

Toxicidad de xenobióticos mediada por radicales libres de oxígeno

Xenobiotic toxicity mediated by oxygen free radicals

MARTÍNEZ-CAYUELA, M.

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Polígono Universitario de Cartuja, s/n.
Universidad de Granada. Granada 18071. España.
(Email:marina@platon.ugr.es)

RESUMEN

La toxicidad de muchos xenobióticos está mediada por la formación de radicales libres de oxígeno. Estos xenobióticos son reducidos por un electrón produciendo especies químicas que reaccionan con el oxígeno molecular (O_2) para dar lugar a radicales anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) y regenerar la molécula original. De este modo se crea un ciclo redox que implica un gran consumo de O_2 y de equivalentes redox, principalmente en forma de NADPH. Los radicales libres producidos durante este ciclo redox, así como las especies reactivas derivadas de él, serían los responsables del daño celular causado por dichos xenobióticos.

Palabras clave: ciclo redox, radicales libres de oxígeno, toxicidad de xenobióticos.

ABSTRACT

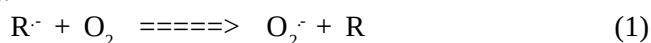
Toxicity of many xenobiotics is mediated by oxygen free radical production. These xenobiotics are reduced in one-electron reactions to give rise to chemical species which react with molecular oxygen (O_2) producing superoxide anion radicals ($O_2^{\cdot-}$) and regenerating the original molecule. In this way, a redox cycling is formed involving disproportionate consumption of O_2 and redox equivalents, mainly NADPH. Radicals produced during this redox cycling, and their derivative structures, would be responsible for the cellular damage caused by such xenobiotics.

Key words: redox cycling, oxygen free radicals, xenobiotic toxicity.

INTRODUCCIÓN

La formación de radicales libres está implicada en la toxicidad de un amplio rango de xenobióticos. Realmente muchos compuestos químicos para ejercer su acción tóxica requieren una activación metabólica a intermediarios reactivos que pueden ser radicales libres (Halliwell y Gutteridge 1989, Mason 1982, Proctor y Reynolds 1984).

La activación de muchos xenobióticos a intermediarios radicales se puede realizar por mecanismos enzimáticos y no enzimáticos. Por ejemplo, el ácido dialúrico y la 6-hidroxidopamina, debido a sus estructuras químicas, pueden sufrir autooxidación hasta intermediarios radicales semiquinona (Trush et al. 1982). Los iones metálicos facilitan esta autooxidación mientras que los agentes reductores la dificultan. De la sulfanilamida, un fármaco antibacteriano, y de la clorpromazina, un antipsicótico, también se pueden formar radicales libres cuando se fotoactivan por la luz ultravioleta (Chignell et al. 1985, Mason 1982). Sin embargo, la mayor parte de los compuestos se activan por una vía catalizada enzimáticamente. Distintas reductasas están implicadas en la activación de xenobióticos a radicales libres (Kappus 1986). En cualquier caso, la especie radical libre ($R^{\cdot}$), formada por captación de un electrón, puede sufrir una reducción adicional y convertirse en un metabolito capaz de interactuar con distintas biomoléculas, o bien, en presencia de oxígeno, puede transferir el electrón al oxígeno molecular, produciendo radical anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) y regenerando la molécula original (R).



La formación de intermediarios radicales libres de muchos compuestos químicos está catalizada por la NAD(P)H-citocromo P450 reductasa, una flavoproteína que utiliza NAD(P)H como dador electrónico (Kappus y Sies 1981, Trush et al. 1982). En estos casos, se establece un ciclo redox en el que hay un gran consumo de NAD(P)H y oxígeno y generación de radicales superóxido y otras especies de oxígeno reactivo (Figura 1). Este ciclo redox conduce a una situación de estrés oxidativo y, en casos extremos, a la muerte celular (Sies 1985).

En este trabajo se repasa la química de los radicales libres de oxígeno que son producidos en exceso durante el ciclo redox de muchos xenobióticos. Se analiza también el daño oxidativo que éstos originan en las biomoléculas. Finalmente, se estudia la producción de radicales libres por distintos xenobióticos y cómo estas especies tan reactivas alteran las estructuras celulares.

QUIMICA DE LOS RADICALES LIBRES. RADICALES LIBRES DE OXIGENO

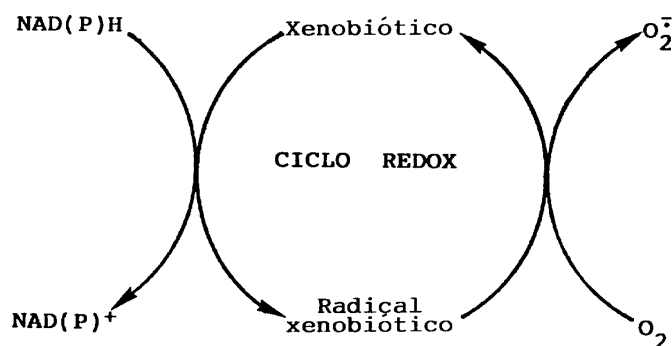


FIGURA 1.- Ciclo redox de xenobióticos.

Un radical libre es una especie química que contiene uno o más electrones desapareados en sus orbitales externos. Un compuesto puede convertirse en radical libre captando o perdiendo un electrón. Asimismo, radicales libres también pueden formarse cuando un enlace covalente se rompe y cada electrón de la pareja compartida permanece en un átomo (fisión homolítica). Como consecuencia de poseer electrones desapareados, estas especies químicas son extremadamente reactivas, tienen, por tanto, una vida media corta y su concentración en el estado estacionario es baja (Armstrong et al. 1984, Cadenas 1989, Pryor 1986, Webster y Nunn 1988).

La molécula de oxígeno, como tal, puede ser calificada de birradical puesto que tiene dos electrones desapareados, cada uno de ellos localizado en un orbital antienlazante π^* . Sin embargo, la reactividad de esta molécula es más baja de la que cabría esperar debido a que los espines de estos dos electrones presentan direcciones paralelas. Para que el oxígeno pudiese oxidar un átomo o molécula que no fuese radical libre aceptando un par de electrones, éstos deberían ser de espines paralelos (Cadenas 1989, Jamieson 1989, Malmström 1982, Webster y Nunn 1988). Según el principio de exclusión de Pauli, los electrones de un orbital atómico o molecular nunca tienen direcciones paralelas, por tanto, para que el oxígeno molecular aumentase su reactividad habría de invertirse el espín de uno de los electrones de sus orbitales externos, o bien, sufrir una reducción secuencial y univalente produciendo radicales libres de oxígeno (figuras 2 y 3).

La inversión de los electrones de los orbitales externos del oxígeno molecular origina dos formas de oxígeno singlete: el oxígeno singlete delta ($^1\Delta_g\text{O}_2$) que, debido a su larga vida media, es

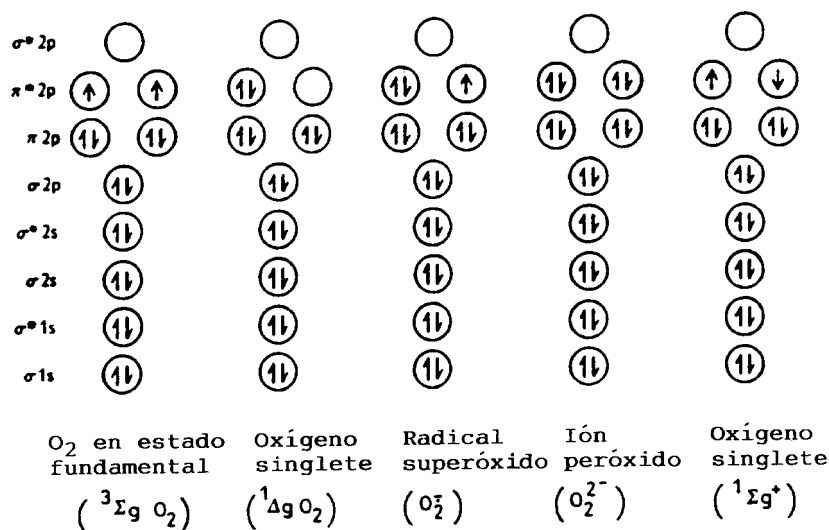


FIGURA 2.- Estados energéticos del oxígeno molecular.

el de mayor importancia biológica, y el oxígeno singlete sigma ($^1\Sigma_g^+$), más reactivo que el anterior pero de corta vida media porque rápidamente decae al estado delta (Cadenas 1989, Proctor y Reynolds 1984, Webster y Nunn 1988).

Cuando un único electrón reduce la molécula de oxígeno se produce el ión radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$). Esta es una especie química muy reactiva pero inestable en soluciones acuosas, ya que reacciona

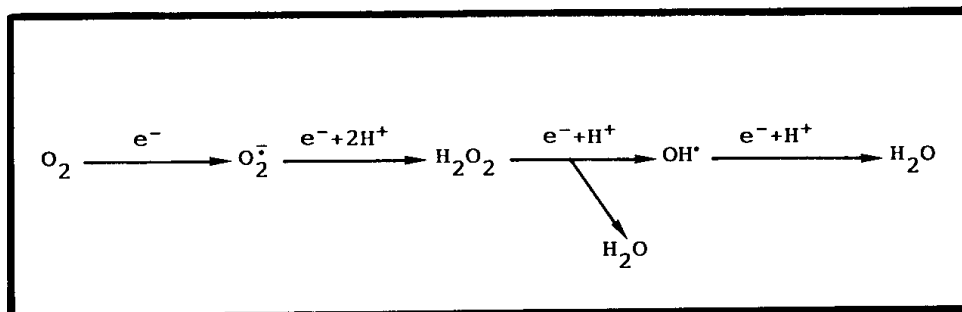
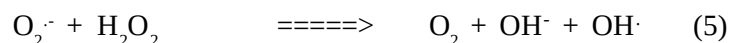
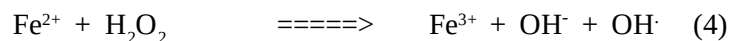
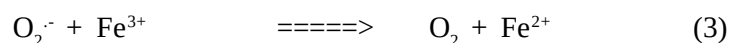
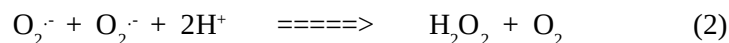


FIGURA 3.- Reducción secuencial y univalente del oxígeno molecular.

consigo misma mediante una reacción de dismutación (ecuación 2) (Cadenas 1989, Fridovich 1983). Si son dos los electrones que se incorporan a la molécula de oxígeno se forma el ión peróxido (O_2^{2-}), cuya forma protonada es el peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Este compuesto es peligroso para las células porque es un potente oxidante que atraviesa fácilmente las membranas biológicas y del que se puede originar el radical hidroxilo ($OH^{\cdot}$) (Mello-Pilho et al. 1984, Pryor 1986, Pryor y Church 1991). La reducción del oxígeno molecular por tres electrones da lugar al citado radical hidroxilo. Esta especie es una de las más reactivas que se conocen y, por tanto, presenta una vida media y un radio de acción muy cortos (microsegundos y angstroms, respectivamente). Así, un radical hidroxilo formado en la mitocondria será improbable que, por sí mismo, tenga un efecto directo en otras partes de la célula (Pryor 1986). Una fuente importante de radicales hidroxilo es la reacción de Haber-Weiss que es, a su vez, el balance de dos reacciones (ecuaciones 3, 4 y 5) (Halliwell y Gutteridge 1984, Halliwell y Gutteridge 1992, King et al. 1982). Finalmente, la reducción tetravalente del oxígeno molecular origina una molécula de agua.



REACTIVIDAD DE LOS RADICALES LIBRES DE OXIGENO

Como ya he dicho anteriormente, la mayoría de los radicales libres de interés biológico suelen ser extremadamente reactivos e inestables, por lo que tienen un período de vida media muy corto, que se puede medir incluso en fracciones de microsegundo. No obstante, cuando un radical libre reacciona con un compuesto no radical pueden formarse otros radicales libres, de manera que es posible que se creen reacciones en cadena y den lugar a efectos biológicos lejos del sistema que originó el primer radical. Un ejemplo lo constituye la peroxidación de lípidos (Blake et al. 1987, Harman 1992, Pryor 1986, Southorn y Powis 1988, Webster y Nunn 1988).

Las proteínas, los lípidos insaturados, los ácidos nucleicos y los carbohidratos son los blancos fundamentales de las reacciones de los radicales libres. A continuación, describiremos los daños por radicales libres que pueden sufrir estas moléculas.

Proteínas

Las proteínas son modificadas de diferente manera por especies reactivas de oxígeno. Los radicales libres de oxígeno, por ejemplo, pueden reaccionar directamente con el ligando metálico de muchas metaloproteínas. Se ha comprobado que el hierro de la oxihemoglobina puede reaccionar con el radical superóxido o el peróxido de hidrógeno para formar metahemoglobina (Freeman y Grapo 1982). Otra importante hemoproteína citoplasmática, la catalasa, es inhibida por el $\text{O}_2^{\cdot-}$, que la convierte en sus formas inactivas ferroxi y ferrilo (Kono y Fridovich 1982). Por último, el peróxido de hidrógeno, producto de la dismutación del $\text{O}_2^{\cdot-}$, también puede reducir el Cu^{2+} de la superóxido dismutasa CuZn a Cu^{1+} , reaccionando después con él y generando radical hidroxilo. A su vez, este radical hidroxilo ataca un residuo adyacente de histidina del centro activo del enzima, necesario para la actividad catalítica (Hodgson y Fridovich 1975).

Debido a la reactividad de los radicales libres con las moléculas insaturadas o que contienen azufre, las proteínas con proporciones elevadas de triptófano, tirosina, fenilalanina, histidina, metionina y cisteína pueden sufrir modificaciones aminoácidas mediadas por radicales libres. En este sentido, se ha observado que enzimas tales como la papaína, la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa e incluso la superóxido dismutasa, que dependen todas ellas de estos aminoácidos para presentar actividad, se inhiben en presencia de radicales libres. Las reacciones de los radicales libres con estos aminoácidos dan lugar también a alteraciones estructurales en las proteínas provocando entrecruzamientos y fenómenos de agregación, que se ven favorecidos por la formación de puentes disulfuro intra e intermoleculares (Freeman y Grapo 1982, Gebicki y Gebicki 1993, Stadtman 1992, Webster y Nunn 1988, Wolpp et al. 1986).

Los enlaces peptídicos también son susceptibles de ser atacados por los radicales libres. Estos enlaces pueden romperse tras la oxidación de residuos de prolina por radicales hidroxilo o superóxido (Wolff y Dean 1986).

Finalmente, la reacción de los radicales libres con las proteínas también puede generar subproductos que amplificarían el daño inicial. Un ejemplo lo constituye la oxidación del triptófano hasta H_2O_2 y

N-formil kinurenina, un compuesto que, al reaccionar con grupos amino, provoca entrecruzamientos entre proteínas y/o lípidos (Freeman y Grapo 1982, Nielsen 1981, Stadtman 1992).

Lípidos

Los radicales libres hidroxilo e hidroperoxilo y el oxígeno singlete pueden reaccionar con los ácidos grasos de los fosfolípidos y otros componentes lipídicos de las membranas para formar hidroperóxidos lipídicos. (Aikens y Dix 1991, Choe et al. 1995, Choi y Yu 1995, Gutteridge y Halliwell 1990, Halliwell y Gutteridge 1984, Horton y Fairhurst 1987, Niki et al. 1991, Schaich 1992). Este proceso de peroxidación lipídica comienza cuando el radical libre quita un átomo de hidrógeno de uno de los carbonos metilenos de la cadena carbonada para rendir un radical libre lipídico (L[•]). Los ácidos grasos poliinsaturados de membrana son especialmente susceptibles de ser atacados por radicales libres, puesto que contienen grupos metilenos separados por dobles enlaces que debilitan el enlace C-H metileno. Cuando el radical lipídico se origina, sufre inmediatamente un reajuste molecular, produciéndose un dieno conjugado que puede reaccionar con el O₂ y formar un radical hidroperoxilo. Este radical libre da lugar a endoperóxidos, o bien, puede tomar un átomo de hidrógeno de un carbono metileno de otro ácido graso poliinsaturado adyacente para formar, de nuevo, un radical libre lipídico y un hidroperóxido (figura 4). El radical lipídico se combina con otra molécula de oxígeno y así se establece una cadena de propagación del daño peroxidativo. Por su parte, el hidroperóxido, que es un compuesto estable, si entra en contacto con iones metálicos de transición, producirá más radicales libres que iniciarán y propagarán otras reacciones en cadena. Así, las membranas resultan seriamente dañadas y, por tanto, su funcionabilidad se ve alterada (Riceevans y Burton 1993).

Los productos finales del proceso de peroxidación lipídica, entre los que se incluyen hidrocarburos

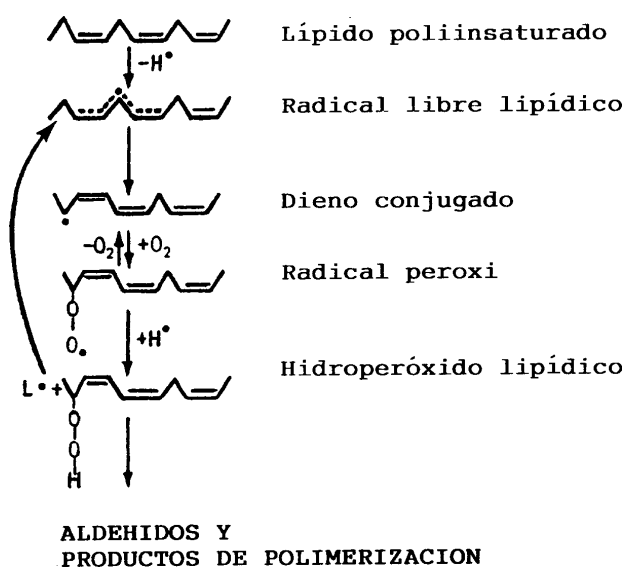


FIGURA 4.- Reacciones de la peroxidación lipídica.

volátiles, alcoholes o aldehídos, pueden difundir lejos del lugar donde se originaron y causar edema celular e influir en la permeabilidad vascular, inflamación y quimiotaxis (Blake et al. 1987, Pryor y

Church 1991, Southorn y Powis 1988). Estos productos pueden también alterar la actividad fosfolipasa e inducir la liberación de ácido araquidónico y la subsecuente formación de prostaglandinas y distintos endoperóxidos (Sevanian et al. 1981).

El malondialdehído, que es otro producto final de la peroxidación de ácidos grasos con tres o más dobles enlaces, puede causar entrecruzamientos y polimerización de distintos componentes de la membrana (Nielsen 1981, Valenzuela 1991). Así pues, las propiedades de las membranas aún resultan más alteradas.

Acidos nucleicos

Los ácidos nucleicos también pueden ser atacados por los radicales libres. Realmente la citotoxicidad de estas especies químicas, en gran parte, es una consecuencia de las aberraciones cromosómicas producidas por las modificaciones químicas que sufren las bases y los azúcares del DNA al reaccionar con los radicales libres, especialmente con el $\text{OH}\cdot$ (Demple y Linn 1982, Harman 1990, Higuchi y Linn 1994, Randerath et al. 1992, Webster y Nunn 1988). Las modificaciones químicas de los nucleótidos provocan, en muchos casos, la ruptura de las hebras del DNA. Si el daño que se origina es tan grande que no puede ser reparado, se produce una mutación, o bien, la célula muere (Cerutti 1985, Davies et al. 1990, Demple 1990, Hoffman et al. 1984, Imlay y Linn 1988). Se ha comprobado, por ejemplo, que la ruptura del DNA que ocurre durante la explosión respiratoria producida por los neutrófilos en respuesta a determinados estímulos, puede causar la muerte de estas células e inducir procesos autoinmunes (Birnboim y Kanabus-Kaminska 1985, Martínez-Cayuela 1995).

Carbohidratos

Los carbohidratos son dañados por los radicales libres en menor proporción que otras moléculas. Azúcares tales como la glucosa, el manitol o ciertos desoxiazúcares pueden reaccionar con el radical $\text{OH}\cdot$ para producir sustancias reactivas (Blake et al. 1987, Sies 1985). Asimismo, los polisacáridos pueden sufrir el ataque de los radicales libres, en este caso, fragmentándose a unidades más sencillas. Greenwald y Moy (1980) han demostrado que el ácido hialurónico se despolimeriza en presencia de concentraciones elevadas de radicales hidroxilo, provocando un descenso de la viscosidad del líquido sinovial de las articulaciones.

A pesar de que los radicales libres son especies extremadamente reactivas, las células disponen de sistemas de protección frente a ellos. De hecho los radicales libres se están produciendo continuamente en el organismo (Freeman y Grapo 1982, Halliwell y Gutteridge 1989), el problema sólo surge cuando hay una sobreproducción o cuando los sistemas antioxidantes están debilitados (para una revisión sobre los sistemas de defensa antioxidante ver Cotgreave et al. 1988, Halliwell et al. 1992, Jacob 1995 y Yu 1994).

XENOBIOTICOS CUYA TOXICIDAD PUEDE SER ATRIBUIDA A LA FORMACION DE RADICALES LIBRES DE OXIGENO

1. Paraquat y Diquat

El paraquat y el diquat son herbicidas bipyridilo ampliamente utilizados en agricultura porque son tóxicos para un gran número de plantas y, a la vez, de fácil eliminación al contacto con la tierra. Ambos herbicidas atraviesan la membrana del cloroplasto y pueden aceptar electrones de ciertas proteínas cloroplastídicas, convirtiéndose en su forma de radical libre. Estos radicales reaccionan con el oxígeno y generan radicales superóxido que, convertidos en peróxido de hidrógeno por la superóxido dismutasa, inactivan enzimas del ciclo de Calvin deteniendo, por tanto, la fijación de CO_2 . La baja concentración

de equivalentes NADPH favorece esta situación. Aunque la inhibición de la fijación de CO_2 es el fenómeno principal que provoca la muerte de las células vegetales tratadas con paraquat o diquat, diversos trabajos han demostrado que la peroxidación lipídica puede contribuir enormemente al daño celular causado por estos herbicidas (Farrington et al. 1973, Halliwell y Gutteridge 1989).

A pesar del uso ventajoso del paraquat en agricultura, el principal problema de su utilización es la toxicidad que presenta para un gran número de especies animales. Se ha comprobado que el pulmón es el órgano que más se afecta por la ingesta de este herbicida (Frank 1981, Southorn y Powis 1988). Así, cuando se ha empleado el paraquat pulverizado para controlar la producción ilícita de marihuana, los individuos que inhalaban el humo de cigarros de esta planta presentaban un importante daño pulmonar, caracterizado por destrucción de las células de revestimiento de los alveólos pulmonares y que, en casos graves, causaba la muerte. Los mecanismos de envenenamiento de humanos y otros animales por el paraquat se cree que están mediados por el radical $\text{O}_2^{\cdot-}$ formado en el ciclo redox del catión piridinil paraquat. La reducción *in vivo* del paraquat, catalizada por la NADPH-citocromo P450 reductasa, genera radicales superóxido que, a su vez, dan lugar a otras especies de oxígeno reactivas. Así, aunque el catión piridinil paraquat pueda reaccionar con distintos componentes celulares, los datos actuales sugieren que es el radical OH $\cdot$, generado en la reacción de Haber-Weiss, la especie responsable del daño al pulmón (Smith 1986). El radical hidroxilo, como se comentó anteriormente, induce peroxidación lipídica que altera la funcionabilidad de la membrana y, por tanto, conduce a la muerte celular.

No obstante, un mecanismo alternativo para explicar la toxicidad del paraquat podría ser que produzca un descenso de los niveles de NADPH, como consecuencia de la activación del ciclo redox del paraquat o de su utilización por la glutathione reductasa para producir glutathione reducido (GSH) empleado en la eliminación de hidroperóxidos lipídicos (Frank 1981, Richmond y Halliwell 1982).

Con respecto al diquat, su forma de actuar es similar a la del paraquat, sin embargo, su efecto nocivo sobre el pulmón es menor. El principal blanco de actuación del diquat es el intestino que se vuelve distendido y con movimientos peristálticos anormales (Levey et al. 1981, Smith 1986).

2. Aminas aromáticas

Se ha comprobado que la exposición prolongada a ciertas aminas aromáticas de uso frecuente en la industria, tiene efectos nocivos para el organismo, en algunos casos, llegando a provocar hemólisis y hasta la aparición de tumores. La base de la toxicidad de estos agentes puede ser la oxidación enzimática monovalente que podrían sufrir, generando radicales libres. Por ejemplo, se ha visto que la peroxidasa está implicada en la oxidación de la N,N-dimetilanilina para dar distintas especies radicales libres (Tabuenca 1981).

3. Dióxido de nitrógeno

El dióxido de nitrógeno es un contaminante de la atmósfera de las grandes ciudades, que se genera en la combustión de los motores. Por sí mismo es un radical libre y, como tal, puede reaccionar con un gran número de moléculas biológicas. Su toxicidad, por tanto, es evidente. Se ha demostrado, por ejemplo, que este compuesto puede captar un átomo de hidrógeno de ácidos grasos poliinsaturados induciendo, de este modo, la peroxidación lipídica de las membranas (Halliwell y Gutteridge 1989, Pryor y Church 1991).

4. Humo del tabaco

El humo del tabaco contiene un gran número de radicales libres y, además, óxido nítrico, que es capaz de reaccionar con el oxígeno y generar dióxido de nitrógeno. Este compuesto reacciona con los hidrocarburos insaturados, presentes en el humo del tabaco, y produce distintos tipos de radicales libres,

junto al radical hidroxilo originado en su reacción con el peróxido de hidrógeno. Todas estas especies reactivas son responsables, al menos en parte, de la toxicidad de este contaminante ambiental (Green 1985, Halliwell y Gutteridge 1989, Roth et al. 1986, Toth et al. 1986).

El radical libre hidroxilo tiene un gran efecto nocivo en el pulmón porque inactiva a la alfa-1-proteasa, que es la principal antiproteasa sérica, responsable de la actividad antielastasa. Si la actividad elastasa no es bloqueada, la elastina del pulmón se degrada. El radical hidroxilo y otros radicales libres se ha demostrado también que favorecen la acumulación de neutrófilos en el pulmón. Los neutrófilos activados generan nuevos radicales libres provocando, por tanto, un daño tisular adicional. El resultado final, en casos extremos, puede llegar a ser la aparición de enfisema pulmonar (Carp et al. 1982, Duthie y Wahle 1990, Hunninghake et al. 1980, Pryor y Dooley 1985).

En distintos trabajos se ha comprobado que la exposición a ciertos oxidantes provoca un incremento en los niveles de antioxidantes en el tejido que sufre el daño oxidativo. Así, el papel fundamental de los radicales libres en el desarrollo de ciertas patologías pulmonares, asociadas al consumo de cigarrillos, queda corroborado por el hecho de que los glóbulos rojos de individuos fumadores tengan una mayor concentración del antioxidante GSH y del enzima catalasa que los de no fumadores (Green 1985, Roth et al. 1986, Toth et al. 1986).

5. *Etanol*

Se ha demostrado que grandes dosis de etanol o pequeñas dosis dadas repetidamente incrementan la peroxidación lipídica en la que están implicados los radicales hidroxilo. Asimismo, grandes dosis de etanol hacen decrecer los niveles de GSH en el hígado, lo que podría favorecer la lipoperoxidación (Bautista y Spitzer 1992, Salim 1992, Videla y Valenzuela 1982). Sin embargo, no está claro que la inducción de la peroxidación lipídica sea el proceso que provoque el daño al hígado producido por el etanol. En algunos trabajos se propone que el acetaldehído podría ser la molécula responsable de la hepatotoxicidad del etanol. El acetaldehído, que reacciona con el GSH disminuyendo su concentración, se puede metabolizar, además de por la aldehído deshidrogenasa, por una aldehído oxidasa de localización hepática, que libera radicales superóxido en su acción catalítica (Halliwell y Gutteridge 1989).

6. *Paracetamol*

El paracetamol (acetaminofeno) es un fármaco ampliamente utilizado como antipirético y analgésico, que tiene poca toxicidad a las dosis recomendadas. A altas dosis, sin embargo, causa severa hepatotoxicidad. Según diversos autores, de la actuación del citocromo P450 sobre el paracetamol resulta una quinoneimina reactiva o una semiquinona, que puede atacar las membranas celulares combinándose con grupos -SH de las proteínas. Ahora bien, la vitamina E y varios compuestos con grupos sulfidrilos se ha comprobado que protegen contra el daño hepático, sin disminuir la unión covalente de metabolitos del paracetamol (De Vries 1981, Fischer et al. 1985). Estos datos sostienen una implicación de los radicales libres de oxígeno en el daño al hígado.

7. *Clorpromazina*

Este fármaco neuroléptico es una fenotiazina cuya potencial toxicidad, al igual que el paracetamol, se cree debida al anión radical libre que se origina como consecuencia de su reducción enzimática. Este radical puede reaccionar con distintas macromoléculas, o bien generar radical superóxido como consecuencia del ciclo redox que se establece. Por último, la clorpromazina también puede autooxidarse, produciendo radical superóxido, peróxido de hidrógeno y radical hidroxilo (Heikkila et al. 1975, Lövestad 1975, Neptune y McCreery 1978).

8. Nitrofurantoína y Metronidazol

La nitrofurantoína y el metronidazol son agentes antimicrobianos que resultan tóxicos para el pulmón y el sistema nervioso periférico, respectivamente. Ambos compuestos cuando se reducen con un electrón dan lugar al correspondiente radical nitroanión que puede, a su vez, reducir al oxígeno molecular para formar radical superóxido, de este modo, se establece un ciclo redox que genera especies reactivas de oxígeno (Martin 1983, Peterson et al. 1982). El radical libre nitrofurantoína puede también reaccionar directamente con el peróxido de hidrógeno para producir OH $\cdot$ (Youngman 1982a, Youngman 1982b). No es, por tanto, sorprendente que el daño pulmonar originado por el tratamiento con nitrofurantoína se vea incrementado a altas tensiones de oxígeno.

A pesar de la toxicidad del metronidazol, este fármaco y otros compuestos imidazol relacionados se están empezando a utilizar experimentalmente, a dosis críticas, en el tratamiento de varios tipos de cáncer. Se ha demostrado que la ausencia de oxígeno decrece la sensibilidad de las células a la radiación ionizante, así, es lógico que actualmente se estén ensayando terapias contra el cáncer que combinan la radiación y una incrementada exposición al oxígeno. La utilización de estos imidazoles en este tipo de terapias está justificada puesto que se ha demostrado que estos compuestos hacen más sensibles a las células hipóxicas frente a la radiación ionizante. Posiblemente todos ellos actúan de forma similar al oxígeno, reaccionando con los radicales libres originados por la radiación y generando especies radicales libres de difícil reparación (Willson 1977).

9. Hidrocarburos halogenados

El tetracloruro de carbono, el cloroformo y el halotano son hidrocarburos halogenados que forman intermediarios radicales libres durante su biotransformación (Mason 1982, Nastainczyk 1981).

El tetracloruro de carbono es utilizado actualmente en industria como desengrasante, aunque hasta hace poco se empleaba también para la limpieza en seco de ropa. Este compuesto, gracias a su solubilidad en lípidos, puede cruzar fácilmente las membranas y distribuirse por todo el organismo, sin embargo, su principal efecto tóxico lo ejerce sobre el hígado. En este órgano puede producir acumulación de triglicéridos, por inhibición de la biosíntesis de lipoproteínas, cirrosis y hasta cáncer, dependiendo de la dosis. La hepatotoxicidad del tetracloruro de carbono se debe a la deshalogenación reductiva que sufre por el sistema citocromo P450 para formar el radical triclorometilo. Este radical puede unirse covalentemente a distintas macromoléculas celulares, o bien, reaccionar con el O $_2$ para formar el radical triclorometilperoxi. Ambos radicales pueden reaccionar con los ácidos grasos poliinsaturados de las membranas, iniciando la peroxidación lipídica (Albano et al. 1982, Kornbrust y Mavis 1980, Kunert y Tappel 1983).

El cloroformo, antiguamente empleado por inhalación como anestésico, ahora se utiliza como disolvente en industria. Este compuesto se metaboliza igual que el tetracloruro de carbono pero causa menos daño al hígado (Nastainczyk 1981, Webster 1988).

Otro anestésico inhalable es el halotano. Este compuesto produce peroxidación lipídica en hepatocitos de rata, especialmente a altas tensiones de oxígeno. Parece ser que el citocromo P450 al actuar sobre el halotano da lugar a un radical libre que, a su vez, podría reaccionar con el oxígeno para formar un radical peroxi muy reactivo (Forni et al. 1983, Tomasi 1983, Webster 1988).

10. Adriamicina y Daunomicina

La adriamicina (doxorubicina) y la daunomicina (daunorubicina) son dos agentes antitumorales cuyo uso clínico está limitado debido a su cardiotoxicidad. La mayoría de los autores sugiere que los efectos nocivos de estos compuestos se debe a la producción de radicales libres de oxígeno, originados en un ciclo redox en el que estarían implicados sus grupos quinona. El intermediario radical libre semiquinona reaccionaría con el oxígeno molecular para producir radical superóxido. Otros autores, sin

embargo, proponen que el radical semiquinona reacciona directamente con el peróxido de hidrógeno para formar el radical hidroxilo. En cualquier caso, parece ser que un mecanismo mediado por radicales libres es el responsable de la cardiotoxicidad causada por estos fármacos, puesto que el suplemento de vitamina E en la dieta y los agentes quelantes suprimen el daño tisular (Huber 1992, Myers et al. 1977, Sinha y Mimnaugh 1990, Unverferth et al. 1982).

11. *Bleomicinas, Fleomicinas y Talisomicinas*

Las bleomicinas, fleomicinas y talisomicinas, son antibióticos glicopeptídicos de gran importancia clínica por su utilización en el tratamiento de tumores. Parece ser que estos compuestos son capaces de reconocer y unirse al DNA y de ligar metales, asimismo, se sabe que el daño que ocasionan al DNA es dependiente de oxígeno. Todo esto sugiere que esta familia de antibióticos actúa generando radicales libres de oxígeno (Buettne y Oberley 1979, Hecht 1986, Sinha y Mimnaugh 1990). Las especies reactivas formadas en el metabolismo de estos compuestos están implicadas en la aparición de fibrosis pulmonar, por tanto, su utilización clínica está siendo controlada (Parizada et al. 1991).

12. *Hidralazina, Isoniazida e Iproniazida*

Muchos derivados de la hidrazina son ampliamente utilizados en industria y medicina. La hidralazina es un fármaco utilizado en el tratamiento de la hipertensión, la isoniazida es un agente antimicobacteriano y la iproniazida es un antidepresivo. Todos estos compuestos, por una activación enzimática, pueden convertirse en derivados de radicales libres que resultan tóxicos (Cavanagh 1984, Hill y Thornalley 1983, Sinha 1983). Se ha demostrado que el uso prolongado de isoniazida origina ciertas neuropatías asociadas con una disminución de los niveles de piridoxal en el tejido nervioso. Sin el piridoxal la enzima L,L-gamma-glutamato descarboxilasa, esencial para la biosíntesis del glutatión, es inactiva, de esta manera los niveles de este antioxidante disminuyen y los radicales libres de oxígeno causan el daño neurológico (Cavanagh 1984).

13. *Pamaquina y Primaquina*

Pamaquina y primaquina son dos fármacos antimalaria que producen hemólisis aguda en individuos deficientes en glucosa-6-fosfato deshidrogenasa. Ambos compuestos producen *in vitro* radicales superóxido. Asimismo, sus metabolitos derivados pueden generar radicales hidroxilo a partir del peróxido de hidrógeno, en una reacción que se ve favorecida por los productos de degradación de la hemoglobina. La sobreproducción de estos radicales libres provoca un descenso acusado en la concentración de NADPH, lo que impide la regeneración del glutatión y, por tanto, el mantenimiento del adecuado estado redox de las estructuras del eritrocito (Summerfield y Tudhope 1978, Thornally et al. 1983).

14. *Psoralenos*

Los psoralenos son fármacos empleados en el tratamiento de enfermedades de la piel como la psoriasis o el vitiligo. Estos compuestos, cuando se fotoexcitan, producen radicales superóxido y moléculas de oxígeno singlete, las cuales están implicadas en la fotosensibilización apreciada en individuos tratados con estos agentes (Pathak y Joshi 1984).

BIBLIOGRAFIA

- (1) AIKENS J. and DIX T. A. (1991). Peroxy radical (HOO·) initiated lipid peroxidation: the role of fatty acid

- hydroperoxides. *J. Biol. Chem.*, **266**: 15091-15098.
- (2) ALBANO E., LOTT K. A. K., SLATER T. P. S., STIER A., SYMONS M. C. R. and TONASI A. (1982). Spin-trapping studies on the free-radical products formed by metabolic activation of CCl_4 in rat liver microsomal fractions, isolated hepatocytes and *in vivo* in the rat. *Biochem. J.*, **204**: 593-603.
 - (3) AMSTRONG R. S., SOHAL R. G., CUTLER R. G. and SLATER T. F. (eds) (1984). *Free Radicals Molecular Biology, Aging and Disease*. Raven, New York.
 - (4) BAUTISTA A. P. and SPITZER J. J. (1992). Acute ethanol intoxication stimulates superoxide anion production by *in situ* perfused rat liver. *Hepatology*, **15**: 892-898.
 - (5) BIRNBOIM H. C. and KANABUS-KAMINSKA M. (1985). The production of DNA strand breaks in human leukocytes by superoxide may involve a metabolic process. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**: 6820-6824.
 - (6) BLAKE D. R., RALLEN R. E. and LUNEC J. (1987). Free radicals in biological systems-a review orientated to inflammatory processes. *Br. Med. Bull.*, **45**: 371-385.
 - (7) BUETTNER G. R. and OBERLEY L. W. (1979). The production of hydroxyl radical by tallsomycin and copper (II). *FEBS Lett.*, **101**: 333-335.
 - (8) CADENAS E. (1989). Biochemistry of oxygen toxicity. *Annu. Rev. Biochem.*, **51**: 79-110.
 - (9) CARP H., MILLER P., HOIDAL J. R. and JANOFF A. (1982) Potential mechanism for emphysema alfa-1-proteinase inhibitor recovered from lungs of cigarette smokers contains oxidized methionine and has decreased elastase inhibitory capacity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**: 2041-2045.
 - (10) CAVANAGH J. B. (1984). The problems of neurons with long axons. *Lancet*, **1**: 1284-1287.
 - (11) CERUTTI P. A. (1985). Prooxidant states and tumor promotion. *Science*, **227**: 375-381.
 - (12) CHIGNELL C. F., MOTTEN A. G. and BUETTNER G. R. (1985). Photoinduced free radicals from chlorpromazine and related phenothiazines: relationship to phenothiazine-induced photosensitization. *Envir. Hlth. Pers.*, **64**: 103-108.
 - (13) CHOE M., JACKSON C. and YU B. P. (1995). Lipid peroxidation contributes to age-related membrane rigidity. *Free Radical Biol. Med.*, **18**: 977-984.
 - (14) CHOI J. H. and YU B. P. (1995). Brain synaptosomal aging free radicals and membrane fluidity. *Free Radical Biol. Med.*, **18**(2): 133-139.
 - (15) COTGREAVE I. A., MOLDEUS P. and ORRENIUS (1988). Host defense mechanism against prooxidants. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **28**: 189-212.
 - (16) DAVIES K. J. A., WIESE A. G., SEVANIAN A. and KIM E. H. (1990). Repair systems in oxidative stress. In: Finch C. E., Johnson T. E. (eds). *Molecular Biology of Aging*, Wiley-Liss, New York.
 - (17) DE VRIES J. (1981). Hepatotoxic metabolic activation of paracetamol and its derivatives phenacetine and benorilate: oxygenation or electron transfer?. *Biochem. Pharmacol.*, **30**: 399-402.
 - (18) DEMPTE B. and LINN S. (1982). 5,6-saturated thymine lesions in DNA: production by ultraviolet light or hydrogen peroxide. *Nucleic Acids Res.*, **10**: 3781-3789.
 - (19) DEMPTE B. (1990). Oxidative DNA damage: repair and inducible cellular responses. *Mutat. Environ.*, **A**, 155-167.
 - (20) DUTHIE G. G., WAHLE K. J. (1990). Smoking, antioxidants essential fatty acids and coronary heart disease. *Biochem. Transac.*, **18**: 1051-1054.
 - (21) FARRINGTON J. A., EBERT M., LAND E. J. and FLETCHER K. (1973). Bipyridylum quaternary salts and related compounds. Pulse radiolysis studies of the reaction of paraquat radical wit oxyge. Implications for the mode of action od bipyridyl herbicides. *Biochim. Biophys. Acta*, **314**: 372-380.
 - (22) FISCHER V., WEST P. R., NELSON S. D. HARVISON P. J. and MASON R. P. (1985). Formation of 4-aminophenoxy free radical from the acetaminophen metabolite N acetyl p-benzoquinone imine. *J. Biol. Chem.*, **260**: 11446-11450.
 - (23) FORNI L. G., PACKER J. E., SLATER T. F. and WILLSON R. L. (1983). Reaction of the trichloromethyl and halothane-derived peroxy radicals with unsaturated fatty acids: a pulse radiolysis study. *Chem. Biol. Interact.*, **45**: 171-177.
 - (24) FRANK L. (1981). Prolonged survival after paraquat. Role of the lung antioxidant enzyme systems. *Biochem. Pharmacol.*, **30**: 2319-2324.
 - (25) FREEMAN B. A. and GRAPO J. D. (1982). Biology of disease. Free radicals and tissue injury. *Lab. Invest.*, **47**: 412-426.
 - (26) FRIDOVICH I. (1983). Superoxide radical: an endogenous toxicant. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **23**: 239-257.
 - (27) GEBICKI S. and GEBICKI J. M. (1993). Formation of peroxides in amino acids and proteins exposed to oxygen free radicals. *Biochem. J.*, **289**: 743-749.
 - (28) GREEN G. M. (1985). Mechanisms of tobacco smoke toxicity on pulmonary macrophage cells. *Eur. J. Respir. Dis.*, **66**: 82-85.
 - (29) GREENWALD R. W. and MOY W. W. (1980). Effect of oxygen- derived free radicals on hyaluronic acid. *Arthritis Rheum.*, **23**: 455-463.
 - (30) GUTTERIDGE J. M. C. and HALLIWELL B. (1990). The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. *Trends Biochem. Sci.*, **15**: 129-135.
 - (31) HALLIWELL B. and GUTTERIDGE J. M. C. (1984). Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem. J.*, **219**: 1-14.
 - (32) HALLIWELL B. and GUTTERIDGE J. M. C. (eds) (1989). *Free Radicals in Biology and Medicine*, 2nd edn., Oxford University Press, Clarendon, Oxford.

- (33) HALLIWELL B. and GUTTERIDGE J. M. C. (1992). Biologically relevant metal ion-dependent hydroxyl radical generation. *FEBS Lett.*, **307**: 108-112.
- (34) HALLIWELL B., GUTTERIDGE J. M. C. and CROSS C. E. (1992). Free radicals, antioxidants, and human disease. Where are we now. *J. Lab. Clin. Med.*, **119**: 598-620.
- (35) HARMAN D. (1992). Role of free radicals in aging and disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci. USA*, **673**: 126-141.
- (36) HECHT S. M. (1986). DNA Strand scission by activated bleomycin group antibiotics. *Fed. Proc.*, **45**: 2784-2791.
- (37) HEIKKILA R. E., COHEN G. and MANIAN A. A. (1975). Reactivity of various phenothiazine derivatives with oxygen and oxygen radicals. *Biochem. Pharmacol.*, **24**: 363-368.
- (38) HIGUCHI Y. and LINN S. (1995). Purification of all forms of HeLa cell mitochondrial DNA and assessment of damage to it caused by hydrogen peroxide treatment of mitochondrial or cells. *J. Biol. Chem.*, **270**: 7950-7956.
- (39) HILL H. A. O. and THORNALLEY P. J. (1983). The effect of spin-traps on phenylhydrazine-induced haemolysis. *Biochim. Biophys. Acta*, **762**: 42-49.
- (40) HODGSON E. K. and FRIDOVICH I. (1975). The interaction of bovine erythrocyte superoxide dismutase with hydrogen peroxide: inactivation of the enzyme. *Biochemistry*, **14**: 5294-5303.
- (41) HOFFMAN M. E., MELLO FILHO A. C. and MENEGHINI R. (1984). Correlation between cytotoxic effect of H₂O₂ and the yield of DNA strand break in cells of different species. *Biochim. Biophys. Acta*, **781**: 234-238.
- (42) HORTON A. A. and FAIRHURST S. (1987). Lipid peroxidation and mechanism of toxicity. *CRC Crit. Rev. Toxicol.*, **18**: 27-79.
- (43) HUBER S. A. (1992). Heat-shock induction in adriamycin and picornavirus-infected cardiocytes. *Lab. Invest.* **67**: 218-224.
- (44) HUNNINGHAKE G., GADEK J. and CRYSTAL R. (1980). Mecanism by which cigarette smoke attracts polymorphonuclear leukocytes to lung. *Chest*, **77**: 273.
- (45) IMLAY J. A. and LINN S. (1988). DNA damage and oxygen radical toxicity. *Science*, **240**: 1302-1309.
- (46) JACOB R. A. (1995). The integrated antioxidant system. *Nutr. Rev.*, **15**: 755-766.
- (47) JAMIESON D. (1989) Oxygen toxicity and reactive oxygen metabolites in mammals. *Free Rad. Biol. Med.*, **7**: 87-108.
- (48) KAPPUS H. and SIES H. (1981). Toxic drug effects associated with oxygen metabolism: redox cycling and lipid peroxidation. *Experientia*, **37**: 1233-1237.
- (49) KAPPUS H. (1986). Overview of enzyme systems involved in bioreduction of drugs and in redox cycling. *Biochem. Pharmacol.*, **35**: 1-7.
- (50) KING T. E., MASON H. S. and MORRISON M. (eds) (1982). *Oxidases and Related Redox Systems*. Pergamon Press, Oxford.
- (51) KONO Y. and FRIDOVICH I. (1982). Superoxide radical inhibits catalase. *J. Biol. Chem.*, **257**: 5751-5761.
- (52) KORNBRUST D. J. and MAVIS R. D. (1980). Microsomal lipid peroxidation. Stimulation by carbon tetrachloride. *Mol. Pharmacol.*, **17**: 408-411.
- (53) LEVEY G., RIEGER A. L. and EDWARDS J. O. (1981). Rates and mechanisms for oxidation of paraquat and diquat radical cations by several peroxides. *J. Org. Chem.*, **46**: 1255-1259.
- (54) LÖVSTAD R. A. (1975). Kinetic studies of the ceruloplasmin-catalyzed oxidation of phenothiazine derivatives. *Biochem. Pharmacol.*, **24**: 475-478.
- (55) MALMSTRÖM B. G. (1982). Enzymology of oxygen. *Annu. Rev. Biochem.*, **51**: 21-59.
- (56) MARTIN W. J. (1983). Nitrofurantoin evidence for the oxidant injury of lung parenchymal cells. *Am. Rev. Resp. Dis.*, **127**: 482-486.
- (57) MARTINEZ-CAYUELA, M. (1995). Oxygen free radicals and human disease. *Biochimie*, **77**: 147-161.
- (58) MASON R. P. (1982). Free-radical intermediates in the metabolism of toxic chemicals. In: Pryor W. A. (ed) *Free Radicals in Biology*, 5. Academic Press, New York, pp. 161-173.
- (59) MELLO-PILHO A. C., HOFFMANN M. E. and MENEGHINI R. (1984) Cell killing and DNA damage by hydrogen peroxide are mediated by intracellular iron. *Biochem. J.*, **218**: 273-275.
- (60) MYERS C. E., MCGUIRE W. P., LISS R. H., IPRIM I., GROTZINGER K. and YOUNG R. C. (1977). Adriamycin: the role of lipid peroxidation in cardiac toxicity and tumour response. *Science*, **197**: 165-167.
- (61) NASTAINCZYK W., AHR H. and ULRICH V. (1981). The mechanism of the reductive dehalogenation of polyhalogenated compounds by microsomal cytochrome P450. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **136**: 799-808.
- (62) NIELSEN H. (1981). Covalent binding of peroxidized phospholipid to protein. III. Reaction of individual phospholipids with different proteins. *Lipids*, **16**: 215-222.
- (63) NIKI E., YAMAMOTO Y., KOMURO E. and SATO E. (1991). Membrane damage due to lipid oxidation. *Am. J. Clin. Nutr.*, **53**: 2015-2055.
- (64) PARIZADA B., ERBER M. M. and NIROD A. (1991). Protective effects of human recombinant MnSOD in adjuvant arthritis and bleomycin-induced lung fibrosis. *Free Rad. Res. Commun.*, **15**: 297-301.
- (65) PETERSON F. J., COMBS G. F., HOLTZMAN J. L. and MASON R. (1982). Metabolic activation of oxygen by nitrofurantoin in the young chick. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **65**: 162-169.
- (37) PROCTOR P. H. and REYNOLDS E. S. (1984). Free radicals and disease in man. *Physiol. Chem. Phys.*, **16**: 175-195.
- (38) PRYOR W. A. (1986) Oxy-radicals and related species: their formation, life-times, and reactions. *Annu. Rev. Physiol.*, **48**: 657-667.
- (39) PRYOR W. A. and CHURCH D. P. (1991). Aldehydes, hydrogen peroxide, and organic radical as mediators of oxygen

- toxicity. *Free Rad. Biol. Chem.*, **11**: 41-46.
- (40) PRYOR W. A. and DOOLEY M. M. (1985). Inactivation of alpha-1 proteinase inhibitor by cigarette smoke: effect of smoke phase and buffer. *Am. Rev. Respir. Dis.*, **131**: 941-943.
 - (41) RANDERATH K., REDDY R., DANNA T. P., WATSON W. P., CRANE A. E. and RANDERATH E. (1992). Formation of ribonucleotides in DNA modified by oxidative damage in vitro and in vivo. Characterization by ³²P-postlabeling. *Mutat. Res.* **275**: 355-366.
 - (42) RICEEVANS C. and BURDON R. (1993). Free radical lipid interactions and their pathological consequences. *Prog. Lipid Res.*, **37**: 37-110.
 - (43) RICHMOND R. and HALLIWELL B. (1982). The formation of hydroxyl radicals from the paraquat radical cation, demonstrated by a highly-specific gas chromatographic technique. The role of superoxide radical anion, hydrogen peroxide and glutathione reductase. *J. Inorg. Biochem.*, **17**: 95-101.
 - (44) ROTH W. J., CHUNG S. I. and JANOFF A. (1986). Inactivation of alveolar macrophage transglutaminase by oxidants in cigarette smoke. *J. Leuk. Biol.*, **39**: 629-644.
 - (45) SALIM A. S. (1992). Use of scavenging oxygen-derived free radicals to protect the rat against aspirin- and ethanol-induced erosive gastritis. *J. Pharm. Sci.*, **81**: 943-946.
 - (46) SCHACH K. H. (1992). Metals and lipid oxidation. Cotemporary issues. *Lipids*, **27**: 209-218.
 - (47) SEVANIAN A., STEIN R. A. and MEAD J. F. (1981). Metabolism of epoxidized phosphatidylcholine by phospholipase A2 and epoxide hydrolase. *Lipids*, **16**: 781-788.
 - (48) SHIMAZAKI K., SAKAKI T., KONDO N. and SUGAHARA K. (1980). Active oxygen participation in chlorophyll destruction and lipid peroxidation in SO₂-fumigated leaves of spinach. *Plant Cell Physiol.*, **21**: 1193-1200.
 - (49) SIES H. (ed) (1985). *Oxidative Stress*. Academic Press, London.
 - (50) SINHA B. K. (1983). Enzymatic activation of hydrazine derivatives. A spin-trapping study. *J. Biol. Chem.*, **258**: 796-801.
 - (51) SINHA B. K. and MIMNAUGH E. G. (1990). Free radicals and anticancer drug resistance: oxygen free radicals in the mechanism of drug cytotoxicity and resistance by certain tumours. *Free Rad. Biol. Med.*, **8**: 567-581.
 - (52) SMITH L. L. (1986). The response of the lung to foreign compounds that produce free radicals. *Ann. Rev. Physiol.*, **48**: 681-692.
 - (53) SOUTHOORN P. A. and POWIS G. (1988). Free radicals in medicine. I. Chemical nature and biologic reactions. *Mayo Clin. Proc.*, **63**: 381-389.
 - (54) STADTMAN E. R. (1992). Protein oxidation and aging. *Science*, **257**: 1220-1224.
 - (55) SUMMERFIELD M. and TUDHOPE G. R. (1978). Studies with primaquine in vitro. Superoxide radical formation and oxidation of haemoglobin. *Br. J. Clin. Pharm.*, **6**: 319-323.
 - (56) TABUENCA J. M. (1981). Toxic-allergic syndrome caused by injection of rapessed oil denatured with aniline. *Lancet*, **ii**: 567-568.
 - (57) TOMASI A., BILLING S., GARNER A., SLATER T. F. and ALBANO E. (1983). The metabolism of halothane by hepatocytes: a comparison between free radical spin trapping and lipid peroxidation in relation to cell damage. *Che.-Biol. Interact.*, **46**: 353-369.
 - (58) THORNALLEY P. J., STERN A. and BANNISTER J. V. (1983). A mechanism for primaquine mediated oxidation of NADPH in red blood cells. *Biochem. Pharmacol.*, **32**: 3571-3575.
 - (59) TOTH K. M., BERGER E. M., BEEHLER C. J. and REPINE J. E. (1986). Erythrocytes from cigarette smokers contain more glutathione and catalase and protect endothelial cells from hydrogen peroxide better than do erythrocytes from nonsmokers. *Am. Rev. Respir. Dis.*, **134**: 281-284.
 - (60) TRUSH M. A., MIMNAUGH E. G. and GRAM T. E. (1982). Activation of pharmacologic agents to radical intermediates. Implications for the roles of free radicals in drug action and toxicity. *Biochem. Pharmac.*, **31**: 3335-3343.
 - (61) UNVERFERTH D. V., MAGORIEN R., LEIR C. V. y BALCERZAK S. (1982). Doxorubicin cardiotoxicity. *Cancer Treat. Rev.*, **9**: 149-164.
 - (62) VALENZUELA A. (1991). The biological significance of malondialdehyde determination in the assessment of tissue oxidative stress. *Life Sci.*, **48**: 301-309.
 - (63) VIDELA L. A. and VALENZUELA A. (1982). Alcohol ingestion, liver glutathione and lipoperoxidation: metabolic inter-relations and pathological implications. *Life Sci.*, **31**: 2395-2403.
 - (64) WEBSTER N. R. and NUNN J. P. (1988). Molecular structure of free radicals and their importance in biological reactions. *Br. J. Anaesth.*, **60**: 98-108.
 - (65) WILLSON R. L. (1977). Metronidazole (Flagil*) in cancer radiotherapy: a historical introduction. In *Metronidazole: Proceedings*, Montreal May 26-28th 1976. Exerpta Medica.
 - (66) WOLFF S. P. and DEAN R. T. (1986). Fragmentation of protein by free radicals and its effect on their suceptibility to enzymic hydrolysis. *Biochem. J.*, **223**: 399-403.
 - (67) WOLPP S. P., GARNER A. and DEAN R. T. (1986). Free radicals lipids and protein degradation. *Trends Biochem. Sci.*, **11**: 27-31.
 - (68) YOUNGMAN R. J., OSSWALD W. F. and ELSTNER E. F. (1982). Cripto-OH· radical production by nitrofurantoin. *Biochem. Pharmacol.*, **31**: 603-609.
 - (69) YOYNGMAN R. J., OSSWALD W. F. and ELSTNER E. F. (1982). Mechanism of oxygen activation by nitrofurantoin and relevance to its toxicity. *Biochem. Pharmacol.*, **31**: 3723-3729.
 - (70) YU B. P. (1994). Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol. Rev.*, **74**: 139-163.