lipoproteins. This isoform is the only one with a monomeric structure; that is, it contains only one selenocysteine residue.<sup>30,31</sup> The last one is gastrointestinal GSH-Px and is the most important glutathione dependant peroxidase in the gastrointestinal tract. It reduces cholesterol hydroperoxides and protects against toxicity caused by lipid hydroperoxides intake.<sup>29</sup>

### **Metal function in antioxidant defense**

It is worth reviewing some trace minerals (Zn, Se, Mn, Fe, Cu) involved in protection against oxidative injury. In general, they participate in enzymatic systems as structural components or activators, but they can also act as antioxidants in and of themselves.<sup>35</sup>

### **Glutathion peroxidasa (GSH-Px)**

Es una selenoproteína que, en las células animales, se ubica en la matriz mitocondrial y en el citosol. En presencia de GSH, como agente reductor, cataliza la reducción del peróxido de hidrógeno y otros hidroperóxidos orgánicos en agua y alcohol, respectivamente.<sup>22</sup> Al igual que otras selenoproteínas, el sitio activo de GSH-Px contiene selenio (Se) bajo la forma de residuos de selenocisteína incorporada a una cadena polipeptídica conformada por 21 aminoácidos.<sup>28</sup> Se han descrito cuatro isoformas de GSH-Px que difieren tanto en su ubicación como en la especificidad de sustrato,<sup>29</sup> tres de las cuales presentan estructura tetramérica.<sup>30,31</sup> La primera de ellas, GSH-Px celular o clásica, está prácticamente en todas las células, puede reducir el peróxido de hidrógeno e hidroperóxidos orgánicos libres y convertirlos en agua y alcoholes. La alta correlación existente entre su actividad sanguínea y la concentración plasmática de Se ha permitido emplearla como indicador para evaluar el balance metabólico nutricional de este mineral en diferentes especies, principalmente bovinos lecheros<sup>32,33</sup> y ovinos.<sup>34</sup> La segunda isoforma es la GSH-Px plasmática o extracelular, es una glicoproteína purificada, caracterizada a partir de plasma humano que se sintetiza en las células tubulares proximales del riñón. El tercer tipo es la GSH-Px fosfolípido hidroperóxido, cuya función biológica primaria es proteger contra la LPO reduciendo hidroperóxidos de ácidos grasos en las membranas celulares y previniendo la oxidación de lipoproteínas de baja densidad. Es la única isoforma cuya estructura es monomérica; es decir, contiene un solo residuo de selenocisteína.<sup>30,31</sup> El último tipo se denomina GSH-Px gastrointestinal y representa la principal peroxidasa dependiente de glutathion en el tracto gastrointestinal. Es importante en la reducción de hidroperóxidos de colesterol y en la protección contra la toxicidad por ingestión de hidroperóxidos lipídicos.<sup>29</sup>

### **Función de los metales en la defensa antioxidante**

Una atención especial merecen algunos minerales traza ligados a la protección contra el daño oxidativo (Zn, Se, Mn, Fe, Cu). Aunque su mecanismo general de acción es a través de la participación en sistemas enzimáticos, ya sea como componentes estructurales o activadores, también son capaces de ejercer funciones AO en forma independiente.<sup>35</sup>

En este sentido, el Zn puede ejercer sus efectos en forma mediata o inmediata.<sup>36</sup> La primera requiere de una prolongada exposición al Zn, lo que desencadena la inducción de metalotioneínas, las cuales, en último término, cumplen la acción AO. La mecánica del efecto inmediato se desarrolla a través de dos vías: Reduciendo la formación de radicales hidroxilo a partir del

Zn can act in a mediate or immediate way.<sup>36</sup> The first requires a prolonged Zn exposure, which triggers the induction of metallothioneines, which in turn act as antioxidants. The immediate effect has two different pathways: First, by reducing hydroxyl radical formation from hydrogen peroxide by competing with  $\text{Fe}^{+2}$  and  $\text{Cu}^+$  ions that participate in Fenton's reaction and second, by decreasing the susceptibility of sulfhydryl groups in proteins to oxidation. Zn's AO activity also contributes with non-enzymatic stabilization of membranes.<sup>4,37</sup>

Se is found in the organism in selenoenzymes. Initially, Se was thought to be toxic, and it was only 30 years ago that its importance in livestock health and production was established, when it was proven to prevent nutritional muscular dystrophy. This disorder is related to a GSH-Px metalloenzyme deficiency.<sup>38</sup> When there is Se deficiency, this and other selenoenzymes have a diminished activity, thus exposing the cell to ROS oxidant attack.<sup>39</sup> There are now 11 fully identified selenoproteins.<sup>29,40</sup>

Recent studies in rats show that Mn has protective properties against LPO in some tissues,<sup>41</sup> even though the mechanisms that are involved are not well understood, it is thought that Mn increases SOD activity, trapping hydroxyl and superoxide radicals, promoting metallothioneine synthesis and competing with Fe ions.

Transition metals, like  $\text{Fe}^{+2/+3}$  and  $\text{Cu}^{+/+2}$ , not only develop important AO functions as enzyme and protein components,<sup>35</sup> but also act as powerful FR generators when found as free ions in high concentrations. Their reduced form ( $\text{Fe}^{+2}$  and  $\text{Cu}^+$ ) is more reactive than the oxidized one ( $\text{Fe}^{+3}$  and  $\text{Cu}^{+2}$ ).  $\text{Fe}^{+2}$  and  $\text{Cu}^+$  ions promote hydrogen peroxide decomposition, whose most important end product is a hydroxyl radical. This pathway is one of the most important in hydroxyl radical production in the cell and is known as Fenton's reaction.<sup>4,7</sup> On the other hand, self-oxidation of these ions can generate superoxide radicals which facilitate electron transfer to biological macromolecules such as lipids, proteins and DNA.<sup>4,10</sup> This confirms the importance of these serum proteins which are in charge of transporting and chelating these metals.

### **Oxidative stress**

This alteration is produced when there is an imbalance in FR generation and the AO defense mechanism that can cause injury.<sup>1,10,14</sup> This does not define if the alteration is due to an increase in FR (prooxidants) or to a drop in a homeostatic response in tissues (AO defense).

peróxido de hidrógeno mediante la competencia con los iones  $\text{Fe}^{+2}$  y  $\text{Cu}^+$  que participan en la reacción de Fenton; o bien, disminuyendo la susceptibilidad de los grupos sulfhidrilos de las proteínas a la oxidación. Se ha informado, además, que la actividad AO del Zn influye en la estabilización no enzimática de membranas.<sup>4,37</sup>

La función que el Se desempeña en el organismo es bajo la forma de selenoenzymas. En sus inicios, el Se fue estudiado como un elemento tóxico, y sólo hace unos treinta años se estableció su importancia en la salud y producción de ganado, cuando se demostró que prevenía la distrofia muscular de origen nutricional, enfermedad asociada con una deficiencia de la metaloenzima GSH-Px.<sup>38</sup> La deficiencia de Se se traduce en la disminución de la actividad de GSH-Px y otras selenoenzymas, dejando a la célula expuesta al ataque oxidativo de las ERO.<sup>39</sup> En la actualidad se han caracterizado 11 selenoproteínas.<sup>29,40</sup>

Estudios recientes realizados en ratas señalan que el Mn manifiesta propiedades protectoras contra la LPO en algunos tejidos;<sup>41</sup> aunque los mecanismos involucrados no son del todo dilucidados, se presume que el Mn puede incrementar la actividad de SOD, actuar como un capturador de radicales hidroxilo y superóxido, actuar como promotor de la síntesis de metalotio-neínas e interferir por competencia con los iones Fe.

Si bien los metales de transición  $\text{Fe}^{+2/+3}$  y  $\text{Cu}^{+/+2}$  desarrollan importantes funciones AO como constituyentes de enzimas y proteínas,<sup>35</sup> también pueden actuar como poderosos generadores de RL cuando estos iones se encuentran libres en altas concentraciones. La forma reducida de estos iones ( $\text{Fe}^{+2}$  y  $\text{Cu}^+$ ) es mucho más reactiva que su forma oxidada ( $\text{Fe}^{+3}$  y  $\text{Cu}^{+2}$ ). Los iones  $\text{Fe}^{+2}$  y  $\text{Cu}^+$  promueven la descomposición del peróxido de hidrógeno cuyo producto final más importante es el radical hidroxilo. Esta es una de las principales vías de producción del radical hidroxilo en el medio celular y se conoce como reacción de Fenton.<sup>4,7</sup> Por otra parte, la autooxidación de estos iones puede llevar a la formación de radicales superóxido que facilitan la transferencia de electrones a macromoléculas biológicas tales como lípidos, proteínas y ADN.<sup>4,10</sup> Se confirma, así, la importancia de las proteínas séricas encargadas de transportar y quelar estos metales.

### **Estrés oxidativo**

El estrés oxidativo constituye una alteración producida por un desequilibrio entre la generación de RL y la defensa AO, que puede conducir a un estado de daño.<sup>1,10,14</sup> Esta acepción no precisa si la alteración es por incremento de los RL (prooxidantes) o por una disminución en la respuesta homeostática de los tejidos (defensa AO).

Miller *et al.*<sup>12</sup> se refieren también al estrés oxidativo como la resultante de una deficiencia de sustancias protectoras naturales o de una excesiva exposición a agentes generadores de RL; en otras palabras, el estrés oxidativo se desencadena cuando los prooxidantes exceden a la capacidad AO de un organismo (Figura 2). Un

Miller *et al.*<sup>12</sup> define oxidative stress as the result of a deficiency in natural protective substances or an increased exposure to FR generating agents; in other words, oxidative stress is triggered when prooxidants surpass the organism's AO abilities (Figure 2). An example is a chronic inflammatory response, where an overproduction of ROS by macrophages exceeds the AO defense and worsens the lesion in the involved tissues.<sup>10</sup> In another context, the low oxygen tension produced during ischemic conditions induces xantine oxidase formation. While tissues regain perfusion, this enzyme catalyzes the reaction between oxygen and hypoxantine creating ROS from which the superoxide radical can trigger new FR generation. Tissue alteration caused by FR generated in this way is known as reperfusion injury.<sup>42-44</sup>

Given that oxidative injury can be related to a deficiency protective of substances, a close relationship between oxidative stress and nutritional condition can be established.<sup>4</sup> Several studies have proved that an inadequate intake of these nutrients lowers the activity of some AO enzymes, which facilitates oxidative stress.<sup>29,33,45,46</sup> Other factors like disease, stress or immune response induction cause an increase in vitamin and trace mineral requirements, most of which are involved in AO defense.<sup>12</sup> However, it should be mentioned that there have been oxidative stress situations in which the intake of oligoelements has not improved the AO condition, this has to do with the influence of other factors upon the expression of the AO. For example, nitric oxide is an endogenous inhibitor of GSH-Px and catalase. Through this mechanism, the induction of an enzyme, nitric oxide synthetase, influences the AO capacity.<sup>20</sup> Even some LPO products can inhibit the activity of some enzymes, for example, GSH-Px.<sup>18</sup>

An inadequate diet can lack the necessary nutrients for an optimum AO defense, as well as containing agents that promote FR generation such as toxins or excesses of polyunsaturated fats.

### **Pathological changes associated with oxidative stress**

Oxidative stress has been related to the etiopathogenesis of numerous processes,<sup>10,11,47,48</sup> such as aging<sup>49</sup> and an increase in cellular apoptosis.<sup>16</sup>

Thus, many disorders in livestock and pets have decreased when AO are supplemented. In dogs, both idiopathic dilated cardiomyopathy and osteoarthritis evolve favorably when treated with AO,<sup>50,51</sup>

ejemplo lo constituye la respuesta inflamatoria crónica, en donde la sobreproducción de ERO por macrófagos activados sobrepasa la defensa AO y agrava las lesiones de los tejidos involucrados.<sup>10</sup> En otro ámbito, la baja tensión de oxígeno que se produce en el lapso de una isquemia induce la formación de xantina oxidasa. Durante el periodo de reperfusión tisular, esta enzima cataliza la reacción entre el oxígeno y la hipoxantina generando ERO, de los cuales el radical superóxido puede desencadenar la formación de nuevos RL. La alteración tisular provocada por los RL, originados en esta situación, se conoce como daño por reperfusión.<sup>42-44</sup>

Como consecuencia de que la presentación del daño oxidativo puede atribuirse a una deficiencia de sustancias protectoras, queda establecida una estrecha relación entre el estrés oxidativo y el estatus nutricional.<sup>4</sup> Diversos estudios han puesto de manifiesto que una ingesta inadecuada de estos nutrimentos deprime la acción de algunas enzimas AO, lo que favorece la presentación del estrés oxidativo.<sup>29,33,45,46</sup> Otros factores como la enfermedad, el estrés o la inducción de la respuesta inmune llevan a un incremento en los requerimientos de vitaminas y minerales traza, la mayoría de ellos involucrados en la defensa AO.<sup>12</sup> Es interesante precisar que, como contraparte, se han observado situaciones de estrés oxidativo en las cuales la ingesta de oligoelementos no mejora el estatus AO, hecho que se atribuye a la influencia que ejercen otros factores sobre la expresión de la capacidad AO. Por ejemplo, el óxido nítrico es un inhibidor endógeno de la GSH-Px y de la catalasa. Por medio de este mecanismo, la inducción de la enzima óxido nítrico sintetasa puede tener incidencia sobre la capacidad AO.<sup>20</sup> Incluso algunos productos derivados de la LPO tienen la propiedad de inhibir la actividad de enzimas como, por ejemplo, GSH-Px.<sup>18</sup>

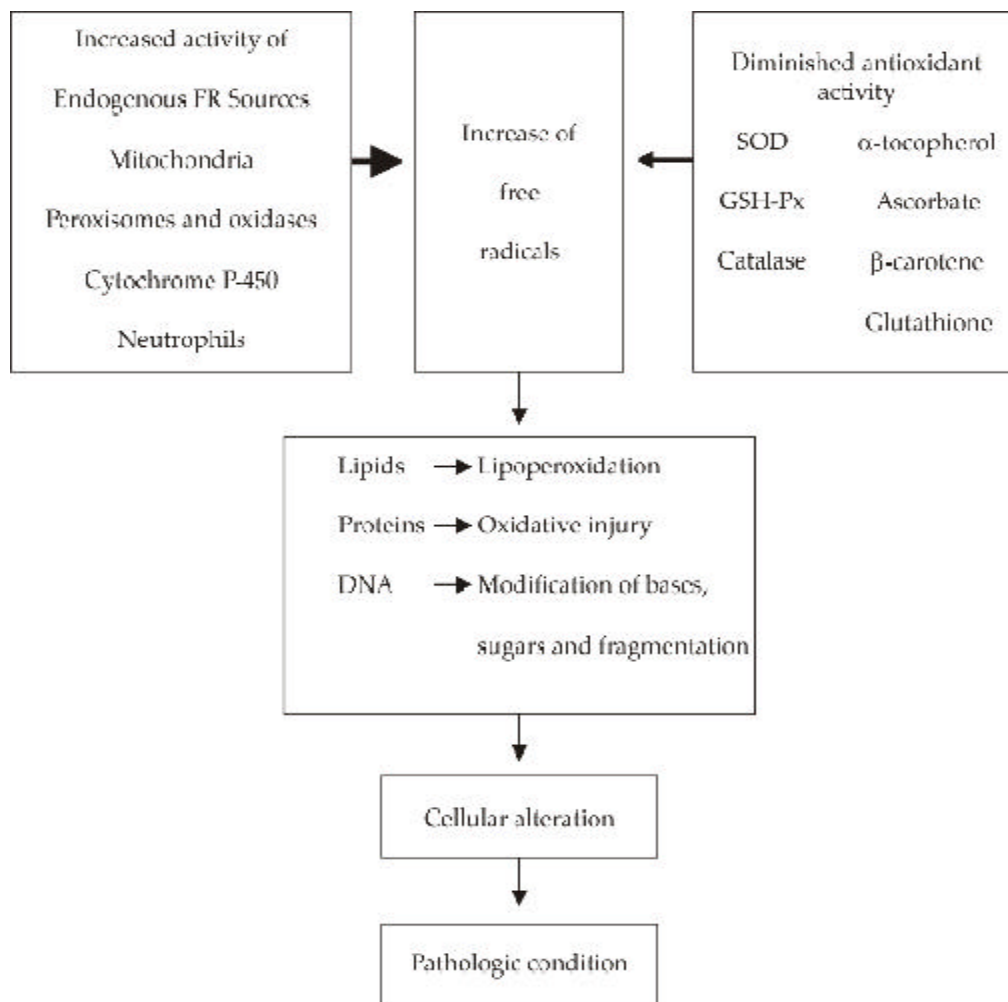
Así como una dieta inadecuada puede no incorporar los nutrimentos necesarios para el óptimo desempeño de la defensa antioxidante, eventualmente puede contener agentes que promuevan la generación de RL, tales como toxinas o excesos de grasas poliinsaturadas.

### **Cambios patológicos asociados al estrés oxidativo**

El estrés oxidativo ha sido implicado en la etiopatogenia de numerosos trastornos,<sup>10,11,47,48</sup> en procesos como el envejecimiento<sup>49</sup> y en el incremento de la apoptosis celular.<sup>16</sup>

Es así como en animales de producción y compañía se han identificado diversas alteraciones cuya incidencia se reduce al suplementar con AO. En caninos se ha observado la favorable evolución que presenta la miocardiopatía dilatada idiopática y la osteoartritis al tratamiento con AO,<sup>50,51</sup> lo que corrobora su relación al estrés oxidativo.

La presentación de la encefalomalacia nutricional en pollos Broiler corresponde a una disfunción peroxidativa por deficiencia de vitamina E.<sup>52,53</sup> En tanto que una de las etiologías del síndrome ascítico, observado en aves de rápido crecimiento, es el daño celular provocado por las



**Figura 2.** Patogenia de una condición patológica, producto del estrés oxidativo (adaptado de Bandyopadhyay *et al.*, 1999). Pathogenesis of a pathologic condition, caused by oxidative stress (adapted from Bandyopadhyay *et al.*, 1999).

which confirms their relationship with oxidative stress.

Nutritional encephalomalacia in Broiler chickens can be related to a peroxidative disorder caused by vitamin E deficiency.<sup>52,53</sup> One etiology of ascitic syndrome in fast growing chickens is the cellular injury caused by ROS.<sup>54,55</sup> This damage is caused by an alteration in the electron transport chain in mitochondria that prevents an adequate oxygen utilization.<sup>56,57</sup>

Dietary hepatitis in pigs is also described as a pathologic condition mediated by FR,<sup>58</sup> in the same way as steatosis and nutritional myodystrophy in horses.<sup>59</sup> Recently, it has been suggested that the motor neuron disease in this species, related to vitamin E deficiency and Cu increase in nervous tissue, is a result of oxidative injury.<sup>60</sup>

In dairy cows there are several conditions related to oxidative stress that occur during preparturition or early nursing periods. These stages cause important physiological changes in the females that increase their nutritional requirements and these are

ERO.<sup>54,55</sup> Este daño se originaría por una alteración en la cadena transportadora de electrones a nivel mitocondrial que impide una adecuada utilización del oxígeno.<sup>56,57</sup>

La hepatitis dietética en cerdos también es descrita como un cuadro patológico mediado por RL,<sup>58</sup> como ocurre con la esteatosis y la miodistrofia nutricional en equinos.<sup>59</sup> Recientemente, la enfermedad de neurona motora en esta especie, afección asociada a una deficiencia de vitamina E y un incremento de Cu en el tejido nervioso, ha sido sugerida como la resultante de un daño oxidativo.<sup>60</sup>

En bovinos lecheros se ha observado que la mayoría de las afecciones asociadas con el estrés oxidativo están en estrecha relación con el periodo de parto y lactancia temprana, etapas caracterizadas por importantes cambios en la fisiología de la hembra, y que conlleva a una gran demanda en requerimientos nutricionales frecuentemente no satisfechos.<sup>61</sup> Las alteraciones frecuentemente descritas son: Retención de placenta, edema de la ubre, mastitis, fiebre de leche, reducción de la inmunocompetencia<sup>12</sup> y rendimiento reproductivo

not always satisfied.<sup>61</sup> The following alterations can be mentioned: Placenta retention, udder edema, mastitis, milk fever, immunocompetence reduction<sup>12</sup> and diminished reproductive performance.<sup>62</sup> White muscle disease, neonatal weakness, decreased immune function (both humoral and cellular), infertility, abortion, ovarian cysts, metritis, testicular degeneration and slow development are also closely related to a prooxidant: antioxidant imbalance, such as a Se deficiency.<sup>33,34,46,63</sup>

Vascular fragility, hemoglobin degenerative changes and erythrocyte membrane fragility, all of which, depending on their intensity can lead to anaemia, are also expressions of an oxidative stress situation.<sup>31,64-66</sup>

### **Evaluation of oxidative stress**

FR are paramagnetic molecules, a characteristic that has allowed their *in situ* detection through electronic paramagnetic resonance spectroscopy combined with spin traps.<sup>67</sup> This technique is designed to study ions and molecules that contain unpaired electrons. It is based on the measurement of energy variations when an odd electron aligns in response to an external magnetic field.<sup>9</sup> Difficulties presented by the FR short life span are sorted out by using spin trap agents that stabilize them and thus allow their measurement. Alternatively, chemiluminescent spectroscopy, which measures the electromagnetic radiation of excited molecules, can also be used to study FR. Both are classified as direct techniques, for they follow FR activity in those reactions where they participate.<sup>14</sup>

However, oxidative stress can be studied indirectly, by the determination of circulating AO agents (proteins, vitamins, minerals and enzymes),<sup>48</sup> or by measuring the ability or AO condition as a whole.<sup>48,68</sup> Thus, it has been suggested that the ratio of reduced glutathione to oxidized glutathione gives information on the tissue's antioxidant condition.<sup>69</sup> The activity of liposoluble antioxidants can be estimated by quantifying the resistance of low density lipoproteins to oxidation.<sup>70,71</sup> Some other methods involve evaluating the degree of hemoglobin denaturalization, *in vivo* or *in vitro*,<sup>72-74</sup> or measuring osmotic resistance of cell membranes. This technique, known also as erythrocyte osmotic fragility, consists in submitting erythrocyte aliquots to different NaCl concentrations between 0% and 0.85% and the quantifying and expressing the degree of hemolysis in each, as a percentage of the saline solution with a 0% concentration.<sup>75</sup>

There are other methods that identify and quantify substances that result from cellular injury caused by

disminuido.<sup>62</sup> En tanto que la enfermedad del músculo blanco, la debilidad neonatal, la reducción de la función inmune tanto humoral como celular, infertilidad, abortos, quistes ováricos, metritis, degeneración testicular y desarrollo retardado, también poseen un componente estrechamente ligado con el desbalance prooxidante: antioxidante, como lo es la deficiencia de Se.<sup>33,34,46,63</sup>

La fragilidad vascular, los cambios degenerativos de la hemoglobina y la fragilidad de las membranas de los eritrocitos, que según su intensidad pueden conducir a cuadros de anemia, también corresponden a manifestaciones del desarrollo de un estrés oxidativo.<sup>31,64-66</sup>

### **Evaluación del estrés oxidativo**

La propiedad de los RL como moléculas paramagnéticas, ha permitido su detección *in situ* mediante la espectroscopia de resonancia paramagnética electrónica combinada con atrapadores de spin.<sup>67</sup> Esta técnica, diseñada para el estudio de iones y moléculas que contienen electrones desapareados, se basa en la medición de variaciones de energía cuando un electrón desapareado se alinea en respuesta a un campo magnético externo.<sup>9</sup> Las dificultades derivadas de la corta vida que tienen los RL se sortea utilizando agentes atrapadores de spin que los estabilizan en forma relativa y posibilitan su medición. En forma alterna, la espectroscopia quimiluminiscente, basada en la medición de la radiación electromagnética emitida por moléculas en estado de excitación, también puede emplearse con el propósito de investigar RL. Ambas son catalogadas como técnicas directas, ya que permiten dar seguimiento a la actividad de los RL en las reacciones que intervienen.<sup>14</sup>

No obstante, el estrés oxidativo puede ser estudiado indirectamente mediante la determinación de la concentración o actividad de los agentes AO circulantes (proteínas, vitaminas, minerales y enzimas),<sup>48</sup> o la medición de la capacidad o estado antioxidante en su conjunto.<sup>48,68</sup> En este sentido, se ha sugerido que la relación glutatión reducido / glutatión oxidado entrega una adecuada información del estado antioxidante de un tejido.<sup>69</sup> En tanto que la actividad de los antioxidantes liposolubles puede estimarse cuantificando la resistencia a la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad.<sup>70,71</sup> Otras metodologías son la evaluación del grado de desnaturalización de la hemoglobina *in vivo* o *in vitro*,<sup>72-74</sup> o la medición de la resistencia osmótica de las membranas celulares. Esta técnica, también conocida como fragilidad osmótica eritrocitaria, consiste en someter alícuotas de eritrocitos a diferentes concentraciones de NaCl, entre 0% y 0.85%, cuantificando y expresando el grado de hemólisis en cada una de ellas como un porcentaje respecto de la solución salina cuya concentración es 0%.<sup>75</sup>

También es posible recurrir al empleo de metodologías capaces de identificar y cuantificar sustancias provenientes del daño celular a causa de la acción de ERO sobre las biomoléculas.<sup>6,14</sup> En este sentido, se han pro-

ROS acting on biomolecules.<sup>6,14</sup> Several oxidative injury markers have been proposed and used, even though they are not always specific.<sup>10,14</sup>

The preferred biomarker used to evaluate protein alterations, is carbonyl formation.<sup>1</sup> Carbonyl groups are introduced into the amino acid chain during an oxidative process, mainly in lysine, arginine, proline and histidine residues. These carbonyl derivatives can be detected through colorimetric and spectrophotometric methods and also with high-pressure liquid chromatography (HPLC) or enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). When protein oxidation is mediated by RNS, tyrosine residues are nitrated thus generating 3-nitrotyrosine. Its semiquantitative fluid determination is achieved through a competitive ELISA test.<sup>67</sup>

The action of ROS on DNA results mainly in generating a nucleoside, 8-hydroxyguanosine (8-OHdG) which constitutes the main product of oxidative injury. DNA is repaired constantly and the oxidized nucleosides are excreted through urine. Among several methods that have been proposed, the design of specific monoclonal antibodies, coupled to an ELISA technique, has allowed the detection and quantification of urinary 8-OHdG.<sup>67</sup>

In the evaluation of lipid integrity, peroxides are the most important intermediate products, therefore, the measurement of the membrane lipids' peroxidation is a basic indicator. LPO intensity can be determined through hydroperoxide concentration in plasma;<sup>76,77</sup> oxidation of low density lipoproteins;<sup>78</sup> quantification of LPO primary products such as conjugated dienes, or quantification of secondary products such as MDA, 4-HNE, hexanal or hydrocarbonated gases,<sup>8</sup> using complementary chemiluminescence,<sup>78</sup> chromatography and mass spectrometry to achieve accuracy.<sup>67</sup> Even though LPO is the last process in cell lesions and is not always the cause of injury, it has been studied due to the ease with which its products are measured.<sup>5,11</sup>

To evaluate LPO the most frequent, simple and low cost method is measuring MDA as a reactive substance to thiobarbituric acid (TBARS).<sup>8</sup> This technique is based on the reaction of the analyzed sample with thiobarbituric acid in an acidic environment, adding a chromogen which will then be measured by absorption or fluorescence. Measured MDA comes from decomposition of peroxidized lipids reacting in an acidic environment, their concentration is proportional to absorption. This test is simple and non-specific, for other aldehydes also generated from LPO, form compounds with the same absorption.

puesto y utilizado diferentes marcadores de daño oxidativo, a pesar de que no siempre son específicos.<sup>10,14</sup>

El biomarcador preferentemente usado para evaluar las alteraciones producidas en proteínas es la formación de carbonilos.<sup>1</sup> Los grupos carbonilos se introducen en la cadena aminoácida en el transcurso de un proceso oxidativo, principalmente en los residuos de lisina, arginina, prolina e histidina. Estos derivados carbonilos pueden detectarse mediante métodos colorimétricos, espectrofotométricos, y con el empleo de cromatografía líquida a alta presión (HPLC) o la técnica de ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA). Cuando la oxidación de proteínas es mediada por las ERN, ocurre la nitración de los residuos de tirosina que generan 3-nitrotirosina como producto. Su determinación semicuantitativa en fluidos se logra aplicando la técnica de ELISA de competencia.<sup>67</sup>

La formación del nucleósido 8-hidroxidesoxiguanosina (8-OHdG) por la acción de ERO sobre el ADN, constituye el principal producto de daño oxidativo. La continua reparación que sufre el ADN remueve los nucleósidos oxidados que se excretan por vía urinaria. Entre diferentes métodos propuestos, el diseño de anticuerpos monoclonales específicos, acoplados a una técnica de ELISA, ha permitido la detección y cuantificación del 8-OHdG urinario.<sup>67</sup>

Al evaluar la integridad de lípidos, se debe considerar que los peróxidos representan los productos intermedios más importantes, por lo que la medición de la peroxidación de lípidos de membranas es un indicador básico. La intensidad de la LPO puede determinarse a través de la concentración de hidroperóxidos en el plasma,<sup>76,77</sup> la oxidación de lipoproteínas de baja densidad,<sup>78</sup> la cuantificación de productos primarios de la LPO como dienos conjugados, o cuantificando los productos secundarios como el MDA, 4-HNE, hexanal o gases hidrocarbonados,<sup>8</sup> complementado a la quimioluminiscencia,<sup>78</sup> cromatografía y espectrometría de masa con el objeto de lograr mayor exactitud.<sup>67</sup> Aunque la LPO es el último proceso que acompaña a la lesión celular y no siempre es la causa del daño, la detección de sus productos ha centrado el mayor interés debido a la facilidad con que pueden medirse.<sup>5,11</sup>

El método más frecuente para evaluar LPO, por su simplicidad y bajo costo, es la medición de MDA como sustancia reactiva al ácido tiobarbitúrico (TBARS).<sup>8</sup> El fundamento de la técnica de TBARS es hacer reaccionar la muestra a analizar con ácido tiobarbitúrico en medio ácido, adicionándole un cromógeno, que posteriormente se mide mediante absorción o fluorescencia. El MDA medido proviene de la descomposición de lípidos peroxidados durante la reacción en medio ácido principalmente y su concentración es proporcional a la absorción. Esta es una prueba simple e inespecífica, ya que otros aldehídos generados en la LPO también forman compuestos de la misma absorción. Cuando la prueba se usa sobre fluidos o tejidos pueden producirse artificios, debido a la presencia de pigmentos y glicoproteínas, que



When the test is tried on fluid or tissues, artifices can generate if pigments and glycoproteins are present, thus overestimating MDA content. These problems are eliminated if TBARS is combined with HPLC to separate and detect only the MDA content in the sample.<sup>8</sup>

Another simple technique to evaluate lipid susceptibility to peroxidation, is inducing *in vitro* cellular MDA formation. This is achieved by incubating erythrocyte aliquots that were washed with different peroxide concentrations.<sup>79</sup> The MDA generated is determined by TBARS and is spectrometrically quantified. The absorption obtained in different hydrogen peroxide concentrations can be expressed as differences in optical density units, which diminishes the artifices.

Finally, a proper understanding of the different elements and mechanisms that trigger oxidative stress, as well as an assessment of its effects, will allow the evaluation of susceptibility of an animal or animal group to develop oxidative stress and consequently, to design therapeutic strategies to correct imbalances in the prooxidant: antioxidant ratio in order to prevent related pathologies.

## Referencias

1. Halliwell B. Antioxidants and human disease: a general introduction. *Nutr Rev* 1997;55:S44-S52.
2. Larkins NJ. Free radical biology and pathology. *J Equine Vet Sci* 1999;19:84-89.
3. Chow CK. Nutritional influence on cellular antioxidant defense systems. *Am J Clin Nutr* 1979;32:1066-1081.
4. Yu BP. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev* 1994;74:139-162.
5. Halliwell B. Oxidants and human disease: some new concepts. *FASEB J* 1987;1:358-364.
6. Cheeseman KH, Slater TF. An introduction to free radical biochemistry. In: Cheeseman KH, Slater TF, editors. *Free radicals in medicine*. London (UK): Churchill Livingstone, 1993:481-493.
7. Halliwell B, Gutteridge JMC. Oxygen toxicity, oxygen radical, transition metals and disease. *Biochem J* 1984;219:1-14.
8. Halliwell B, Chirico S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement and significance. *Am J Clin Nutr* 1993;57(Suppl):715s-725s.
9. Halliwell B, Gutteridge JMC, Cross CE. Free radicals, antioxidants, and human disease: Where are we now? *J Lab Clin Med* 1992;119:598-620.
10. Kehrer JP. Free radicals as mediators of tissue injury and disease. *Crit Rev Toxicol* 1993;23:21-48.
11. Morrissey PA, O'Brien NM. Dietary antioxidants in health and disease. *Int Dairy J* 1998;8:463-472.
12. Miller JK, Brzezinska-Slebodzinska E, Madsen FC. Oxidative stress, antioxidants, and animal function. *J Dairy Sci* 1993;76:2812-2823.
13. Machlin LJ, Bendich A. Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. *FASEB J* 1987;1:441-445.
14. Lunec J. Oxidative stress and antioxidants. Proceedings of the VIIth Congress of the International Society for Animal Clinical Biochemistry; 2-6 July 1996; Glasgow (UK). Glasgow (UK): University of Glasgow, 1996:45.
15. Kubow S. Lipid oxidation products in food and atherogenesis. *Nutr Rev* 1993;51:33-40.
16. Bandyopadhyay U, Das D, Banerjee RK. Reactive oxygen species: oxidative damage and pathogenesis (review). *Curr Sci* 1999;77:658-666.
17. Slater TF. Free-radical mechanism in tissue injury. *Biochem J* 1984;222:1-15.
18. Romero FJ, Bosch-Morell F, Romero MJ, Jareño EJ, Romero B, Marin N, Roma J. Lipid peroxidation products and antioxidants in human disease. *Environ Hlth Perspect* 1998;106(Suppl 5):1229-1234.
19. Esterbauer H, Cheeseman KH, Dianzani MU, Poli G, Slater TF. Separation and characterization of the aldehydic products of lipid peroxidation stimulated by ADP-Fe<sup>+2</sup> in rat liver microsomes. *Biochem J* 1982;208:129-140.
20. Chaudière J, Ferrari-Iliou R. Intracellular antioxidants: from chemical to biochemical mechanisms. *Food Chem Toxicol* 1999;37:949-962.
21. Maxwell SRJ. Prospects for the use of antioxidants therapies. *Drugs* 1995;49:345-361.
22. Powers SK, Lennon SL. Analysis of cellular responses to free radicals: focus on exercise and skeletal muscle. *Proc Nutr Soc* 1999;58:1025-1033.
23. Wang X, Quinn PJ. Vitamin E and its function in membranes. *Progress Lipid Res* 1999;38:309-336.
24. Murray RK, Granner DG, Mayes PA, Rodwell VW. *Bioquímica de Harper*. 13ª ed. México (DF): El Manual Moderno, 1994.
25. Olinescu RM, Kummerow FA. Fibrinogen is an efficient antioxidant. *J Nutr Biochem* 2001;12:162-169.

26. Harris ED. Regulation of antioxidant enzymes. *FASEB J* 1992;6:2675-2683.
27. Ho YS, Magnenat JL, Gargano M, Cao J. The nature of antioxidant defense mechanism: a lesson from transgenic studies. *Environm Hlth Persp* 1998;106:1219-1228.
28. Stadtman TC. Selenocysteine. *Ann Rev Biochem* 1996;65:83-100.
29. Holben DH, Smith AM. The diverse role of selenium within selenoproteins: a review. *J Am Diet Assoc* 1999;99:836-843.
30. Arthur JR. The glutathione peroxidases. *Cell Mol Life Sci* 2000;57:1825-1835.
31. Allan CB, Lacourciere GM, Stadtman TC. Responsiveness of selenoproteins to dietary selenium. *Ann Rev Nutr* 1999;19:1-16.
32. Ceballos A, Wittwer FG, Contreras PA, Quiroz E, Böhmwald HL. Actividad de glutatión peroxidasa en bovinos lecheros a pastoreo correlacionada con la concentración sanguínea y plasmática de selenio. *Pesq Agropec Bras* 1999;34:2331-2338.
33. López-Alonso M, Miranda M, Hernández J, Castillo C, Benedito JL. Glutatión peroxidasa en las patologías asociadas a deficiencias de selenio en rumiantes. *Arch Med Vet* 1997;29:171-179.
34. Grace N. Managing trace element deficiencies. Palmerston North, New Zealand: Simon Print, 1994.
35. Ruz M. Oligoelementos como antioxidantes. En: Wittwer F, Ceballos MA, editores. *Estrés oxidativo y antioxidantes en la salud y nutrición animal*. Valdivia, Chile: Universidad Austral de Chile, 1997:9-10.
36. Powell SR. The antioxidant properties of zinc. *J Nutr* 2000;130:1447S-1454S.
37. O'Dell BL. Role of zinc in plasma membrane function. *J Nutr* 2000;130:1432S-1436S.
38. Wittwer F. Antecedentes del balance nutricional del selenio en Chile y su suplementación en el ganado. En: Wittwer F, Ceballos MA, editores. *Estrés oxidativo y antioxidantes en la salud y nutrición animal*. Valdivia, Chile: Universidad Austral de Chile, 1997:27-35.
39. Ursini F, Bindoli A. The role of selenium peroxidases in the protection against oxidative damage of membranes. *Chem Phys Lipids* 1987;44:255-276.
40. Brigelius-Flohé R. Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. *Free Radic Biol Med* 1999;27:951-965.
41. Chen MT, Sheu JY, Lin TH. Protective effects of manganese against lipid peroxidation. *J Toxicol Environ Hlth* 2000;61:569-577.
42. Benoit JN, Taylor MS. Vascular reactivity following ischemia/reperfusion. *Front Biosci* 1997;2:28-33.
43. Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:1620-1624.
44. Bulger EM, Maier RV. Antioxidants in critical illness. *Arch Surg* 2001;136:1201-1207.
45. Walsh DM, Kennedy DG, Goodall EA, Kennedy S. Antioxidant enzyme activity in the muscles of calves depleted of vitamin E or selenium or both. *Br J Nutr* 1993;70:621-630.
46. Wichtel JJ. A review of selenium deficiency in grazing ruminants. Part 1: new roles for selenium in ruminant metabolism. *NZ Vet J* 1998;46:47-52.
47. Mates JM, Perez-Gomez C, Nuñez-De Castro I. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin Biochem* 1999;32:595-603.
48. RANDOX. Radicales libres. Crumlin, Northern Ireland (UK): Radox Laboratories Ltd., 1996.
49. Finkel T, Holbrook NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 2000;408:239-247.
50. Freeman LM, Brown DJ, Rush JE. Assessment of degree of oxidative stress and antioxidant concentrations in dogs with idiopathic dilated cardiomyopathy. *J Am Vet Med Assoc* 1999;215:644-646.
51. Impellizzeri JA, Lau RE, Azzara FA. Fourteen week clinical evaluation of an oral antioxidant as a treatment for osteoarthritis secondary to canine dysplasia. *Vet Q* 1998;20(Suppl 1):S107-S108.
52. Fuhrmann H, Sallmann HP. The influence of dietary fatty acids and vitamin E on plasma prostanoids and liver microsomal alkane production in broiler chickens with regard to nutritional encephalomalacia. *J Nutr Sci Vitaminol* 1995;41:553-561.
53. Sallmann HP, Fuhrmann H, Molnar S, Stegmanns T. Endogenous lipid peroxidation in broiler chickens under dietary loads. *Fat Sci Technol* 1991;93:457-462.
54. Enkvetchakul B, Bottje N, Anthony N, Moore R. Compromised antioxidant status associated with ascites in broilers. *Poultry Sci* 1993;72:2272-2280.
55. Currie RJW. Ascites in poultry: recent investigations. *Avian Pathol* 1999;28:313-326.
56. Cawthon D, McNew R, Beers K, Bottje WG. Evidence of mitochondrial dysfunction in broilers with pulmonary hypertension syndrome (ascites): effect of t-butylhydroperoxide on hepatic mitochondrial function, glutathione, and related thiols. *Poultry Sci* 1999;78:114-124.
57. Cawthon D, Beers K, Bottje WG. Electron transport chain defect and inefficient respiration may underlie pulmonary hypertension syndrome (ascites) - associated mitochondrial dysfunction in broilers. *Poultry Sci* 2001;80:474-484.
58. Gaál T, Speake BK, Mezes M, Noble RC, Surai PF, Vajdovich P. Antioxidant parameters and ageing in some animal species. *Comp Haematol Int* 1996;6:208-213.
59. Araya O. Steatosis and nutritional dystrophy in horses: a retrospective study in Chile. In: Wittwer F, Ceballos MA, editors. *Estrés oxidativo y antioxidantes en la salud y nutrición animal*. Valdivia, Chile: Universidad Austral de Chile, 1997:36-37.
60. Polack EW, King JM, Cummings JF, Mohammed HO, Birch M, Cronin T. Concentrations of trace minerals in the spinal cord of horses with equine motor neuron disease. *Am J Vet Res* 2000;61:609-611.
61. Goff JP, Horst RL. Physiological changes at parturition and their relationship to metabolic disorders. *J Dairy Sci* 1997;80:1260-1268.
62. Smith OB, Akinbamijo OO. Micronutrients and reproduction in farm animals. *Anim Reprod Sci* 2000;60-61:549-560.
63. Van Saun RJ. Rational approach to selenium supplementation essential. *Feedstuffs* 1990;15:15-17.
64. Edwards CJ, Fuller J. Oxidative stress in erythrocytes. *Comp Haematol Int* 1996;6:24-31.
65. Morris JG, Cripe WS, Chapman HL Jr., Walker DF, Armstrong JB, Alexander JD Jr., *et al*. Selenium deficiency in cattle associated with Heinz bodies anemia. *Science* 1984;223:491-493.
66. Weiss DJ, Aird B, Murtaugh MP. Neutrophil-induced immunoglobulin binding to erythrocytes involves proteolytic and oxidative injury. *J Leukoc Biol* 1992;51:19-23.

67. Rimbach G, Höhler D, Fischer A, Roy S, Virgili F, Pallauf J, Packer L. Methods to assess free radicals and oxidative stress in biological systems. *Arch Anim Nutr* 1999;52:203-222.
68. Koracevic D, Koracevic G, Djordjevic V, Andrejevic S, Cosic V. Method for the measurement of antioxidant activity in human fluids. *J Clin Pathol* 2001;54:356-361.
69. Asensi M, Sastre J, Pallardo FV, Loret A, Lehner M, Garcia de la Asuncion J, Vina J. Ratio of reduced to oxidized glutathione as indicator of oxidative stress status and DNA damage. *Methods Enzymol* 1999;299:267-276.
70. Esterbauer H, Gebicki J, Puhl H, Jurgens G. The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Radic Biol Med* 1992;13:341-390.
71. Hofer G, Lichtenberg D, Hermetter A. A new fluorescence method for continuous determination of surface lipid peroxidation in lipoproteins and plasma. *Free Radic Res* 1995;23:317-327.
72. Trotta RJ, Sullivan SG, Stern A. Lipid peroxidation and haemoglobin degradation in red blood cells exposed to t-butyl hydroperoxide. *Biochem J* 1983;212:759-772.
73. Gutzwiller A. Erythrocyte resistance to oxidative damage and leucocyte capacity to reduce nitroblue tetrazolium in selenium deficient cattle. *J Vet Med A* 1998;45:271-278.
74. Christopher MM. The red blood cell and oxidative damage: primary target, innocent bystander or effective scavenger? Proceedings of the VIIth Congress of the International Society for Animal Clinical Biochemistry; 2-6 July 1996; Glasgow (UK). Glasgow (UK): University of Glasgow, 1996:47.
75. Schalm OW, Jain NC, Carroll EJ. *Veterinary hematology*. 3rd ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1975.
76. Nourooz-Zadeh J. Ferrous ion oxidation in presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxides in plasma. *Methods Enzymol* 1999;300:58-62.
77. Pastorino AM, Zamburlini A, Zennaro L, Maiorino M, Ursini F. Measurements of lipid hydroperoxides in human plasma and lipoproteins by kinetic analysis of photon emission. *Methods Enzymol* 1999;300:33-42.
78. Albertini R, Abuja PM. Monitoring of low density lipoprotein oxidation by low-level chemiluminescence. *Free Radic Res* 1998;29:75-83.
79. Duthie GG, Arthur JR, Bremmer P, Kikuchi Y, Nicol F. Increased peroxidation of erythrocytes of stress-susceptible pigs: an improved diagnostic test for porcine stress syndrome. *Am J Vet Res* 1989;50:84-87.