



Biomarcadores del estrés oxidativo en la terapia antioxidante

[Biomarkers of oxidative stress in antioxidant therapy]

Wilfredo Mañon Rossi¹, Gabino Garrido², Alberto J. Núñez Sellés^{1*}

¹Universidad Nacional Evangélica, Paseo de los Periodistas 54, Miraflores, Santo Domingo D.N., República Dominicana.

²Departamento de Ciencias Farmacéuticas, Facultad de Ciencias, Universidad Católica del Norte, Angamos 0610, Antofagasta, Chile.

* E-mail: nunez500412@hotmail.com

Abstract

Biomarkers are used regularly in medical practice to provide objective markers of health status of a person, as well as the physiological response of the body to a pharmacological therapeutic intervention. In the specific case of the use of antioxidant products (antioxidant therapy), it is necessary to measure both biomarkers of oxidative stress level of the person as those that are specific to a physiological or pathological progression of a disease disorder. This paper describes the main biomarkers of oxidative general and specific stress as well as laboratory techniques, which should be taken into account when measuring the effectiveness of antioxidant therapies.

Keywords: Biomarker; human disease; nitrosative stress; oxidative damage; oxidative stress.

Resumen

Los biomarcadores se utilizan de forma regular en la práctica médica para ofrecer marcadores objetivos del estado de salud de una persona, así como de la respuesta fisiológica del organismo a una intervención terapéutica farmacológica. En el caso específico del uso de productos antioxidantes (terapia antioxidante) resulta necesario medir tanto biomarcadores del grado de estrés oxidativo de la persona como de aquellos que son específicos a un desorden fisiológico, patológico o la progresión de una enfermedad. El presente trabajo describe los principales biomarcadores del estrés oxidativo, generales y específicos, así como las técnicas de laboratorio, que deben ser tomados en cuenta a la hora de medir la eficacia de las terapias antioxidantes.

Palabras Clave: Biomarcador; daño oxidativo; enfermedad humana; estrés nitrosativo; estrés oxidativo.

ARTICLE INFO

Received | Recibido: July 16, 2015.

Received in revised form | Recibido en forma corregida: March 27, 2016.

Accepted | Aceptado: March 28, 2016.

Available Online | Publicado en Línea: March 29, 2016.

Declaration of Interests | Declaración de Intereses: The author declares that no conflict of interest exists.

Funding | Financiación: Projects FONDOCYT 2012-2013-2A1-58 (República Dominicana) and FONDECYT 1130601 (Chile).

Academic Editor | Editor Académico: Edgar Pastene.

INTRODUCCIÓN

Una de las deficiencias que con mayor frecuencia se le han señalado a los estudios clínicos con productos antioxidantes es la inadecuada selección de los marcadores del estrés oxidativo en fluidos biológicos (plasma, sangre, orina, líquido cefaloraquídeo y otros). La mayoría de los estudios publicados han considerado la medición de la concentración del propio producto antioxidante en el fluido biológico, lo cual no ofrece información alguna sobre la intensidad del estrés oxidativo. A partir de finales de la década del 80 se empieza a introducir en la medición del estrés oxidativo un grupo de biomarcadores que, de manera directa o indirecta, brindan información sobre la concentración de diferentes tipos de Especies Reactivas de Oxígeno y Nitrógeno (ERON) en el organismo humano. Incluso se ha llegado a sugerir la existencia de biomarcadores específicos para determinadas enfermedades (Niki, 2014).

El uso de biomarcadores de estrés oxidativo surge debido al descubrimiento del incremento del estrés oxidativo en condiciones patológicas. Estos tienen como objetivo desarrollar nuevas estrategias preventivas, diagnósticas y terapéuticas para impedir o demorar la aparición de complicaciones tales como la aterosclerosis y las enfermedades cardiovasculares, entre otras. Los biomarcadores (Biomarkers Definitions Working Group, 2001) ofrecen información sobre tres niveles progresivos de la enfermedad:

- a) Como parámetros medibles del daño a biomoléculas, tales como lípidos y proteínas;
- b) Como marcadores funcionales de funciones fisiológicas, por ejemplo, la función cognitiva;
- c) Como parámetros relacionados a una patología específica.

Otros de los objetivos que se persiguen en el desarrollo de un biomarcador son ayudar en el diagnóstico pre-sintomático y sintomático de las enfermedades y ofrecer parámetros que permitan demostrar la eficacia clínica del uso de antioxidantes. La utilidad del biomarcador ideal del estrés oxidativo radica en su capacidad de ofrecer indicaciones tempranas de la enfermedad y su progresión. Un biomarcador del estrés oxidativo

aceptable debe ser una entidad química que tenga algunas, o preferiblemente todas, de las características siguientes (Polidori et al., 2001; Lowe, 2014; Shah et al., 2014):

- a) Resultado de un daño oxidativo severo que pueda relacionarse, de manera inobjetable, con la aparición y progresión de la enfermedad.
- b) Accesible en un tejido diana o sustituto válido, que refleje la modificación oxidativa en ese tejido, de forma cuantitativa.
- c) Específico para las ERON bajo estudio y libre de confundirse con factores derivados de la ingestión de alimentos o suplementos nutricionales.
- d) Tener una concentración adecuada para que sea detectable con las técnicas disponibles de análisis químico de manera específica, sensible, reproducible y robusta.
- e) Dispersión baja de los valores de concentración; preferiblemente que la variación intra-muestras en el tiempo sea menor que la variación inter-sujetos.
- f) Estable, no susceptible a la inducción de artefactos o pérdidas durante el manejo, procesamiento, análisis y almacenamiento de las muestras.

METODOLOGÍA

Para el análisis de la información se emplearon las bases de datos electrónicas *PubMed*, *Scopus* y *Web of Science* como fuentes principales para obtener los artículos relacionados con los biomarcadores y el estrés oxidativo hasta julio de 2015. Las palabras clave utilizadas en la búsqueda fueron: *Biomarker*, *Human Disease*, *Nitrosative Stress*; *Oxidative Damage*, *Oxidative Stress*, en sus diferentes combinaciones.

Para estructurar y analizar la información se utilizó el gestor bibliográfico Sistema *EndNote X4*, creándose una base de datos bibliográfica. El análisis y síntesis permitió estudiar la información contenida en los diferentes documentos y resumir sus contenidos a fin de estructurar el presente estudio.

Biomarcadores del estrés oxidativo

Debido a la complejidad de las enfermedades asociadas al estrés oxidativo, es muy improbable que un solo biomarcador del estrés oxidativo sustituya los resultados de un diagnóstico clínico. Por esta razón, el desarrollo de un grupo de biomarcadores es esencial para un diagnóstico o control de progresión más acertado de la enfermedad. Aunque existen técnicas directas para la medición de ERON y otros radicales libres, tales como la Resonancia Paramagnética Electrónica (RPE) (Miura y Ozawa, 2000) y el Método de Atrapamiento de Spin (STM) (Pryor y Godber, 1991), lo más común en la medición de biomarcadores del estrés oxidativo son las técnicas indirectas, mediante las cuales las EROs son capturadas por un reactivo adecuado para formar una entidad química estable que posteriormente se analiza por técnicas gasométricas, espectrofotométricas, inmuno-enzimáticas (ELISA) y cromatográficas (Osłowski, 2015). Algunos ejemplos comunes son la hidroxilación del ácido salicílico (Halliwell y Kaur, 1997), el ensayo de la deoxiribosa (Biaglow et al., 1997), el ensayo de reducción del citocromo c para la detección de radicales superóxidos (Kutham et al., 1982) y la detección de radicales del óxido nítrico por compuestos finales coloreados (Amano y Noda, 1995). En la Tabla 1 se muestran algunos ejemplos de biomarcadores de estrés oxidativo y sus métodos de detección.

Las técnicas para la cuantificación de biomarcadores del estrés oxidativo son llamadas con frecuencia métodos de *fingerprinting* (huella dactilar) en los que se miden los productos finales específicos resultantes de la interacción de ERO con macromoléculas biológicas como ADN, proteínas, lípidos y antioxidantes de bajo peso molecular (LMWA, *Low Molecular-Weight Antioxidants*). La aparición de estos productos finales sirve como prueba de la existencia previa de ERO en las células. Entre los varios sitios de interacción, el ADN, las proteínas y los lípidos son los de mayor importancia. El análisis por HPLC o GC-MS de 8-oxo-2-deoxiguanosina (8-OHdG), después de la hidrólisis enzimática del ADN y la valoración del daño oxidativo por una

electroforesis de célula simple o un ensayo cometa (Fairbarian et al., 1995), son dos de las muchas técnicas utilizadas para detectar modificaciones de bases y aductos al ADN.

Otros métodos sirven para determinar rompimientos de simple y doble cadena (Sutherland et al., 2001). Mediante estas técnicas se pueden determinar diferentes aductos oxidados de ADN. Por ejemplo, los aductos aldehídos-ADN, tales como aductos de deoxiguanosina-malondialdehído (Zhang et al., 2002) o los productos finales resultantes de la reacción entre el ADN y el 4-hidroxinonenal, el aldehído que se forma después de la exposición a ERO para generar N₂-etenodeoxiguanosina (Sodum y Chung, 1989).

La peroxidación lipídica, importante en aterosclerosis, inflamación y funciones mitocondriales, es un proceso complejo que consiste en tres estados: iniciación, propagación y terminación. Para cada estado hay métodos disponibles que permiten cuantificar el avance del proceso y, de esta manera, evidenciar su existencia. Por ejemplo, debido a que la peroxidación lipídica causa pérdida de sustancias, como cadenas de ácidos grasos insaturados, la medición del contenido de lípidos puede indicar peroxidación de estos compuestos. Además, debido a que el oxígeno es consumido durante el estado de propagación, las mediciones de su captación por electrodos de oxígeno puede servir como una herramienta para evaluar el progreso de la oxidación (Lowe, 2014). Otro enfoque consiste en la medición de la formación de peróxido durante el proceso. Entre los muchos métodos desarrollados para ese propósito, algunos determinan la concentración de peróxido total, mientras que otros determinan la concentración de peróxido, lo que puede indicar que el ácido graso sufre el proceso de peroxidación. Mediante la sustracción de un hidrógeno por una ERO ocurre una reestructuración del ácido graso, dando lugar a un radical libre que se caracteriza por la formación de un dieno conjugado (Halliwell y Gutteridge, 1999), el cual se puede monitorear fácilmente por métodos espectroscópicos.

Tabla 1. Biomarcadores de estrés oxidativo y sus métodos de detección

Tipo de medición	Marcadores	Pruebas y métodos de detección
Medición directa	ERO	<i>Electron spin resonance</i> (ESR) – Espectroscopía
	ERN	<i>Ion electrode method</i>
ERON	Lípido	a) Malonildialdehido (MDA)
		b) Sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS)
		c) 4-Hidroxinonenal (HNE)
		d) F2 isoprostanos (8-iso-PGF ₂)
		e) Hidroperoxidación lipídica - Hexanoil-Lys aducto (HEL)
		f) Lipoproteína de baja densidad oxidada
	Proteína	a) Carbonilo
		b) 3-Nitrotirosina
		c) Tiolproteína
		ADN
Actividad de enzimas antioxidantes	a) 8-Hidroxi-2'-deoxiguanosina (8-OHdG)	
	b) Ruptura del ADN	
Antioxidante	Superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa, catalasa, glutatión reductasa, xantina oxidasa	
	Glutatión	
	Ácido ascórbico, α tocoferol, β caroteno, licopeno	
Capacidad antioxidante	Zn, Se, Mn, Cu, Fe	
	a) <i>Total Antioxidant Status</i> (TAS)	
	b) <i>Trolox Equivalent Antioxidant Capacity</i> (TEAC)	
	c) <i>Ferric Reducing Antioxidant Power</i> (FRAP)	
	d) <i>Asymmetric Dimethylarginine</i> (ADMA)	

Modificado de Shah et al. (2014). ERO: Especies reactivas del oxígeno; ERN: Especies reactivas del nitrógeno.

En el último estado del proceso de peroxidación, los peróxidos son descompuestos a aldehídos como el malonildialdehído (MDA), el que puede detectarse por reacción colorimétrica con el ácido tiobarbitúrico. También pueden evaluarse los productos finales de otros aldehídos como el hexanal. Todas ellas son llamadas especies reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS, *Thiobarbituric Acid Reactive Substances*) (Esterbauer, 1996). Este método es uno de los más ampliamente usados para detectar la peroxidación en todo el organismo. La evidencia del proceso de peroxidación en animales y humanos puede ser obtenida a través de la medición de gases de hidrocarburos, como el pentano y el etano que se forman como productos finales de la peroxidación. Estos gases pueden detectarse en la respiración de las especies ensayadas con el uso de la cromatografía gaseosa. También sirven como marcadores de estrés oxidativo las mediciones de emisión por quimioluminiscencia de bajo nivel (Albertini y Abuja, 1998) y de fluorescencia, que emanan de los pigmentos producidos de la interacción de aldehídos (por ejemplo, MDA) con grupos aminos laterales de cadenas de proteínas, aminoácidos o de las bases de los ácidos nucleicos para formar bases de Schiff (Hammer y Braun, 1988).

La evaluación del daño oxidativo a proteínas puede lograrse mediante el uso del ensayo del carbonilo (Levine et al., 2000). Los grupos carbonilo ($>C=O$) son producidos por el ataque de las ERON sobre los residuos de aminoácidos en las proteínas. Entre esos métodos se incluyen la estimación del total de grupos carbonilo, la que constituye una determinación específica de técnicas de electroforesis en gel, así como determinaciones de peróxidos, pérdida de grupos sulfhidrilo (SH), pérdida de fluorescencia (por ejemplo, triptófano), clorinación de proteínas, nitración de proteínas e hidroxilación de aminoácidos.

Técnicas analíticas para biomarcadores del estrés oxidativo

Existen muchos métodos para evaluar la actividad y composición de las enzimas antioxidantes que, junto con los LMWA, constituyen los dos componentes mayoritarios del sistema endógeno de defensa antioxidante.

Algunas técnicas que directamente evalúan actividad enzimática utilizan medidas espectroscópicas, procedimientos de actividad en gel o métodos de inmunocitoquímica (Tabla 1). La determinación del destino de LMWA sirve como un indicador de la existencia de las ERON. Por ejemplo, el ataque de una ERON sobre el ácido úrico conduce a la producción de alantoína (Halliwell y Gutteridge, 1999); de forma similar, el ataque de esta sobre el ácido ascórbico causa una producción de ácido dehidroascórbico. La determinación de la relación entre el oxidante y el reductor (por ejemplo, ascorbato-dehidroascórbico o glutatión reducido-glutatión oxidado (GSH-GSSG) es un indicador de daño oxidativo. Uno de los enfoques más comúnmente usados es la medición de la actividad antioxidante total de un sitio biológico. La pérdida de una molécula antioxidante causa cambios en la concentración de otras moléculas antioxidantes y puede evaluarse mediante varias técnicas bioquímicas, inmunohistológicas, espectroscópicas y electroquímicas (Prior y Cao, 1999).

El ensayo de Actividad Antioxidante Total (TAS, *Total Antioxidant Status*) ofrece muchas ventajas y es considerada una herramienta útil como marcador del estrés oxidativo en fluidos corporales y tejidos. Es también utilizado como una herramienta apropiada para la evaluación de la terapia antioxidante. Las determinaciones de LMWA total, más que antioxidantes individuales, son importantes porque los LMWA trabajan en conjunto (Berry y Kohen, 1999) y la medición de sólo uno o unos pocos compuestos, de los muchos presentes en un lugar específico, puede ser errónea. Existe una docena de LMWA y usualmente sólo unos pocos de ellos son conocidos, como la vitamina E y los ácidos ascórbico y úrico. Existen numerosos procedimientos que permiten medir la actividad de LMWA total e incluyen métodos directos e indirectos para calcular la actividad antioxidante total que se origina a partir de ellos (Lowe, 2014).

Los métodos directos para medir los LMWA totales son aquellos que utilizan una prueba externa para determinar la capacidad oxidante o reductora de un sistema. Un ejemplo de ello lo constituye un electrodo, en el cual la corriente es

proporcional a la concentración del secuestrador de la pareja redox bajo investigación. Estos métodos directos se clasifican en dos grupos: químicos y electroquímicos. Los métodos químicos miden la pareja redox activa cuyo estado oxidado o reducido tiene diferentes propiedades físicas que se miden como una función de la concentración. Por ejemplo, el ensayo del poder antioxidante para reducir el hierro III (FRAP, *Ferric-Reducing Antioxidant Power*) se basa en la reacción en la muestra de la pareja redox hierro II-III con antioxidantes, manifestado con un color azul que se mide a 593 nm (Benzie y Strain, 1999). Los métodos electroquímicos incluyen varias técnicas, tales como la potenciometría, la titración electroquímica y la voltametría (Skoog et al., 1988). Tales mediciones pueden realizarse de forma fácil y rápida y pueden involucrar varias muestras sin extracción y tratamiento sofisticados. Es importante señalar que la información derivada de estos ensayos no se puede obtener por otros métodos y las evaluaciones proveen información de todos los LMWA, tanto de naturaleza lipofílica como hidrofílica, y se obtiene en células, fluidos biológicos y tejidos.

Los métodos indirectos son, entre otros, los siguientes:

- a. Medición de parejas electroquímicas, tales como GSH-GSSG, NADH-NAD, y ácido ascórbico-ascorbato;
- b. El ensayo de la capacidad antioxidante equivalente de Trolox (TEAC, *Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*) (Motchnik et al., 1994);
- c. El ensayo del potencial atrapador de radical (TRAP, *Total Radical-Trapping Potential*) (Rice-Evans y Miller, 1994);
- d. El método de quimioluminiscencia;
- e. La metodología de la capacidad de absorbancia oxígeno-radical (ORAC, *Oxygen-Radical Absorbance Capacity*) (Prior y Cao, 1999).

La metodología para la cuantificación de LMWA totales fue la primera en introducirse (Lissi et al., 1995) y se ha usado en una amplia variedad de situaciones clínicas y desórdenes patológicos que

incluyen diabetes, colitis ulcerativa, enfermedades neurodegenerativas, el estado de la piel y las patologías asociadas a esta y la terapia de irradiación; así como el estudio de los procesos de envejecimiento y el desarrollo embrionario (Kohen et al., 1992, Lissi et al., 1995). También se ha comprobado que los fluidos biológicos, tales como fluido seminal, saliva, sudor, orina, plasma y jugo gástrico poseen poder reductor derivado del contenido de sus LMWA.

Las pruebas fluorescentes se vienen utilizando con mayor frecuencia para determinar la presencia de ERO y ERN (Kalyanaraman et al., 2012). Sin embargo, estas pruebas no son específicas y la respuesta puede ser interferida por componentes biológicos celulares que pueden conducir a resultados que no reflejan la severidad del estrés oxidativo (Winterburn, 2014). Las sondas cuánticas semiconductoras fluorescentes han demostrado que pueden eliminar esta desventaja de las pruebas fluorescentes tradicionales (Adegoke y Forbes, 2015).

La determinación del estado del estrés oxidativo (leve, moderado o severo), de acuerdo a los marcadores del estrés oxidativo que se miden, se divide en tres categorías:

- a) Moléculas modificadas por radicales libres, tales como el 4-HNE, MDA y 8-OHdG, que son derivados de proteínas, lípidos y ácidos nucleicos, respectivamente. La cantidad de estos productos es proporcional a la dosis de la ERO tóxica y son detectados en los sitios donde ocurre el ataque de la ERO.
- b) Enzimas y moléculas antioxidantes que están asociadas con el metabolismo de ERO, tales como GSH y catalasa.
- c) Factores transcripcionales, tales como el factor de transcripción nuclear κ B (NF- κ B) y *c-myc*, los cuales son modulados por ERO.

Biomarcadores específicos del estrés oxidativo

Muchas publicaciones refieren biomarcadores del estrés oxidativo dirigidos a enzimas específicas, factores o productos de daño que son usados para soportar la investigación de la fisiopatología de enfermedades tóxicas o neurodegenerativas (como el cáncer) o son aplicados al desarrollo de nuevos

fármacos. A continuación se relacionan algunos de estos biomarcadores:

- **8-Hidroxideoxiguanosina (8-OHdG):** La 8-OHdG es una forma oxidada de la guanina y es considerada como el mayor inductor de daño oxidativo al ADN; causa mutaciones de transversión de A:T a C:C o G:C a T:A, debido a su apareamiento con adenina o citosina (Kohen y Nyska, 2002; Kroese y Scheffer, 2014). Sin embargo, la importancia biológica de las concentraciones elevadas de 8-OHdG urinaria ha estado abierta al debate. Por un lado, estas concentraciones elevadas podrían implicar una mayor exposición a ERON, mientras que por el otro, podría indicar la presencia de un sistema de reparación completa del ADN que ha sido capaz de mitigar el daño potencial. Por lo tanto, la interpretación de los datos de biomarcadores es fundamental para la comprensión de los complejos procesos que tienen lugar dentro de una célula-tejido y, a menudo, implica más estudios mecanicistas para ayudar con la interpretación de los valores detectados (Laher, 2014).
- **Oxidación de tirosina, nitración y halogenación:** El análisis de 3-nitrotirosina (NO₂-Tyr), un marcador estable de oxidantes derivados del óxido nítrico (NO) (Dalle-Donne et al., 2006), y productos halogenados de tirosina, como la 3-clorotirosina (Cl-Tyr) y la 3-bromotirosina, han sido llevados a cabo en varias enfermedades por métodos diversos. La determinación cuantitativa de NO₂-Tyr presenta varios problemas metodológicos que han sido criticados de forma exhaustiva (Toyokuni, 1999; Davis et al., 2001), ya que la mayoría de los datos disponibles en tejidos y fluidos han sido derivados de métodos basados en anticuerpos, los que usualmente no han sido rigurosamente validados. Además, la concentración de NO₂-Tyr encontrada en muestras de plasma humano normal varían hasta 30 veces entre diferentes estudios. Una posible razón es que la NO₂-Tyr puede generarse rápidamente *ex vivo* durante la preparación de la muestra y el análisis se realiza como resultado de la acidificación o contribución de enzimas proteolíticas por autodigestión. Otro biomarcador para uso humano pudiera ser la O,O'-ditirosina (Di-Tyr), que aparentemente no se metaboliza y también es detectable en la orina humana. Su concentración en la orina podría, por tanto, servir como un marcador no invasivo de la oxidación de proteínas. Por otra parte, Di-Tyr tiene la ventaja de ser metabólicamente estable porque, una vez que el enlace 3'-3' carbono-carbono está formado, sólo se libera después de la hidrólisis enzimática de las proteínas modificadas en el proceso oxidativo (Dalle-Donne et al., 2006).
- **Malonildialdehído (MDA):** El MDA es un cetoaldehído fisiológico producido por descomposición de lípidos insaturados provenientes del metabolismo del ácido araquidónico. El exceso de MDA producido como resultado del daño tisular puede combinarse con grupos aminos de proteínas (este reacciona fundamentalmente con residuos de lisina por la reacción de adición de Michael) lo que produce aductos de proteínas modificadas. Estas modificaciones son inmunogénicas y se han detectado auto-anticuerpos contra residuos de lisina modificados por MDA en suero de conejos y humanos. Estos auto-anticuerpos se han relacionado con la aterosclerosis, insuficiencia arterial coronaria y el infarto de miocardio (Tsikas et al., 2005). La relevancia clínica de la reacción que ocurre entre el MDA y las proteínas es medible en una serie de enfermedades de alta morbi-mortalidad.
- **Acroleína (2-propenal):** La acroleína está presente en varias fuentes ambientales, principalmente el humo del cigarro. Uno de sus derivados 4-hidroxi-2-nonenal (HNE) es el aldehído de mayor toxicidad generado por el ataque de ERON sobre ácidos grasos ω-6-poli-insaturados (ácidos araquidónico, linoleico y linoléico) (Duncan, 2003) y es considerado un segundo mensajero tóxico de ERON (Stocker y Keaney, 2004; Tsikas y Caidahl,

2005). HNE experimenta varias reacciones con proteínas, péptidos, fosfolípidos y ácidos nucleicos y tiene una actividad biológica alta, por lo que exhibe numerosos efectos citotóxicos, mutagénicos y genotóxicos. Ello incluye la inhibición de la síntesis de proteínas y ADN, inactivación de enzimas, estimulación de fosfolipasa C, reducción de la comunicación *gap-junction*, estimulación de la quimiotaxis de neutrófilos, modulación de la agregación plaquetaria y de la expresión de varios genes (Uchida, 2003). HNE puede ser un mediador de la apoptosis inducida por el estrés oxidativo, la proliferación celular y las vías de señalización (Kilgour y Roberts, 2014). HNE se forma permanentemente a concentraciones basales bajo condiciones fisiológicas, pero su producción se aumenta rápidamente en condiciones patológicas relacionadas con un incremento de la peroxidación lipídica. HNE y acroleína son altamente reactivos frente a proteínas (en particular, HNE es mucho más reactivo frente a proteínas que a ADN). Estos forman aductos covalentes con residuos de histidina, lisina y cisterna, a través de la reacción de adición de Michael, los que se conocen con el nombre de productos finales avanzados de lipoperoxidación (Winczura et al., 2012).

- **Isoprostanos:** Los F2-Isoprostanos (F2-IsoPs) son moléculas que contienen un anillo de prostano tipo F que, teóricamente, son una familia de compuestos similares a la prostaglandina F_{2α}. Estos son generados *in vivo*, primeramente *in situ*, por peroxidación no enzimática catalizada por radicales libres provenientes del ácido araquidónico esterificado y después liberados a la circulación por fosfolipasas antes de la excreción en orina como isoprostanos libres. Los F2-IsoPs es la clase de isoprostanos más estudiada y debido a su estabilidad ofrecen una medida muy exacta del estrés oxidativo. Varios reportes muestran que los F2-IsoP son biomarcadores de la peroxidación lipídica, auténticos y fiables, útiles *in vivo* como biomarcadores del estrés oxidativo en varias condiciones clínicas que se resumen en la

Tabla 2. También los F2-IsoPs se usan para ensayar la respuesta oxidativa *in vivo* de varios fármacos, antioxidantes o en intervenciones dietéticas en las que se prueben sus propiedades secuestradoras de ERON (Parola et al., 1999; Carini et al., 2004). Los isoPs se encuentran en cantidades medibles en muchos fluidos biológicos como plasma, orina, fluido sinovial, fluido broncoalveolar, bilis, linfa, fluido de microdiálisis de varios órganos y fluido amniótico, pericárdico y seminal. Las muestras de plasma y orina son las que más se analizan por la ventaja de que los métodos para su obtención son menos invasivos (Lowe, 2014). La cuantificación de F2-IsoPs en esos fluidos da un índice de elevada exactitud y precisión de la severidad del estrés oxidativo, aunque su medición es aún complicada (van't Erve et al., 2015).

- **Factor de transcripción nuclear κB (NF-κB):** El NF-κB es un factor transcripcional implicado en la inflamación y la activación del sistema inmune y es activado por agentes oxidantes y citocinas, entre otros (Butterfield, 2002). Este factor está preparado, de forma particular, para la defensa en aquellas condiciones que atenten contra la vida (infecciones virales y bacterianas o estrés físico) y realiza semejante función porque se encuentra en el citoplasma de casi todas las células. En el tejido inflamado de forma crónica, en el que los estímulos patogénicos externos parecen estar ausentes, TNF e IL-1 actúan como inductores endógenos primarios de NF-κB. Cuando las células son expuestas a estas citocinas, una cascada de eventos conduce a la fosforilación y subsecuente degradación de sus inhibidores, por lo que NF-κB se libera para entrar en el núcleo y activar la expresión de genes (Janssen, 2001). Esta activación del factor incrementa la expresión de moléculas de adhesión E-selectina, VCAM-1 e ICAM-1, mientras la inhibición de NF-κB reduce la adhesión y trans migración de leucocitos. También su activación está involucrada en la inducción o inhibición de la apoptosis (González-Murillo et al., 2015). NF-κB es activado, de forma

significativa, en sitios de inflamación en diversas enfermedades y puede inducir la transcripción de citocinas proinflamatorias, tales como $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, IL-6 e IL-8 , quimiocinas, moléculas de adhesión, metaloproteinasas de la matriz (MMPs), COX-2 y iNOS . En artritis reumatoide, $\text{NF-}\kappa\text{B}$ es sobre-expresado en la membrana sinovial inflamada y su actividad puede aumentar el reclutamiento de células inflamatorias y la producción de mediadores proinflamatorios tales como IL-1 , IL-6 , IL-8 , y $\text{TNF}\alpha$ (Montine et al., 2005; Morrow, 2005; Fulop et al., 2015).

- **Ciclooxigenasa-2 (COX-2):** La COX-2 es inducida en el sitio de inflamación después de la estimulación con agentes proinflamatorios como IL-1 , $\text{TNF}\alpha$ y lipopolisacárido (LPS) (Karin y Ben-Neriah, 2000). Algunas investigaciones sugieren que la liberación desde células inflamatorias de NO ; el cual es sintetizado a partir de L-arginina por la acción de la iNOS , incrementa la actividad de COX-2 . La sobre-expresión de COX-2 está involucrada en la proliferación celular y la carcinogénesis en diferentes órganos (Baldwin, 1996). Además, inhibidores específicos de COX-2 previenen la carcinogénesis de pulmón (Miagkov et al., 1998; Fulop et al., 2015).
- **Glutación y proteínas S-glutationiladas:** Debido a que las concentraciones sanguíneas de glutación reflejan el estado del glutación en otros tejidos menos accesibles, las mediciones del glutación reducido (GSH) y el glutación disulfuro (GSSG) en sangre se consideran esenciales como índice del estado del GSH en todo el cuerpo y es un indicador útil del estado de estrés oxidativo en humanos (Han et al., 1998; Montezano et al., 2015).
- **Glutación S-transferasa:** Las enzimas que metabolizan fármacos, como las glutación S-transferasas (GST), y los sistemas antioxidantes, como glutación, vitaminas, catalasa y superóxido dismutasa, funcionan concertadamente como los dos mayores sistemas de defensa inducibles contra electrófilos y xenobióticos (Aupperle et al., 1999).

La expresión de estos dos sistemas ocurre a través de una región reguladora común llamada elemento de respuesta antioxidante (ARE, *Antioxidant Responsive Element*) (Dubois et al., 1998). Se sabe que el factor nuclear 2 (Nrf2) es la molécula clave que responde a los electrófilos reactivos por activación de la expresión de genes mediada por ARE. La glutación S-transferasa-pi (GST-pi), un miembro de esta familia de enzimas de fase II de detoxificación, cataliza la reacción de detoxificación intracelular, en la que se incluye la inactivación de carcinógenos electrofílicos (Zimmermann et al., 1999; Fletcher et al., 2015).

- **Óxido nítrico sintasa inducible (iNOS):** La iNOS ha sido detectada en células del sistema inmune como macrófagos, neutrófilos, células musculares lisas, queratinocitos, células mesenquiales, hepatocitos, fibroblastos y miocitos cardíacos, entre otros (Rioux y Castonguay, 1998). Esta enzima produce NO en cantidades mil veces superiores a las formadas por el sistema constitutivo. En muchos estudios se ha obtenido como resultado que el NO liberado por la estimulación del sistema inducible causa profunda vasodilatación, daño celular y disfunción cardíaca. Se ha comprobado su participación en mecanismos defensivos del organismo contra las células tumorales y contra infecciones provocadas por bacterias, hongos, parásitos intracelulares y determinados virus. Esto puede realizarlo debido a la acción citostática y citotóxica que ha sido comprobada para dicho radical (Pastore et al., 2003). En el choque endotóxico producido por LPS, la inducción que se produce de la iNOS está precedida de un aumento en la síntesis del $\text{TNF}\alpha$ y se ha demostrado que la conexión existente entre la estimulación (administración de LPS) y el posterior incremento en la síntesis del $\text{TNF}\alpha$, no es más que un proceso mediado por la producción de NO (Enomoto et al., 2001). Aunque las otras isoformas de la NOS están involucradas, en mayor o menor grado, en el proceso inflamatorio, el papel que

desempeña la iNOS parece ser dominante. La expresión de la iNOS, después de la estimulación por endotoxina bacteriana u otras citocinas, está acompañada por la liberación de otros mediadores, tales como PGE₂ y PGI₂, vía COX (Prester y Talalay, 1995). La producción sinérgica de PGs y NO parece tener un vínculo crucial entre las vías de NOS y COX en ciertas condiciones patológicas. La activación celular por componentes de la pared celular de bacterias Gram-positivas o -negativas resulta en la producción de una variedad de mediadores inflamatorios que son esenciales para el desarrollo del choque séptico y sus complicaciones (Henderson et al., 1998). Aunque la expresión de iNOS protege el hígado en la inflamación hepática aguda, esta puede producir necrosis hepática en la isquemia-reperfusión y en el choque hemorrágico (Balligand et al., 1994). Se ha demostrado *in vitro* que el NF-κB desempeña un papel fundamental en la regulación transcripcional de los genes, humano y murino, de la iNOS activados por LPS y citocinas (Moncada, 1992). El NO estimula la producción del TNFα en sinoviocitos y condrocitos lo que promueve la degradación del cartílago articular, implicada en ciertas enfermedades reumáticas y lupus eritematoso (Rojas et al., 1993). También ha sido estudiada su influencia en dermatitis (Salvemini et al., 1996), diabetes (Groeneveld et al., 1997), arteriosclerosis (Li y Billiar, 1999), asma (Taylor et al., 1998), cicatrización (Clancy et al., 1998) y la enfermedad inflamatoria intestinal (Clough, 1999), entre otras (Shah et al., 2014).

- **Hemooxigenasa I (HO-1):** La HO-1 es una proteína de choque térmico y la principal enzima implicada en el catabolismo del grupo hemo. HO-1 fue descubierta a principios de la década del 60 del siglo XX, pero no fue hasta mediados de los años 80 cuando empezó a estudiarse con detenimiento y se comprobó que existía una isoforma inducible, la cual fue denominada HO-1. Esta proteína desempeña un papel importante en la modulación de procesos

inflamatorios, demostrado en diferentes modelos experimentales, tanto en animales como humanos, en los mecanismos de defensa antioxidante endógenos ante la presencia de algún daño y en el bloqueo de los procesos apoptóticos, donde han sido involucradas distintas rutas de señalización celular (Sánchez et al., 2005; Fredenburgh et al., 2015).

- **Proteínas carboniladas:** Los grupos carbonilo de las proteínas se generan por oxidación de varias cadenas de aminoácidos, por la formación de aductos de la reacción de Michael entre residuos de lisina, histidina y cisteína y aldehídos α,β-insaturados, así como por glicosidación/glicoxidación de grupos amino de lisina que forman productos finales avanzados de glicosidación (Maxwell y Cooke, 1999). La formación de compuestos carbonílicos es el marcador más general y ampliamente usado para la comprobación de oxidación severa de proteínas tanto *in vitro* como *in vivo*. Se han desarrollado varios ensayos para la cuantificación de estas especies (Sanders, 1999; Schaffer et al., 1999). La estabilidad química de las proteínas carbonílicas las hacen un blanco muy conveniente para las mediciones del daño oxidativo en el laboratorio. Se ha comprobado que los grupos carbonilo pueden desempeñarse como marcador de daño oxidativo a proteínas en el envejecimiento y una serie larga de enfermedades (Tetik et al., 2015).
- **Glicol timidina:** La oxidación de timidina por el radical hidroxilo genera 5,6-dihidroxi-5,6-dihidrotimidina (glicol timidina). Generalmente, la mayoría de los productos de timidina no generan lesiones pre-mutagénicas potentes; sin embargo, la glicol timidina en particular distorsiona la molécula de ADN, que conduce a una lesión letal (Lowe, 2014).
- **Daño oxidativo al ADN:** El daño al ADN celular es causado por EROs generadas bajo diferentes condiciones y este se relaciona con el riesgo incrementado del desarrollo de

cáncer (Leonard et al., 1998). El ADN sujeto al ataque del radical hidroxilo genera un amplio rango de productos de modificación de azúcares y bases (Ferris et al., 1999; Fang et al., 2004). Tales productos pueden medirse por técnicas basadas en anticuerpos y HPLC, GC-MS y LC-MS. Usualmente, se miden 8-OH-dG (Dalle-Donne et al., 2003) y glicol timidina (Lowe, 2014) como índice de daño oxidativo al ADN. Una técnica específica, para identificar las especies reactivas que se forman a partir del ataque de radicales libres contra la

molécula del ADN, es la del Atrapamiento de Inmuno Spin (*Immune Spin Trapping: ISP*). Esta práctica combina la sensibilidad del atrapamiento de *spin* con los métodos de inmunoensayo para detectar el daño provocado por el estrés oxidativo en la molécula de ADN (Ramirez et al., 2006; 2007).

En la Tabla 2 se aprecia un resumen de algunas de las enfermedades que están asociadas con un incremento del estrés oxidativo sobre la base de la determinación de los biomarcadores del estrés oxidativo descritos con anterioridad.

Tabla 2. Principales biomarcadores para determinar la intensidad del daño oxidativo en relación a la progresión de diferentes enfermedades asociadas con un incremento del estrés oxidativo.

Enfermedad	Biomarcador del estrés oxidativo	Referencia
Sistema cardiovascular		
Angina	F2-IsoPs, MDA	Dalle-Donne et al., 2006; Ito et al., 2015.
Aterosclerosis	MDA, HNE, F2-IsoPs, NO ₂ -Tyr, Cl-Tyr, Di-Tyr, HO-1, NF-κB, COX-2, 8-OHdG, NADPH oxidase	Sengupta, 1999; Baldwin, 2001; Turini y DuBois, 2002; Sánchez et al., 2005; Dalle-Donne et al., 2006; Gray et al., 2013; Kroese y Scheffer, 2014.
Hipercolesterolemia	F2-IsoPs, NO ₂ -Tyr	Dalle-Donne et al., 2006.
Hiperlipidemia	Proteínas S-glutationadas	Dalle-Donne et al., 2006.
Daño por isquemia-reperfusión	F2-IsoPs, HO-1	Sánchez et al., 2005; Dalle-Donne et al., 2006.
Enfermedad arterial coronaria	F2-IsoPs, NO ₂ -Tyr, Cl-Tyr, 8-OHdG	Dalle-Donne et al., 2006; Zhang, 2013; Kroese y Scheffer, 2014.
Enfermedades cardiovasculares	HNE, F2-IsoPs, Decrece la concentración GSH y(o) relación GSH:GSSG, NO ₂ -Tyr, Cl-Tyr, NF-κB, 8-OHdG, HO-1	Marczin et al., 2003; Dalle-Donne et al., 2006; Zhang, 2013; Kroese y Scheffer, 2014; Fredenburgh et al., 2015.
Infarto del miocardio	F2-IsoPs, HO-1, COX-2, 8-OHdG	Sengupta, 1999; Sánchez et al., 2005; Dalle-Donne et al., 2006; Kroese y Scheffer, 2014.
Inflamación miocárdica	NO ₂ -Tyr	Dalle-Donne et al., 2006.
Insuficiencia cardiaca	F2-IsoPs, 8-OHdG	Dalle-Donne et al., 2006; Kroese y Scheffer, 2014.
Hipertensión	HO-1, radical superóxido, H ₂ O ₂ , SOD, CAT, GSH, NADPH oxidasa, MDA, F2-IsoPs,	Sánchez et al., 2005; Fredenburgh et al., 2015; Montezano et al., 2015.
Agregación plaquetaria	HO-1	Sánchez et al., 2005.

Continuación Tabla 2...

Enfermedad	Biomarcador del estrés oxidativo	Referencia
Daño vascular	HO-1	Sánchez et al., 2005.
Sistema digestivo		
Enfermedades inflamatorias intestinales	HO-1 , NF-κB, COX-2	Sengupta, 1999; Baldwin, 2001; Sánchez et al., 2005.
Isquemia-reperfusión intestinal	HO-1	Sánchez et al., 2005.
Enfermedad de Crohn	F2-IsoPs, NO ₂ -Tyr, Proteínas carboniladas	Dalle-Donne et al., 2006.
Isquemia intestinal	HO-1	Sánchez et al., 2005.
Hígado		
Enfermedad hepática alcohólica aguda y crónica	F2-IsoPs, decrece la concentración GSH y(o) relación GSH:GSSG	Dalle-Donne et al., 2006.
Hepatotoxicidad	HO-1	Sánchez et al., 2005.
Perfusión hepática	HO-1	Sánchez et al., 2005.
Choque hepático	HO-1	Sánchez et al., 2005.
Función hepatobiliar	HO-1	Sánchez et al., 2005.
Isquemia-reperfusión hepática	HO-1	Sánchez et al., 2005.
Cirrosis	F2-IsoPs (biliar primaria) y hepática, NO ₂ -Tyr, proteínas carboniladas, GSH, GSH:GSSG, GPx, MDA	Dalle-Donne et al., 2006; Gimenez-Garzó et al., 2015.
Enfermedades autoinmunes		
Artritis	Proteínas carboniladas (artritis crónica juvenil), (artritis reumatoide, psoriática y reactiva), Decrece la concentración GSH y(o) relación GSH:GSSG, NO ₂ -Tyr, Cl-Tyr, Proteínas carboniladas , NF-κB, NO, COX-2' (artritis reumatoide)	Sengupta, 1999; Li et al., 2000; Baldwin, 2001; Turini y DuBois, 2002; Blanco-García et al., 2005; Dalle-Donne et al., 2006.
Esclerosis lateral amiotrófica	MDA, Decrece la concentración GSH y(o) relación GSH:GSSG, NO ₂ -Tyr, Proteínas carboniladas	Dalle-Donne et al., 2006.
Esclerosis múltiple	F2-IsoPs, NO ₂ -Tyr, MDA	Dalle-Donne et al., 2006; Miller et al., 2013.
Esclerosis sistémica (esclerodermia)	F2-IsoPs	Dalle-Donne et al., 2006.
Fibrosis quística	F2-IsoPs, NO ₂ -Tyr, Cl-Tyr, Di-Tyr, proteínas carboniladas	Dalle-Donne et al., 2006.
Lupus eritematoso sistémico	F2-IsoPs, NO ₂ -Tyr, HNE, proteínas carboniladas, MDA, 8-OHdG, GPx, GR	Dalle-Donne et al., 2006; Shah et al., 2014.
Osteoartritis	F2-IsoPs, NO ₂ -Tyr, NO	Blanco-García et al., 2005; Dalle-Donne et al., 2006.

Continuación Tabla 2...

Enfermedad	Biomarcador del estrés oxidativo	Referencia
Osteoporosis	F2-IsoPs, COX-2	Turini y DuBois, 2002; Dalle-Donne et al., 2006.
Psoriasis	Proteínas carboniladas, NO	Dalle-Donne et al., 2006; Namazi, 2006.
Síndrome de fatiga crónica	Proteínas carboniladas, 8-OHdG; MDA, HO-1	Dalle-Donne et al., 2006; Maes et al., 2009; Jammes et al., 2012; Fredenburgh et al., 2015.
Infecciones por micro-organismos		
Hepatitis C crónica	Proteínas carboniladas, NO, 8-OHdG	Maeda y Akaike, 1998; Dalle-Donne et al., 2006; Lowe, 2014.
Hepatitis B crónica	8-OHdG	Lowe, 2014.
Carcinoma hepatocelular	8-OHdG	Lowe, 2014.
Infección e inflamación por <i>Helicobacter pylori</i>	Proteínas carboniladas	Dalle-Donne et al., 2006.
VIH	Proteínas S-glutationadas, HO-1, NO, Decrece la concentración GSH y(o) relación GSH:GSSG, NF-κB	Maeda y Akaike, 1998; Baldwin, 2001; Sánchez et al., 2005; Dalle-Donne et al., 2006.
Leishmaniasis cutánea	MDA	Dalle-Donne et al., 2006.
Meningitis	Proteínas carboniladas	Dalle-Donne et al., 2006.
Miocarditis autoinmune aguda	Proteínas carboniladas	Dalle-Donne et al., 2006.
Pancreatitis	F2-IsoPs, Proteínas carboniladas	Dalle-Donne et al., 2006.
Sepsis	Proteínas carboniladas, NF-κB, NO	Maeda y Akaike, 1998; Baldwin, 2001; Dalle-Donne et al., 2006. Sánchez et al., 2005.
Sistema inmune		
Enfermedades autoinmunes	HO-1	Sánchez et al., 2005.
Modulación de la actividad mastocitaria	HO-1	Sánchez et al., 2005.
Activación de basófilos	HO-1	Sánchez et al., 2005.
Quimiotaxis de neutrófilos	HO-1	Sánchez et al., 2005.
Adhesión leucocitaria	HO-1	Sánchez et al., 2005.
Cascada del complemento	HO-1	Sánchez et al., 2005.
Sistema Respiratorio		
Asma	MDA, F2-IsoPs, Decrece la concentración GSH y(o) relación GSH:GSSG, NO ₂ -Tyr, Cl-Tyr, Proteínas carboniladas, HO-1 (AFB), NF-κB, NO	Matera, 1998; Baldwin, 2001; Dalle-Donne et al., 2006.
Daño pulmonar	NO ₂ -Tyr, F2-IsoPs, GST	Dalle-Donne et al., 2006; Fletcher et al., 2015.

Continuación Tabla 2...

Enfermedad	Biomarcador del estrés oxidativo	Referencia
Displasia broncopulmonar	NO ₂ -Tyr (severa en neonatos), Proteínas carboniladas	Dalle-Donne et al., 2006.
Enfermedad pulmonar intersticial	F ₂ -IsoPs	Dalle-Donne et al., 2006.
Enfermedad pulmonar obstructiva	HNE, F ₂ -IsoPs, NO ₂ -Tyr, Proteínas carboniladas, HO-1	Sánchez et al., 2005; Dalle-Donne et al., 2006.
Fibrosis carbonila idiopática	Decrece la concentración GSH y(o) relación GSH:GSSG, Proteínas carboniladas	Dalle-Donne et al., 2006.
Hipertensión pulmonar	F ₂ -IsoPs	Dalle-Donne et al., 2006.
Síndrome de distrés respiratorio agudo	F ₂ -IsoPs, Decrece la concentración GSH y(o) relación GSH:GSSG, NO ₂ -Tyr, Cl-Tyr, Di-Tyr, Proteínas carboniladas	Dalle-Donne et al., 2006.
Síndrome de distrés respiratorio	Decrece la concentración GSH y(o) relación GSH:GSSG	Dalle-Donne et al., 2006.
Hiperoxia	HO-1	Sánchez et al., 2005.
Hipoxia	HO-1	Sánchez et al., 2005.
Rinitis alérgica	HO-1	Sánchez et al., 2005.
Asbestosis	Decrece la concentración GSH y(o) relación GSH:GSSG	Dalle-Donne et al., 2006.
Sistema renal		
Enfermedad renal crónica	F ₂ -IsoPs, Di-Tyr, Proteínas carboniladas	Dalle-Donne et al., 2006.
Insuficiencia renal crónica	Cl-Tyr, Proteínas carboniladas	Dalle-Donne et al., 2006.
Daño agudo renal	HO-1 COX-2	Turini y DuBois, 2002; Sánchez et al., 2005;
Isquemia-reperfusión renal	HO-1, glicol timidina	Sánchez et al., 2005; Lowe, 2014.
Glomerulonefritis	HO-1	Sánchez et al., 2005.
Uremia	Proteínas carboniladas	Dalle-Donne et al., 2006.
Uremia asociada con hemodiálisis peritoneal	proteínas S-glutationadas	Dalle-Donne et al., 2006.
Erección del pene	HO-1	Sánchez et al., 2005.
Aceruloplasminemia	Proteínas carboniladas	Dalle-Donne et al., 2006.
Esferocitosis	Proteínas S-glutationadas	Dalle-Donne et al., 2006.
Siclemia	F ₂ -IsoPs, NF-κB	Baldwin, 2001; Dalle-Donne et al., 2006.
Sistema nervioso		
Ataxias	Proteínas S-glutationadas, incremento en H ₂ O ₂ y radical superóxido, detección de F ₂ -IsoPs, 8-OHdG y MDA, disminución de GSH libre y aumento de GSH unido a hemoglobina (de Friedreich), decrece la concentración GSH y(o) relación GSH:GSSG (telangiectasia)	Dalle-Donne et al., 2006; Santos et al., 2010; Gomes y Santos, 2013.
Autismo	Decrece la concentración GSH y(o) relación GSH:GSSG, GPx	Frustaci et al., 2012; Rose et al., 2012.

Continuación Tabla 2...

Enfermedad	Biomarcador del estrés oxidativo	Referencia
Daño a la médula espinal	F2-IsoPs, HO-1	Sánchez et al., 2005; Dalle-Donne et al., 2006.
Desorden bipolar y depresión	Peroxidación lipídica, NO, HNE, MDA, 8-OHdG, incrementa la concentración de CAT, GPx	Brown et al., 2014; de Sousa et al., 2014; Moylan et al., 2014.
Deterioro Cognitivo Leve (MCI)	HNE, acroleína	Dalle-Donne et al., 2006.
Enfermedad de Alzheimer	MDA, HNE, F2-IsoPs, Decece la concentración GSH y(o) relación GSH:GSSG, NO ₂ -Tyr, Proteínas carboniladas, HO-1, COX-2	Sengupta, 1999; Turini y DuBois, 2002; Sánchez et al., 2005; Dalle-Donne et al., 2006; Shichiri, 2014.
Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob	F2-IsoPs	Dalle-Donne et al., 2006.
Enfermedad de Huntington	F2-IsoPs, aumento de la actividad de NADPH oxidasa	Dalle-Donne et al., 2006; Valencia et al., 2013.
Enfermedad de Parkinson	HNE, Decece la concentración GSH y(o) relación GSH:GSSG, Proteínas carboniladas, F2-IsoPs, neuroprostanos, 8-OHdG	Dalle-Donne et al., 2006; Seet et al., 2010; Shichiri, 2014.
Esquizofrenia	SOD, GPx, CAT, MDA, GSH, HNE, NO, proteínas carboniladas,	Flatow et al., 2013, Möller et al., 2015.
Isquemia cerebral	Decece la concentración GSH y(o) relación GSH:GSSG, NO	Bashkatova y Rayevsky, 1998; Dalle-Donne et al., 2006.
Síndrome de Down	F2-IsoPs, disminución del contenido de CoQ10 en linfocitos y plaquetas	Dalle-Donne et al., 2006, Tiano y Busciglio, 2011; Tiano et al., 2012; Shichiri, 2014.
Ictus	NF-κB, COX-2	Baldwin, 2001; Turini y DuBois, 2002
Otras		
Cáncer	Decece la concentración GSH y(o) relación GSH:GSSG, NO ₂ -Tyr (pulmón). Proteínas carboniladas (pulmón), proteínas S-glutationadas (carcinoma de células renales), HO-1, NF-κB, NO, COX-2. MDA, hidroperóxidos de lípidos totales y proteínas carboniladas (leucemia mieloide crónica), 8-OHdG	Maeda y Akaike, 1998; Sengupta, 1999; Baldwin, 2001; Turini y DuBois, 2002; Chun y Surh, 2004; Sánchez et al., 2005; Dalle-Donne et al., 2006; Ahmad et al., 2008; Singh et al., 2009; Lowe, 2014.
Diabetes (tipos 1 y 2)	MDA, F2-IsoPs, Decece la concentración GSH y(o) relación GSH:GSSG, proteínas S-glutationadas, NO ₂ -Tyr, Proteínas carboniladas, NF-κB, COX-2, NADPH oxidasa; HO-1	Baldwin, 2001; Turini y DuBois, 2002; Dalle-Donne et al., 2006; Kilgour y Roberts, 2014; Pérez-Gallardo et al., 2014; Fredenburgh et al., 2015; Marco et al., 2015.
Preeclampsia	MDA, Decece la concentración GSH y(o) relación GSH:GSSG, NO ₂ -Tyr, proteínas carboniladas, HO-1	Sánchez et al., 2005; Dalle-Donne et al., 2006.
Endometriosis	GSH, lipoperoxidación, HO-1, iNOS, 8-OHdG, proteínas carboniladas	Carvalho et al., 2013; Santulli et al., 2014.
Hiperhomocisteinemia	F2-IsoPs	Dalle-Donne et al., 2006.

Continuación Tabla 2...

Enfermedad	Biomarcador del estrés oxidativo	Referencia
Hiperosmolaridad córnea	HNE, MDA, aconitasa-2, 8-OHdG, HO-1, COX-2; SOD, GPx	Deng et al., 2015.
Cataratas (génesis)	Decrece la concentración GSH y(o) relación GSH:GSSG, proteínas S-glutationadas, Proteínas carboniladas	Dalle-Donne et al., 2006.
Retinopatía	Decrece la concentración GSH y(o) relación GSH:GSSG (de prematuridad), COX-2, TBARS, NO y GSH (diabética)	Turini y DuBois, 2002; Dalle-Donne et al., 2006; Sharma et al., 2015.
Sarcoidosis	Proteínas carboniladas	Dalle-Donne et al., 2006.
Progeria	Proteínas carboniladas	Dalle-Donne et al., 2006.
Síndrome Werner	Decrece la concentración GSH y(o) relación GSH:GSSG, Proteínas carboniladas	Dalle-Donne et al., 2006.
Amiloidosis sistémica	Proteínas carboniladas	Dalle-Donne et al., 2006.
Obesidad	F2-IsoPs, 8-OHdG, 8-hidroxi-8-oxoguanosina	Dalle-Donne et al., 2006; Ramachandra et al., 2015.
Caquexia	NF-κB	Baldwin, 2001
Síndrome Zellweger	F2-IsoPs	Dalle-Donne et al., 2006.
Trasplantes de órganos y tejidos	HO-1, COX-2, glicol timidina	Turini y DuBois, 2002; Sánchez et al., 2005; Lowe, 2014.
Anemia de Falconi	Aumenta la relación GSH:GSSG y el balance pro-oxidante-antioxidante, disminuyen las actividades de CAT y SOD	Pagano et al., 2013.
Talasemia	8-OHdG, hidroperóxidos lipídicos	Ferro et al., 2012
Distrofia muscular	Aumenta la concentración de proteínas carboniladas y la oxidación de proteínas tiólicas	Iwasaki et al., 2013; Terril et al., 2013

8-OHdG: 8-hidroxy-2'-deoxiguanosina;

CAT: catalasa;

Cl-Tyr: 3-Clorotirosina;

CoQ10: Co-enzima Q10;

COX-2: Ciclo-oxigenasa;

Di-Tyr: o,o'-Ditirosina;

F2-IsoPs: F2 isoprostanos;

GPx: Glutación peroxidasa;

GR: Glutación reductasa;

GSH: Glutación reducido;

GSSG: Glutación oxidado;

GST: Glutación-S-transferasa;

HNE: 4-hidroxi-2-nonenal;

HO-1: Hemo-oxigenasa 1;

iNOS: Óxido nítrico sintasa inducible;

MDA: Malonil-dialdehído;

NF-κB: Factor de transcripción nuclear κB;

NO: Óxido nítrico;

NO2-Tyr: 3-Nitrotirosina;

TBARS: Especies reactivas del ácido tiobarbitúrico

Uso de sondas para detectar el daño por estrés oxidativo mediante exomarcadores

La capacidad de medir *in vivo* las concentraciones de pequeñas moléculas dañinas y de señalización, tales como ERO, es esencial para la comprensión de sus funciones biológicas. Mientras que una

variedad de métodos se puede aplicar a sistemas *in vitro*, es un reto aun la medición *in vivo* de las concentraciones y los cambios relativos en las especies reactivas (Logan et al., 2014). Un enfoque hacia la consecución de este objetivo es el uso de biomarcadores. Por ejemplo, compuestos exógenos se administran por sonda al organismo intacto y

luego son transformados por las moléculas reactivas para producir un biomarcador de diagnóstico. El exomarcador y la sonda precursora pueden analizarse *ex vivo* por espectrometría de masas para inferir la identidad y las cantidades de las especies reactivas presentes *in vivo*. Esto es similar a la medición de los biomarcadores producidos por la interacción de especies reactivas con biomoléculas endógenas. Recientemente, se han desarrollado compuestos, como MitoB (un fragmento lipofílico catiónico de trifenilfosfonio unido a un ácido arilborónico), para deducir las concentraciones de peróxido de hidrógeno mitocondrial dentro de moscas (Cochemé et al., 2011; 2012) y ratones (Porteous et al., 2010).

Nanomateriales dirigidos por ERO utilizados como teranósticos

Se ha reportado que para el uso diagnóstico de los nanomateriales, un agente ideal sería el que genere señales por imágenes en respuesta al exceso de ERO. Esto podría hacerse con varias modalidades de imagen, como la imagen óptica, la resonancia magnética y la tomografía por emisión de positrones. Estos agentes de imagen pueden ser sensibles a receptores, dependientes del flujo sanguíneo o sensibles a reacciones con otros elementos. Los retos, sin embargo, incluyen su capacidad para dirigirse a moléculas que son razonablemente estables. La permeabilidad es también un aspecto importante de los agentes de formación de imágenes. En particular, para un agente de dirección neuronal, atravesar la barrera hematoencefálica puede ser un factor limitante. La eficacia *in vivo*, por lo tanto, también dependería de la permeabilidad, así como la supervivencia en plasma y la perfusión de los órganos (Kim et al., 2015). Por tanto, un nanomaterial biológico dirigido idealmente tendría que combinar la especificidad de destino (al blanco) y la sensibilidad de estímulos que, en conjunto, mejoraría la eficacia como agente teranóstico. El nanomaterial dirigido por ERO para objetivos teranósticos es muy probable que sea un agente multifuncional que sea sensible a los cambios redox locales específicos (Zielonka et al., 2012). Sin embargo, cualquier nanomaterial utilizado para estos fines tendrá que someterse a estudios preclínicos rigurosos en animales y en

humanos antes de que puedan ser utilizados en un entorno clínico más amplio.

Consideraciones finales

Un diseño adecuado de un protocolo de ensayo clínico con un producto antioxidante debe considerar una selección de los biomarcadores del estrés oxidativo, según el esquema terapéutico sea profiláctico o terapéutico, así como las características individuales de los pacientes incluidos en el estudio. Los ensayos clínicos de antioxidantes han tratado de medir la eficacia en función de los puntos finales de la observación clínica. Sin embargo, muy pocos ensayos han monitoreado los biomarcadores de la oxidación. Los ensayos clínicos futuros con antioxidantes deben monitorear los biomarcadores del estrés oxidativo en pacientes con niveles altos documentados del estrés oxidativo. Estos biomarcadores deben ser monitoreados para mostrar el efecto directo del antioxidante objeto del estudio clínico sobre el estado redox del paciente (Shishehbor y Hazen, 2004; Shah et al., 2014).

CONCLUSIONES

La identificación y el desarrollo de biomarcadores específicos de estrés oxidativo son importantes, ya que este proceso es crucial para varias enfermedades humanas, como las cardiovasculares, neurodegenerativas, tumorales, virales, inmunológicas, metabólicas y respiratorias, entre otras. Por lo tanto, encontrar biomarcadores que ayuden con el diagnóstico precoz podría tener efectos beneficiosos para el desarrollo de fármacos y otras investigaciones terapéuticas. Del mismo modo, los biomarcadores que muestran reversibilidad de los efectos nocivos en respuesta al tratamiento podrían ayudar a detectar con prontitud el éxito o fracaso de éste.

CONFLICTO DE INTERÉS

Los autores declaran no poseer conflictos de interés.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el financiamiento de los Proyectos FONDOCYT 2012-2013-2A1-58 (República Dominicana) y FONDECYT 1130601 (Chile).

REFERENCIAS

- Adegoke O, Forbes PB (2015) Challenges and advances in quantum dot fluorescent probes to detect oxygen and nitrogen species: a review. *Anal Chim Acta* 862: 1-13.
- Ahmad R, Tripathi AK, Tripathi P, Singh S, Singh R, Singh RK (2008) Malondialdehyde and protein carbonyl as biomarkers for oxidative stress and disease progression in patients with chronic myeloid leukemia. *In Vivo* 22(4): 525-528.
- Albertini R, Abuja PM (1998) Monitoring of low density lipoprotein oxidation by low-level chemiluminescence. *Free Radic Res* 29: 75-83.
- Amano F, Noda T (1995) Improved detection of nitric oxide radical (NO) production in an activated macrophage culture with a radical scavenger, carboxy PTIO and Griess reagent. *FEBS Lett* 368: 425-428.
- Aupperle KR, Bennett BL, Boyle DL, Tak PP, Manning AM, Firestein GS (1999) NF- κ B regulation by I κ B kinase in primary fibroblast-like synoviocytes. *J Immunol* 163: 427-433.
- Baldwin AS, Jr. (1996) The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol* 14: 649-683.
- Baldwin AS, Jr. (2001) The transcription factor NF- κ B and human disease. *J Clin Invest* 107: 3-6.
- Balligand JL, Ungureanu-longrois D, Simmons WW, Pimental D, Malinski TA, Kapturczak M (1994) Cytokine-inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression in cardiac myocytes. *J Biol Chem* 269: 27580-27588.
- Bashkatova VG, Rayevsky KS (1998) Nitric oxide in mechanisms of brain damage induced by neurotoxic effect of glutamate. *Biochemistry (Mosc)* 63: 866-1020.
- Benzie IFF, Strain JJ (1999) Ferric reducing/antioxidant power assay: Direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurements of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Methods Enzymol* 299: 15-27.
- Berry EM, Kohen R (1999) Is the biological antioxidant system integrated and regulated? *Med Hypoth* 53: 397-401.
- Biaglow JE, Manevich Y, Uckum F, Held KD (1997) Quantitation of hydroxyl radicals produced by radiation and copper-linked oxidation of ascorbate by 2-deoxy-D-ribose method. *Free Radic Biol Med* 22: 1129-1138.
- Biomarkers Definitions Working Group (2001) Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther* 69: 89-95.
- Blanco-García FJ, de Toro FJ, Fernández FG (2005) El óxido nítrico y el cartilago articular. *Rev Esp Reumatol* 32: 126-133.
- Brown NC, Andrezza AC, Young LT (2014) An updated meta-analysis of oxidative stress markers in bipolar disorder. *Psychiatry Res* 218(1-2): 61-68.
- Butterfield DA (2002) Amyloid β -peptide(1-42)-induced oxidative stress and neurotoxicity: implications for neurodegeneration in Alzheimer's disease brain [Review]. *Free Radic Res* 36: 1307-1313.
- Carini M, Aldini G, Facino RM (2004) Mass spectrometry for detection of 4-hydroxy-trans-2-nonenal (HNE) adducts with peptides and proteins [Review]. *Mass Spectrom Rev* 23: 281-305.
- Carvalho LF, Abrão MS, Biscotti C, Sharma R, Nutter B, Falcone T (2013) Oxidative cell injury as a predictor of endometriosis progression. *Reprod Sci* 20(6): 688-698.
- Chun KS, Surh YJ (2004) Signal transduction pathways regulating cyclooxygenase-2 expression: potential molecular targets for chemoprevention. *Biochem Pharmacol* 68: 1089-1100.
- Clancy RM, Amin AR, Abramson SB (1998) The role of nitric oxide in inflammation and immunity. *Arthritis Rheum* 41: 1141-1151.
- Clough GF (1999) Role of nitric oxide in the regulation of microvascular perfusion in human skin *in vivo*. *J Physiol (Lond)* 516: 549-557.
- Cochemé HM, Logan A, Prime TA, Abakumova I, Quin C, McQuaker SJ, Patel JV, Fearnley IM, James AM, Porteous CM, Smith RA, Hartley RC, Partridge L, Murphy MP (2012) Using the mitochondria-targeted ratiometric mass spectrometry probe MitoB to measure H₂O₂ in living *Drosophila*. *Nat Protoc* 7: 946-958.
- Cochemé HM, Quin C, McQuaker SJ, Cabreiro F, Logan A, Prime TA, Abakumova I, Patel JV, Fearnley IM, James AM, Porteous CM, Smith RA, Saeed S, Carre JE, Singer M, Gems D, Hartley RC, Partridge L, Murphy MP (2011) Measurement of H₂O₂ within living *Drosophila* during aging using a ratiometric mass spectrometry probe targeted to the mitochondrial matrix. *Cell Metab* 13: 340-350.
- Dalle-Donne I, Giustarini D, Colombo R, Rossi R, Milzani A (2003) Protein carbonylation in human diseases [Review]. *Trends Mol Med* 9: 169-176.
- Dalle-Donne I, Rossi R, Colombo R, Giustarini D, Milzani A (2006) Biomarkers of oxidative damage in human disease. *Clin Chem* 52: 601-623.
- Davis KL, Martin E, Turko IV and Murad F (2001) Novel effects of nitric oxide. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 41: 203-236.
- de Sousa RT, Zarate CA Jr, Zanetti MV, Costa AC, Talib LL, Gattaz WF, Machado-Vieira R (2014) Oxidative stress in early stage bipolar disorder and the association with response to lithium. *J Psychiatr Res* 50:36-41.
- Deng R, Hua X, Li J, Chi W, Zhang Z, Lu F, Zhang L, Pflugfelder SC, Li DQ (2015) Oxidative stress markers induced by hyperosmolarity in primary human corneal epithelial cells. *PLoS One* 10(5): e0126561.
- Dubois RN, Abramson SB, Crofford L, Gupta RA, Simon LS, Van De Putte LB, Lipsky PE (1998) Cyclooxygenase in biology and disease. *FASEB J* 12: 1063-1073.
- Duncan MW (2003) A review of approaches to the analysis of 3-nitrotyrosine. *Amino Acids* 25: 351-361. 112.
- Enomoto A, Itoh K, Nagayoshi E, Haruta J, Kimura T, O'Connor T, Harada T, Yamamoto M (2001) High sensitivity of Nrf2 knockout mice to acetaminophen hepatotoxicity associated with decreased expression of ARE regulated drug metabolizing enzymes and antioxidant genes. *Toxicol Sci* 59: 169-177.
- Esterbauer H (1996) Estimation of peroxidative damage. A critical review. *Pathol Biol* 44: 25-28.

- Fairbairn DW, Olive PL, O'Neill KL (1995) The comet assay: A comprehensive review. *Mutat Res* 339: 37-59.
- Fang J, Akaike T, Maeda H (2004) Antiapoptotic role of heme oxygenase (HO) and the potential of HO as a target in anticancer treatment. *Apoptosis* 9: 27-35.
- Ferris CD, Jaffrey SR, Sawa A, Takahashi M, Brady SD, Barrow RK, Tysoe SA, Wolosker H, Baranano DE, Dore S, Poss KD, Snyder SH (1999) Haem oxygenase-1 prevents cell death by regulating cellular iron. *Nat Cell Biol* 1: 152-157.
- Ferro E, Visalli G, Civa R, La Rosa MA, Randazzo Papa G, Baluce B, D'Ascola DG, Piraino B, Salpietro C, Di Pietro A (2012) Oxidative damage and genotoxicity biomarkers in transfused and untransfused thalassemic subjects. *Free Radic Biol Med* 53(10): 1829-1837.
- Flatow J, Buckley P, Miller BJ (2013) Meta-analysis of oxidative stress in schizophrenia. *Biol Psychiatr* 74(6): 400-409.
- Fletcher ME, Boshier PR, Wakabayashi K, Keun HC, Smolenski RT, Kirkham PA, Adcock IM, Barton PJ, Takata M, Marczin N (2015) Influence of glutathione-S-transferase (GST) inhibition on lung epithelial cell injury: role of oxidative stress and metabolism. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 308(12): L1274-L1285.
- Fredenburgh LE, Merz AA, Cheng S (2015) Haeme oxygenase signalling pathway: implications for cardiovascular disease. *Eur Heart J* 36(24): 1512-1518.
- Frustaci A, Neri M, Cesario A, Adams JB, Domenici E, Dalla Bernardina B, Bonassi S (2012) Oxidative stress-related biomarkers in autism: systematic review and meta-analyses. *Free Radic Biol Med* 52(10): 2128-2141.
- Fulop T, Pawelec G, Dupuis G, Kotb R, Friguet B, Larbi A (2015) Immunosenescence, oxidative stress, and cancers. In: Rezaei N (ed.), *Cancer Immunology: A Translational Medicine Context*. Berlin Heidelberg; Springer, pp 377-393.
- Gimenez-Garzó C, Urios A, Agustí A, González-López O, Escudero-García D, Escudero-Sanchis A, Serra MA, Giner-Durán R, Montoliu C, Felipe V (2015) Is cognitive impairment in cirrhotic patients due to increased peroxynitrite and oxidative stress? *Antioxid Redox Signal* 22(10):871-877.
- Gomes CM, Santos R (2013) Neurodegeneration in Friedreich's ataxia: from defective frataxin to oxidative stress. *Oxid Med Cell Longev* 2013: 487534.
- González-Murillo Á, Fernández L, Baena S, Melen GJ, Sánchez R, Sánchez-Valdepeñas C, Segovia JC, Liou HC, Schmid R, Madero L, Fresno M, Ramírez M (2015) The NF-KB inducing kinase modulates hematopoiesis during stress. *Stem Cells* doi: 10.1002/stem.2066.
- Gray SP, Di Marco E, Okabe J, Szyndralewicz C, Heitz F, Montezano AC, de Haan JB, Koulis C, El-Osta A, Andrews KL, Chin-Dusting JP, Touyz RM, Wingler K, Cooper ME, Schmidt HH, Jandeleit-Dahm KA (2013) NADPH oxidase 1 plays a key role in diabetes mellitus-accelerated atherosclerosis. *Circulation* 127(18): 1888-18902.
- Groeneveld PH, Kwappenberg KM, Langermans JA, Nibbering PH, Curtis L (1997) Relation between pro- and anti-inflammatory cytokines and the production of nitric oxide (NO) in severe sepsis. *Cytokine* 9: 138-142.
- Halliwell B, Gutteridge JM (1999) *Free Radicals in Biology and Medicine*, third edition. Midsomer Norton, Avon, England: Oxford University Press.
- Halliwell B, Kaur H (1997) Hydroxylation of salicylate and phenylalanine as assays for hydroxyl radicals: A cautionary note visited for the third time. *Free Radic Res* 27: 239-244.
- Hammer C, Braun E (1988). Quantification of age pigments (lipofuscin). *Comp Biochem Physiol* 90: 7-17.
- Han ZN, Boyle DL, Manning AM and Firestein GS (1998) AP-1 and NF-kappa B regulation in rheumatoid arthritis and murine collagen-induced arthritis. *Autoimmunity* 28: 197-208.
- Henderson CJ, McLaren AW, Moffat GJ, Bacon EJ, Wolf CR (1998) Pi-class glutathione S-transferase: Regulation and function. *Chem Biol Interact* 111-112: 69-82.
- Ito T, Fujita H, Tani T, Ohte N (2015) Malondialdehyde-modified low-density lipoprotein is a predictor of cardiac events in patients with stable angina on lipid-lowering therapy after percutaneous coronary intervention using drug-eluting stent. *Atherosclerosis* 239(2): 311-317.
- Iwasaki T, Terrill J, Shavlakadze T, Grounds MD, Arthur PG (2013) Visualizing and quantifying oxidized protein thiols in tissue sections: a comparison of dystrophic mdx and normal skeletal mouse muscles. *Free Radic Biol Med* 65: 1408-1416.
- Jammes Y, Steinberg JG, Delliaux S (2012) Chronic fatigue syndrome: acute infection and history of physical activity affect resting levels and response to exercise of plasma oxidant/antioxidant status and heat shock proteins. *J Intern Med* 272(1): 74-84.
- Janssen LJ (2001) Isoprostanes: an overview and putative roles in pulmonary pathophysiology [Review]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 280: L1067-L1082.
- Kalyanaraman B, Darley-Usmar V, Davies KJA, Dennery PA, Forman HJ, Grisham MB, Mann GE, Moore K, Roberts LJ, Ischiropoulos H (2012) Measuring reactive oxygen and nitrogen species in the fluorescent probes: challenges and limitations. *Free Rad Biol* 52(1): 1-6.
- Karin M, Ben-Neriah Y (2000) Phosphorylation meets ubiquitination: The control of NF-κB activity. *Ann Rev Immunol* 18: 621-663.
- Kilgour J, Roberts R (2014) Pathophysiological roles of reactive oxygen and nitrogen species. In: Leher (ed.), *Systems Biology of Free Radicals and Antioxidants*. Berlin: Springer-Verlag Heidelberg, pp 171-206.
- Kim KS, Lee D, Song CG, Kang PM (2015) Reactive oxygen species-activated nanomaterials as theranostic agents [Review]. *Nanomedicine* 10 (17): 2709-2723.
- Kohen R, Nyska A (2002) Oxidation of biological systems: Oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicol Pathol* 30: 620-650.
- Kohen R, Tirosh O, Gorodetzky R (1992) The biological reductive capacity of tissues is decreased following exposure to oxidative stress: A cyclic voltammetry study of irradiated rats. *Free Radic Res Commun* 17: 239-248.
- Kroese LJ, Scheffer PG (2014) 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine and cardiovascular disease: a systematic review. *Curr Atheroscler Rep* 16(11): 452.

- Kutham H, Ullrich V, Estabrook RW (1982) A quantitative test for superoxide radicals produced in biological systems. *Biochem J* 203: 551-558.
- Laher I (2014) *Systems Biology of Free Radicals and Antioxidants*, 1st edn. Berlin: Springer-Verlag Heidelberg.
- Leonard N, Bishop AE, Polak JM, Talbot IC (1998) Expression of nitric oxide synthase in inflammatory bowel disease is not affected by corticosteroid treatment. *J Clin Pathol* 51: 750-753.
- Levine RL, Wehr N, Wikkiams JA, Stadtman ER, Shacter E (2000) Determination of carbonyl groups in oxidized proteins. *Methods Mol Biol* 99: 15-24.
- Li J, Billiar TR (1999) Determinants of nitric oxide protection and toxicity in liver. *Am J Physiol* 276: G1069-G1073.
- Li YH, Shoi SJ, Kim A, Kim CH, Ji JD, Song GG (2000) Expression of cyclooxygenase-1 and -2 in rheumatoid arthritis synovium. *J Korean Med Sci* 15: 88-92.
- Lissi E, Salim-Hanna M, Pascual C, del Castillo MD (1995) Evaluation of total antioxidant potential (TRAP) and total antioxidant reactivity from luminol-enhanced chemiluminescence measurements. *Free Radic Biol Med* 18: 153-158.
- Logan A, Cochemé HM, Li Pun PB, Apostolova N, Smith RA, Larsen L, Larsen DS, James AM, Fearnley IM, Rogatti S, Prime TA, Finichiu PG, Dare A, Chouchani ET, Pell VR, Methner C, Quin C, McQuaker SJ, Krieg T, Hartley RC, Murphy MP (2014) Using exomarkers to assess mitochondrial reactive species *in vivo* [Review]. *Biochim Biophys Acta* 1840(2): 923-930.
- Lowe F (2014) Biomarkers of oxidative stress. In: Leher (ed.), *Systems Biology of Free Radicals and Antioxidants*. Berlin: Springer-Verlag Heidelberg, pp 65-87.
- Maeda H, Akaike T (1998) Nitric oxide and oxygen radicals in infection, inflammation, and cancer. *Biochemistry (Mosc)* 63: 854-1007.
- Maes M, Mihaylova I, Kubera M, Uytterhoeven M, Vrydags N, Bosmans E (2009) Increased 8-hydroxy-deoxyguanosine, a marker of oxidative damage to DNA, in major depression and myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome. *Neuroendocrinol Lett* 30(6): 715-722.
- Marco ED, Jha JC, Sharma A, Wilkinson-Berka JL, Jandeleit-Dahm KA, de Haan JB (2015) Are reactive oxygen species still the basis for diabetic complications? *Clin Sci (Lond)* 129(2): 199-216.
- Marczin N, El-Habashi N, Hoare GS, Bundy RE, Yacoub M (2003) Antioxidants in myocardial ischemia-reperfusion injury: therapeutic potential and basic mechanisms. *Arch Biochem Biophys* 420: 222-236.
- Matera MG (1998) Nitric oxide and airways. *Pulm Pharmacol Ther* 11: 341-348.
- Maxwell AJ, Cooke JP (1999) The role of nitric oxide in atherosclerosis. *Coron Artery Dis* 10: 277-286.
- Miagkov AV, Kovalenko DV, Brown CE, Didsury JR, Cogswell JP, Stimpson SA, Baldwin AS, Makarov SS (1998) NF-kappa B activation provides the potential link between inflammation and hyperplasia in the arthritic joint. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 13859-13864.
- Miller E, Walczak A, Majsterek I, Kędziora J (2013) Melatonin reduces oxidative stress in the erythrocytes of multiple sclerosis patients with secondary progressive clinical course. *J Neuroimmunol* 257(1-2): 97-101.
- Miura Y, Ozawa T (2000) Non-invasive study of radiation-induced oxidative damage using *in vivo* Electron Spin Resonance. *Free Radic Biol Med* 28: 854-859.
- Moncada S (1992) The L-arginine: nitric oxide pathway. *Acta Physiol Scand* 145: 201-227.
- Montezano AC, Dulak-Lis M, Tsiropoulou S, Harvey A, Briones AM, Touyz RM (2015) Oxidative stress and human hypertension: vascular mechanisms, biomarkers, and novel therapies. *Can J Cardiol* 31(5): 631-641.
- Montine TJ, Montine KS, McMahan W, Markesbery WR, Quinn JF, Morrow JD (2005) F2-Isoprostanes in Alzheimer and other neurodegenerative diseases [Review]. *Antioxid Redox Signal* 7: 269-275.
- Morrow JD (2005) Quantification of isoprostanes as indices of oxidant stress and the risk of atherosclerosis in humans [Review]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25: 279-286.
- Motchnik PA, Frei B, Ames BN (1994) Measurement of antioxidants in human blood plasma. *Methods Enzymol* 234: 269-279.
- Moylan S, Berk M, Dean OM, Samuni Y, Williams LJ, O'Neil A, Hayley AC, Pasco JA, Anderson G, Jacka FN, Maes M (2014) Oxidative & nitrosative stress in depression: why so much stress? [Review]. *Neurosci Biobehav Rev* 45: 46-62.
- Möller M, Swanepoel T, Harvey BH (2015) Neurodevelopmental animal models reveal the convergent role of neurotransmitter systems, inflammation, and oxidative stress as biomarkers of schizophrenia: Implications for novel drug development [Review]. *ACS Chem Neurosci* 6(7): 987-1016.
- Namazi MR (2006) Possible molecular mechanisms involved in the down-regulation of expression and activity of inducible nitric oxide synthase in the psoriatic lesions. *Indian J Dermatol* 51: 194-195.
- Niki E (2014) Biomarkers of lipid peroxidation in clinical material [Review]. *Biochim Biophys Acta* 1840(2): 809-817.
- Osowski CM (2015) *Stress Responses: Methods and Protocols*. New York: Springer Science+Business Media.
- Pagano G, Talamanca AA, Castello G, d'Ischia M, Pallardó FV, Petrović S, Porto B, Tiano L, Zatterale A, Pagano G (2013) From clinical description, to *in vitro* and animal studies, and backward to patients: oxidative stress and mitochondrial dysfunction in Fanconi anemia. *Free Radic Biol Med* 58: 118-125.
- Parola M, Bellomo G, Robino G, Barrera G, Dianzani MU (1999) 4-Hydroxynonenal as a biological signal: molecular basis and pathophysiological implications [Review]. *Antioxid Redox Signal* 1: 255-284.
- Pastore A, Federici G, Bertini E, Piemonte F (2003) Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification [Review]. *Clin Chim Acta* 333: 19-39.
- Pérez-Gallardo RV, Noriega-Cisneros R, Esquivel-Gutiérrez E, Calderón-Cortés E, Cortés-Rojo C, Manzo-Avalos S, Campos-García J, Salgado-Garciglia R, Montoya-Pérez R, Boldogh I, Saavedra-Molina A (2014) Effects of diabetes on oxidative and nitrosative stress in kidney mitochondria from aged rats. *J Bioenerg Biomembr* 46(6): 511-518.

- Polidori MC, Stahl W, Eichler O, Niestroj I, Sies H (2001) Profiles of antioxidants in human plasma. *Free Radic Biol Med* 30: 456-462.
- Prester T, Talalay P (1995) Electrophile and antioxidant regulation of enzymes that detoxify carcinogens. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 8965-8969.
- Prior RL, Cao G (1999) *In vivo* total antioxidant capacity: Comparison of different analytical methods. *Free Radic Biol Med* 27: 1173-1181.
- Porteous CM, Logan A, Evans C, Ledgerwood EC, Menon DK, Aigbirhio F, Smith RA, Murphy MP (2010) Rapid uptake of lipophilic triphenylphosphonium cations by mitochondria *in vivo* following intravenous injection: implications for mitochondria-specific therapies and probes. *Biochim Biophys Acta* 1800(9): 1009-1017.
- Pryor WA, Godber S (1991) Non-invasive measures of oxidative stress in human medicine. *Free Radic Biol Med* 10: 177-184.
- Ramachandra N, Rodriguez L, Devaraj S (2015) Urinary biomarkers of oxidative stress and insulin resistance in childhood obesity. *FASEB J* 29(1 suppl): 927.2.
- Ramirez DC, Gomez-Mejiba SE, Mason RP (2006) Immunospin trapping of DNA radicals. *Nat Methods* 3(2): 123-127.
- Ramirez DC, Gomez-Mejiba SE, Mason RP (2007) Immunospin trapping analyses of DNA radicals. *Nat Protoc* 2(3): 512-522.
- Rice-Evans CA, Miller NJ (1994) Total antioxidant status in plasma and body fluids. *Methods Enzymol* 234: 279-293.
- Rioux N, Castonguay A (1998) Prevention of NNK-induced lung tumorigenesis in A/J mice by acetylsalicylic acid and NS-398. *Cancer Res* 58: 5354-5360.
- Rojas A, Padrón J, Caveda, Palacios M, Moncada S (1993) Role of nitric oxide pathway in the protection against lethal endotoxemia afforded by low doses of lipopolysaccharide. *Biochem Biophys Res Commun* 191:441-446.
- Rose S, Melnyk S, Trusty TA, Pavliv O, Seidel L, Li J, Nick T, James SJ (2012) Intracellular and extracellular redox status and free radical generation in primary immune cells from children with autism. *Autism Res Treat* 2012:986519.
- Salvemini D, Seibert K, Marino MH (1996) PG release, as a consequence of NO-driven COX activation contributes to the proinflammatory effects of NO. *Drugs News Perspect* 4: 204-219.
- Sánchez C, Rodeiro I, Garrido G, Delgado R (2005) Hemo-Oxigenasa 1: un promisorio blanco terapéutico. *Acta Farm Bonaerense* 24: 619-626.
- Sanders SP (1999) Nitric oxide in asthma. Pathogenic, therapeutic, or diagnostic? *Am J Resp Cell Mol Biol* 21: 147-149.
- Santos R, Lefevre S, Sliwa D, Seguin A, Camadro JM, Lesuisse E (2010) Friedreich ataxia: molecular mechanisms, redox considerations, and therapeutic opportunities [Review]. *Antioxid Redox Signal* 13(5): 651-690.
- Santulli P, Chouzenoux S, Fiorese M, Marcellin L, Lemarechal H, Millischer AE, Batteux F, Borderie D, Chapron C (2014) Protein oxidative stress markers in peritoneal fluids of women with deep infiltrating endometriosis are increased. *Human Reprod* 30(1): 49-60.
- Schaffer MR, Tantry U, Thornton FJ, Barul A (1999) Inhibition of nitric oxide synthesis in wounds: pharmacology and effect on accumulation of collagen in wounds in mice. *Eur J Surg* 165: 262-267.
- Shah D, Mahajan N, Sah S, Nath SK, Paudyal B (2014) Oxidative stress and its biomarkers in systemic lupus erythematosus. *J Biomed Sci* 21: 23.
- Sharma S, Saxena S, Srivastav K, Shukla RK, Mishra N, Meyer CH, Kruzliak P, Khanna VK (2015) Nitric oxide and oxidative stress is associated with severity of diabetic retinopathy and retinal structural alterations. *Clin Experiment Ophthalmol* 43(5): 429-436.
- Sengupta S (1999) Cyclooxygenase-2: A new therapeutic target. *Indian J Pharmacol* 31: 322-332.
- Seet RC, Lee CY, Lim EC, Tan JJ, Quek AM, Chong WL, Looi WF, Huang SH, Wang H, Chan YH, Halliwell B (2010) Oxidative damage in Parkinson disease: Measurement using accurate biomarkers. *Free Radic Biol Med* 48(4): 560-566.
- Shichiri M (2014) The role of lipid peroxidation in neurological disorders [Review]. *J Clin Biochem Nutr* 54(3): 151-160.
- Shishehbor MH, Hazen SL (2004) Antioxidant studies need a change of direction. *Clev J Clin Med* 71(4): 285-288.
- Singh RK, Tripathi AK, Tripathi P, Singh S, Singh R, Ahmad R (2009) Studies on biomarkers for oxidative stress in patients with chronic myeloid leukemia. *Hematol Oncol Stem Cell Ther* 2(1): 285-288.
- Skoog DA, West DM, Holler FJ (1988) An introduction to electrochemistry. In: *Fundamentals of Analytical Chemistry*, 7th edition. Saunders College Publishing, New York, pp. 303-329.
- Sodum RS, Chung FL (1989) Structural characterization of adducts formed in the reaction of 2,3-epoxy-4-hydroxynonane I with deoxyguanosine. *Chem Res Toxicol* 2: 23-28.
- Stocker R, Keaney JF Jr. (2004) Role of oxidative modifications in atherosclerosis [Review]. *Physiol Rev* 84: 1381-1478.
- Sutherland JC, Monteleone DC, Trunk JG, Bennett PV, Sutherland BM (2001) Quantifying DNA damage by gel electrophoresis, electronic imaging and number-average length analysis. *Electrophoresis* 22: 843-854.
- Taylor BS, de Vera ME, Ganster RW, Wang O, Shapiro RA, Morris SM Jr, Billiar TR, Geller DA (1998) Multiple NF-kappa B enhancer elements regulate cytokine induction of the human inducible nitric oxide synthase gene. *J Biol Chem* 273: 15148-15156.
- Terrill JR, Radley-Crabb HG, Iwasaki T, Lemckert FA, Arthur PG, Grounds MD (2013) Oxidative stress and pathology in muscular dystrophies: focus on protein thiol oxidation and dysferlinopathies. *FEBS J* 280(17): 4149-4164.
- Tetik S, Kiliç A, Aksoy H, Rizaner N, Ahmad S, Yardimci T (2015) Oxidative stress causes plasma protein modification. *Indian J Exp Biol* 53(1): 25-30.
- Tiano L, Busciglio J (2011) Mitochondrial dysfunction and Down's syndrome: is there a role for coenzyme Q(10)? [Review]. *Biofactors* 37(5): 386-392.
- Tiano L, Padella L, Santoro L, Carnevali P, Principi F, Brugè F, Gabrielli O, Littarru GP (2012) Prolonged coenzyme Q10

- treatment in Down syndrome patients: effect on DNA oxidation. *Neurobiol Aging* 33(3): 626.e1-8.
- Toyokuni S (1999) Reactive oxygen species-induced molecular damage and its application in pathology. *Pathol Int* 49: 91-102.
- Tsikis D, Caidahl K (2005) Recent methodological advances in the mass spectrometric analysis of free and protein-associated 3-nitrotyrosine in human plasma [Review]. *J Chromatogr B* 814: 1-9.
- Tsikis D, Mitschke A, Suchy MT, Gutzki FM, Stichtenoth DO (2005) Determination of 3-nitrotyrosine in human urine at the basal state by gas chromatography-tandem mass spectrometry and evaluation of the excretion after oral intake. *J Chromatogr B* 827:146-156.
- Turini ME, DuBois RN (2002) Cyclooxygenase-2: a therapeutic target. *Annu Rev Med* 53: 35-57.
- Uchida K (2003) 4-Hydroxy-2-nonenal: a product and mediator of oxidative stress [Review]. *Prog Lipid Res* 42: 318-343.
- Valencia A, Sapp E, Kimm JS, McClory H, Reeves PB, Alexander J, Ansong KA, Masso N, Frosch MP, Kegel KB, Li X, DiFiglia M (2013) Elevated NADPH oxidase activity contributes to oxidative stress and cell death in Huntington's disease. *Hum Mol Genet* 22(6): 1112-1131.
- van 't Erve TJ, Lih FB, Kadiiska MB, Deterding LJ, Eling TE, Mason RP(2015) Reinterpreting the best biomarker of oxidative stress: The 8-iso-PGF₂α/PGF₂α ratio distinguishes chemical from enzymatic lipid peroxidation. *Free Radic Biol Med* 83: 245-251.
- Winczura A, Zdżalik D, Tudek B (2012) Damage of DNA and proteins by major lipid peroxidation products in genome stability. *Free Radic Res* 46(4): 442-459.
- Winterburn CC (2014) The challenges of using fluorescent probes to detect and quantify specific reactive oxygen species in living cells. *Biochim Biophys Acta* 1840(2): 730-738.
- Zhang Y, Chen SY, Hsu T, Santella RM (2002) Immunohistochemical detection of malondialdehyde-DNA adducts in human oral mucosa cells. *Carcinogenesis* 23: 207-211.
- Zhang ZJ (2013) Systematic review on the association between F₂-isoprostanes and cardiovascular disease. *Ann Clin Biochem* 50(Pt 2): 108-114.
- Zielonka J, Sikora A, Hardy M, Joseph J, Dranka BP, Kalyanaraman B (2012) Boronate probes as diagnostic tools for real time monitoring of peroxynitrite and hydroperoxides. *Chem Res Toxicol* 25: 1793-1799.
- Zimmermann KC, Sarbia M, Weber AA, Borchard F, Gabbert HE, Schror K (1999) Cyclooxygenase-2 expression in human esophageal carcinoma. *Cancer Res* 59: 198-204.
-