

Puesta a punto del método más idóneo para determinar el daño oxidativo producido por la hiperoxia en buceadores militares

M. J. Alcaraz García¹, A. Olea González², S. Balanza Galindo³, S. Zamora Navarro⁴

Sanid. mil. 2008; 64 (2): 71-76

RESUMEN

Introducción: Los radicales libres son altamente reactivos y atacan constantemente al cuerpo humano, se producen como parte normal del metabolismo celular. En el caso de buceadores militares que utilizan equipos de circuito cerrado y que respiran oxígeno a presiones superiores a la atmosférica (puro 100%), el nivel de daño oxidativo aumenta. **Objetivo:** Estudiar los efectos de la hiperoxia en el equilibrio redox del organismo de un colectivo de buceadores que usan oxígeno puro como elemento respirable y desarrollar la técnica más viable para su determinación. **Material y Métodos:** Participaron 15 buceadores que realizaban un programa de instrucción impartido por el Centro de Buceo de la Armada de 3 meses de duración empleando un equipo de buceo de oxígeno puro. En dicho programa se desarrollaron un total de 23 inmersiones con una media de 20.05 horas totales respirando oxígeno puro a una profundidad de 7 metros. Se miden los niveles de óxido nítrico, el estado antioxidante total y niveles de Glutacion peroxidasa en plasma y peroxidación lipídica en orina. **Resultados:** Descenso en todos los parámetros a lo largo del programa de estudio. El estado de antioxidantes totales disminuyó significativamente después de 6 semanas, con un leve incremento al final. El óxido nítrico aumentó en sus niveles al comienzo del estudio, y fue disminuyendo significativamente después de 6 y 12 semanas. Además, la glutacion peroxidasa y los isoprostanos fueron progresivamente más bajos. **Conclusiones:** La hiperoxia en buceadores puede comprometer las defensas antioxidantes temporalmente sin embargo la peroxidación lipídica producida no es importante debido tal vez a un proceso adaptativo resultado de la exposición periódica a condiciones hiperóxicas. El daño oxidativo genera un descenso en la concentración de óxido nítrico. Los métodos más óptimos para determinar el daño oxidativo producido por la hiperoxia son el nivel de óxido nítrico y el estado antioxidante total.

PALABRAS CLAVE: Hiperoxia, Radicales libres (ROS), Daño oxidativo, Buceadores profesionales.

INTRODUCCIÓN

La mayor parte del oxígeno que respiramos es inocuo e imprescindible para la vida cuando es reducido hasta agua por las enzimas responsables de la respiración celular. Sin embargo, entre un 2% y un 5% del oxígeno se transforma en moléculas sumamente inestables con un electrón desapareado en su última órbita, denominados radicales libres. La inestabilidad de dichas moléculas radica en el facilidad que tienen de recibir o entregar ese electrón desapareado^{1,2}, desestabilizando a su vez otras moléculas que en principio fueron estables.

No todas las moléculas inestables que se producen por el metabolismo aerobio se pueden llamar radicales libres por no coincidir químicamente en su definición, así que para generalizar se denominan especies reactivas del oxígeno (EROs) agrupando tanto a los radicales libres como al peróxido de hidrógeno, siendo en la actualidad más apropiado las siglas en inglés reactive oxygen species (ROS).

El ataque de los ROS consiste en una sucesión de reacciones bioquímicas de oxidación-reducción (REDOX) que se hace cons-

tante en el organismo. Dichas reacciones tienen lugar de forma espontánea en el metabolismo normal de la célula o por la exposición de determinados factores ambientales¹⁻⁴. La producción de los ROS tiene lugar por la reducción del O₂ convirtiéndose en el radical superóxido (O₂⁻). A continuación, por la enzima superóxido dismutasa (SOD) se genera el peróxido de hidrógeno (H₂O₂). Esta última molécula se oxida en la reacción de Fenton formando el radical hidroxilo (OH⁻) que se trata de uno de los radicales más reactivos que se conocen. Precisamente debido a su alto potencial de reacción desestabiliza a otras moléculas poniendo en marcha toda una cadena de inestabilidad produciendo una alta acumulación de radicales libres en el organismo.

Además de los ROS especificados anteriormente existen otros que constituyen la fase inicial de la peroxidación lipídica como el peroxil (ROO⁻) y el alcoxil (RO⁻), resultantes de la acción del OH⁻. Otros que debemos mencionar también son el oxígeno singlete (¹O₂), el óxido nítrico (NO⁻) y el anión peroxinitrito (OONO⁻)⁵.

En el caso de buceadores militares que utilizan equipos de inmersión donde se respira oxígeno puro (100%) a presiones superiores a la atmosférica, el problema del daño oxidativo se ve fuertemente incrementado ya que aumenta la producción de ROS en los tejidos biológicos.^{6,7}

El daño oxidativo se puede medir de forma directa o indirecta:

Métodos directos

Consiste en la medición de la concentración de agentes oxidantes en el organismo, pero ha resultado difícil en muchos casos,

¹ Licenciada en Biología. Becaria predoctoral de la Universidad de Murcia (Murcia).

² Cte. Médico Centro de Buceo de la Armada, Unidad de Investigación Subacuática (Cartagena).

³ Médico. Sanidad Marítima. Instituto Social de la Marina (Cartagena).

⁴ Universidad de Murcia. Dpto Fisiología Animal.

Dirección para correspondencia: María José Alcaraz García, Centro de Buceo de la Armada Estación Naval de la Algameca. Cartagena Naval 30290. Murcia. Teléfono: 968.56.77.25 Fax: 968.12.71.75. Correo electrónico: alcarazg@um.es.

Recibido: 1 de agosto de 2007

Aceptado: 5 de febrero de 2008

por tener éstos un tiempo de vida media muy corto. El radical hidroxilo tiene una vida de 10^{-10} segundos. La espectrometría de resonancia de la rotación (espín) de electrones^{8,9,10-16} es una de las técnicas analíticas que mide directamente los ROS así como las titulaciones microcolorimétricas^{17,18}, la cristalografía de rayos X¹⁹, las mediciones espectrofotométricas o espectroelectroquímicas con luz ultravioleta/luz visible^{20,21}, la quimioluminiscencia^{8,10,14}, o la espectrofotometría ultravioleta¹⁴ pero su aplicación en el ser humano no es factible aún debido a los elevados costes de estos equipos.

Métodos indirectos

Determinación de productos terminales de la acción oxidante

Se han desarrollado métodos para medir algunos de los ROS, mediante los productos terminales de su acción oxidante sobre: a) proteínas, b) DNA y c) lípidos.

A) Los ROS inducen en las proteínas la acumulación de grupos carbonilos, que pueden ser evaluados después de la condensación con 2-4 dinitrofenilhidrazina (2,4-DNFH), comúnmente utilizado para evaluar la oxidación de proteínas celulares. Este método es muy laborioso, largo y utiliza gran cantidad de solventes, por lo que su uso se ha desechado a favor de un método ELISA.²²⁻²⁵

B) Más de 12 metabolitos son producidos durante el ataque oxidante al DNA, pero sólo algunos han podido ser utilizados como marcadores de dicho ataque: timidina glicol (TG) y 8-OH-2'-deoxiguanosina (OH8dg)²⁶⁻²⁹.

C) La peroxidación lipídica es un proceso complejo, en el cual los ácidos grasos no saturados en los fosfolípidos de las membranas celulares son atacados por radicales que provocan el secuestro de un hidrógeno, formándose hidroperóxidos que son de difícil medición por degradarse rápidamente. No obstante, la lipoperoxidación constituye el mejor método para tratar de probar la función de los radicales libres en algún tipo de daño celular, y existen varias formas de medirla:

1. Medición de compuestos que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico; se basa en la reacción del ácido tiobarbitúrico con el malondialdehído (MDA), formándose así un color susceptible de ser medido directamente. Su análisis es usado por su sencillez, pero le falta sensibilidad, por lo que se recomienda, para aumentarla, utilizar procedimientos fluorométricos o cromatográficos.^{30,31}

2. Medición de otros aldehídos procedentes también de la lipoperoxidación: el 4 hidroxinonenal, susceptible de ser medido por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con detección ultravioleta. Esta técnica es común pero sólo en aquellos laboratorios con un alto poder económico para mantener un aparato de medición por HPLC.

3. Medición de hidrocarburos volátiles en el aire expirado: principalmente etano y pentano, respectivamente derivados de los hidroperóxidos de los ácidos grasos insaturados de las series omega-3 y omega-6. No es un método invasivo, pero por lo complicado resulta muy molesto a los pacientes.

4. Medición de compuestos fluorescentes de la lipoperoxidación: mide la lipofuscina, producto final de la destrucción oxidativa de los lípidos, pero sólo es útil para etapas tardías de la peroxidación.

Toda esta serie de indicadores que miden los productos del daño oxidativo a proteínas, DNA y lípidos, aportan datos cuantitativos a veces muy relativos acerca de su presencia en algunos fluidos orgánicos.

Medición de la concentración de antioxidantes

Los resultados de diferentes estudios muestran que los niveles de antioxidantes pueden disminuir o aumentar por diferentes enfermedades, por lo que al monitorizarlos pueden ser utilizados como marcadores de enfermedades y para el seguimiento terapéutico.

Se han desarrollado productos diagnósticos que conceden una exacta y rápida medición del rango de parámetros antioxidantes.

Dentro de esta amplia gama, los más comercializados son los que miden antioxidantes de tipo enzimáticos: superóxido dismutasa y catalasa.

Algunas casas comerciales también producen reactivos para determinar antioxidantes no enzimáticos como las vitaminas C, A, E, y la ubiquinona³²⁻³⁴.

Además se pueden medir antioxidantes de segunda línea, como son las enzimas reparadoras del daño del DNA, denominadas redoxiendonucleasas^{27,35,36}.

Aunque la adquisición de estos conjuntos de reactivos puede resultar cara la especificidad y fiabilidad de la técnica la hacen muy recomendable.

Medición del estado antioxidante total

El estado antioxidante refleja el balance dinámico entre el sistema antioxidante y los radicales libres (ROS) y es utilizado como instrumento para estimar el riesgo de daño oxidativo³⁷.

De la misma manera que son medidas innumerables sustancias relacionadas con el daño oxidativo, son múltiples los métodos empleados en tal medición y van desde la simple espectrofotometría, pasando por el HPLC, hasta llegar a la moderna quimioluminiscencia^{32,37,38}.

Algunos autores determinan las vitaminas C, A y E; otros la concentración de algunas enzimas antioxidantes como la Gpx, la catalasa^{39, 40} y la SOD.

La medición del estado antioxidante total es beneficiosa en numerosas enfermedades como en la diabetes, cardiopatías isquémicas e infarto agudo de miocardio, existen conjuntos de reactivos espectrofotométricos comerciales de excelente calidad testada por importantes casas comerciales que proporcionan datos muy fiables.

Las alteraciones en los niveles de ROS están cada día más vinculadas a cuadros patológicos por eso son enormes los esfuerzos que se realizan a escala mundial para el desarrollo de nuevos y más sencillos métodos que nos llevarán a la mayor utilización de los datos aportados por la medición del daño oxidativo. Por ello de entre los métodos más fiables y fáciles de manejar según la bibliografía, nuestro objetivo es encontrar la técnica (o conjunto de ellas) más viable para la determinación del daño oxidativo en buceadores así como el estudio de los efectos de la hiperoxia en el equilibrio redox del organismo.

OBJETIVO

El interés surgió de la necesidad de encontrar el método de determinación de daño oxidativo más rápido e idóneo para las fuerzas armadas ya que una población de buceadores profesionales se exponen al oxígeno puro todos los años durante tres meses. Ante la asiduidad del programa y de los posibles riesgos que puede conllevar la exposición a hiperoxia, se decidió profundizar en el tema.

Por todo ello, el objetivo del trabajo se centró en estudiar los efectos de la hiperoxia en el equilibrio redox del organismo de un colectivo de buceadores que usan oxígeno puro como elemento respirable y el desarrollo de la técnica más viable para la determinación del daño oxidativo

MATERIAL Y MÉTODOS

Sujetos

El estudio fue realizado en 15 buceadores militares varones y sanos del Centro de Buceo de la Armada. Los datos antropométricos están representados en la tabla I como la media \pm desviación Standard.

El programa consistió en tres inmersiones semanales en el mar de una hora de duración a una profundidad de 7 metros durante 3 meses respirando oxígeno puro a una presión parcial de 1.7 ATA con un equipo de circuito cerrado (LAR VI.1. Draeger, Luebeck, Alemania) (Fig. 1) junto con un intenso entrenamiento físico. Las actividades físicas que desarrollaron fueron tanto terrestres (ejercicios aeróbicos y anaeróbicos) como acuáticas (natación con y sin equipo de buceo). Los buceadores no estuvieron expuestos a condiciones hiperóxicas antes del programa de entrenamiento. Todos los participantes del programa dieron su consentimiento para la realización del estudio.

Métodos

Se recogieron 3 muestras de orina y sangre de cada sujeto; previa al inicio de la exposición, a las 6 semanas y al final del programa. Las muestras sanguíneas se obtuvieron por punción venosa, centrifugadas y almacenadas a -80°C hasta su análisis.

Óxido Nítrico

El NO del suero fue medido utilizando un ensayo colorimétrico no enzimático que convierte el nitrato en nitrito usando cadmio metálico (Oxford Biomedical Research, Inc. Oxford, MI, USA). En aquellas muestras donde las concentraciones de proteínas son altas, el cadmio ha sido descrito como un catalizador más importante que la nitrato reductasa en presencia de fuertes reacciones desproteinizantes. La reducción de nitrato a nitrito es cuantificada por espectrofotometría utilizando la reacción de Griess.

Estado Antioxidante Total

Evaluamos el estado antioxidante total (TAS) con el ensayo comercializado TEAC (Randox Laboratories Ltd, United Kingdom),



Figura 1: Equipo de circuito cerrado LAR VI que se utilizó en el estudio.

basado en la medición de la intensidad de color (colorimetría) del catión radical ABTS de color azul-verdoso detectable a 600 nm. La producción del color es inversamente proporcional a la concentración de antioxidantes en la muestra. El ensayo fue llevado a cabo en un analizador Hitachi 912 (Roche Diagnostics Systems).

Glutathion Peroxidasa

Los niveles plasmáticos de glutathion peroxidasa (GPx) fueron analizados por un inmunoensayo (ELISA) amplificado en su último paso con el sistema biotina-estreptavidina (Bioxytech, OxisResearch, Portland, USA). Las muestras son incubadas en presencia de anticuerpos conjugados con un sustrato específico para la glutathion peroxidasa humana. La cantidad de este enzima presente en las muestras es estimada por la medición de la absorbancia a 405 nm siendo ambos parámetros proporcionales.

Tabla I. Datos antropométricos

	MEDIA \pm DS
Peso, Kg	78,8 \pm 9,3
Talla, cm	177,1 \pm 5,4
IMC, kg/m ²	25 \pm 2

IMC: Índice de masa corporal.

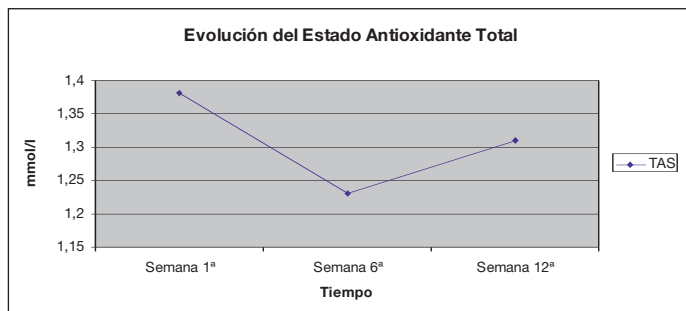


Figura 2: Evolución del Estado Antioxidante Total de los buceadores bajo condiciones hiperóxicas ($p < 0,05$).

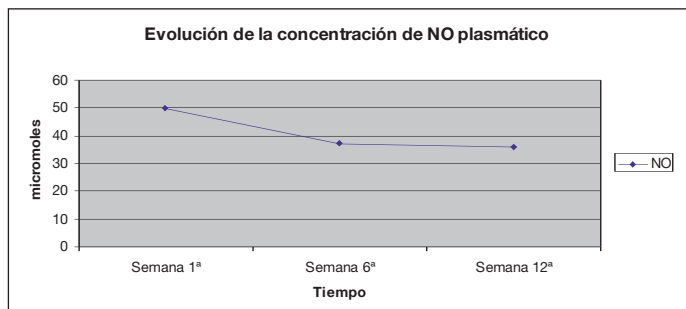


Figura 3: Evolución de la concentración de NO plasmático en buceadores cuando respiran oxígeno puro ($p < 0,05$).

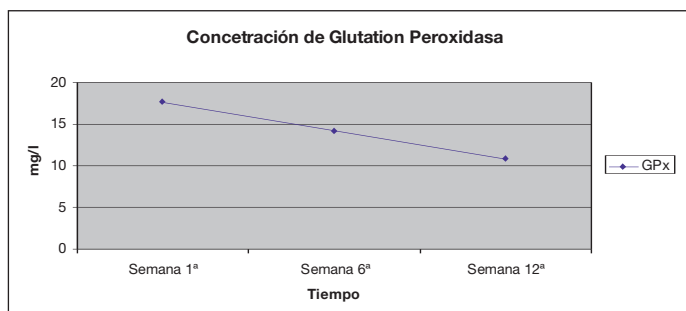


Fig. 4: Cambios en la concentración del glutacion peroxidasa con el paso del tiempo cuando los individuos están respirando elevadas concentraciones de oxígeno ($p > 0,05$).

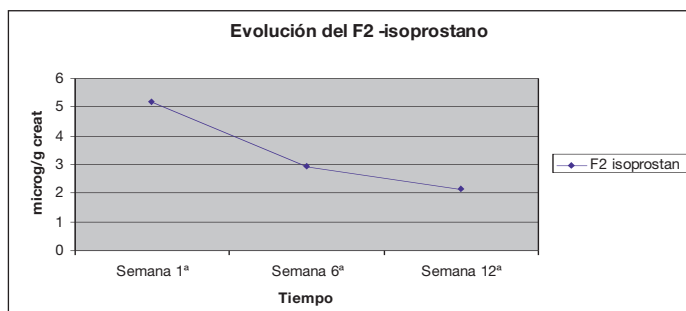


Figura 5: Evolución del F2-isoprostano a lo largo de 12 semanas bajo condiciones hiperóxicas ($p = 0,05$).

Isoprostanos Urinarios

Para la determinación de los niveles urinarios de 15-isoprostano F_{2t} se utilizó un inmunoensayo (ELISA), el cual elimina las interferencias debidas a las uniones no específicas (EA 85, Oxford Biome-

dical Research, Oxford, MI, USA). El 15-isoprostano F_{2t} de la muestra compete con otra molécula similar por unirse a un anticuerpo específico asociado a un enzima. Así en presencia del sustrato de dicho enzima asociado a la molécula competidora, la muestra se colorea siendo inversamente proporcional la intensidad de color con la cantidad de 15-isoprostano F_{2t} presente en la muestra. Los resultados fueron referidos a la concentración de creatinina urinaria en la muestra.

Análisis estadístico

La estadística descriptiva está representada como la media \pm desviación estándar. Las medias fueron comparadas con un análisis de la varianza (ANOVA). Las diferencias con una p inferior a 0,05 fueron consideradas estadísticamente significativas.

RESULTADOS

Se observó un descenso en todos los parámetros evaluados a lo largo del programa de estudio. El estado de antioxidantes totales disminuyó significativamente después de 6 semanas (media 1,38 versus 1.23 mmol/l), con un leve incremento al final (media 1,31 mmol/l) (Fig. 2). El NO mostró un aumento en sus niveles al comienzo del estudio, y fue disminuyendo significativamente después de 6 y 12 semanas (Fig. 3). Además, Gpx y F_{2t} -isoprostanos fueron progresivamente más bajos (Figs. 4 y 5).

DISCUSIÓN

La capacidad antioxidante total del plasma forma parte de un mecanismo homeostático fuertemente regulado. Este mecanismo actúa como un eficiente sistema defensivo antioxidante jugando un papel importante en el control del daño oxidativo causado por la hiperoxia. El TAS basal en plasma de los buceadores de equipos de oxígeno puro es similar al de otros atletas.⁴¹ Se encontró un descenso significativo en la concentración de TAS plasmático entre la primera y la sexta semana durante el programa de buceo, pero en la semana 12 la concentración de TAS plasmático es muy similar a la de la primera semana. Nuestros datos sugieren que la hiperoxia en buceadores puede comprometer el mecanismo de defensa antioxidante al comienzo del programa, lo cual podría ser resuelto por un proceso adaptativo a la exposición hiperóxic. De esta forma, al final del curso prácticamente todos los sujetos habían recobrado las concentraciones de TAS plasmáticas basales, como han demostrado algunos autores⁴². La Glutacion peroxidasa juega un papel importante en el mecanismo enzimático protector endógeno reduciendo los efectos dañinos de los oxidantes en la célula⁴³. Nuestros resultados muestran un descenso en la concentración de Gpx plasmática al final del estudio, similar a lo que observan otros autores⁴⁴. Este descenso en Gpx sugiere un aumento del daño oxidativo causado por la hiperoxia. Sin embargo, los isoprostanos urinarios disminuyen, aunque no significativamente. Este resultado coincide con estudios previos^{45,46}, sugiriendo que la peroxidación lipídica en buceadores que siguieron este tipo de programa y que respiraron oxígeno puro no es importante.

De acuerdo con algunos autores^{47,48}, a los 30 minutos de la exposición hiperóxic en buceadores no profesionales, podría inducir un

aumento del daño oxidativo seguido de inflamación de las vías respiratorias. Además, el anión superóxido (O_2^-) aumenta debido al ejercicio y a la exposición hiperóxica. Por otra parte, el NO aumenta con la hiperoxia^{49,50} e interactúa con los ROS para formar otra especie reactiva de nitrógeno (RNS), esta podría ser la respuesta al descenso de NO que observamos en los buceadores de nuestro estudio. Nuestros resultados muestran niveles basales de NO ($49.61 \pm 19.86 \mu M$) similares a la de otro estudio en futbolistas ($58.03 \pm 15.20 \mu M$)⁵¹.

Los niveles de NO en atletas está fuertemente influenciado por su estado físico.

Concluimos que la agresión oxidativa genera un descenso en la concentración de NO en buceadores que respiraron oxígeno puro con un equipo de circuito cerrado, este hecho podría deberse a la reacción entre el NO^- y los ROS para formar $OONO^-$. La hiperoxia en buceadores puede comprometer las defensas antioxidantes temporalmente, ya que tanto la GPx como la concentración de TAS disminuyen. De acuerdo con los resultados, sugerimos que el programa hiperóxico que siguen estos buceadores no influye de forma importante en la peroxidación lipídica debido tal vez a un proceso adaptativo resultado de la exposición periódica a condiciones hiperóxicas.

Los métodos más óptimos para determinar el daño oxidativo producido por la hiperoxia en buceadores profesionales son la determinación de los niveles de NO y el TAS, por la facilidad en su desarrollo, por sus resultados significativos, por la comodidad en la obtención y en el manejo de las muestras además de la baja necesidad de recursos humanos para llevarlos a cabo. Aunque siempre es aconsejable tomar mediciones de la peroxidación lipídica y de alguna de las enzimas antioxidantes como la glutatión peroxidasa, superóxido dismutasa o catalasa.

CONCLUSIONES

La hiperoxia en buceadores puede comprometer las defensas antioxidantes temporalmente sin embargo la peroxidación lipídica producida no es importante debido tal vez a un proceso adaptativo resultado de la exposición periódica a condiciones hiperóxicas. El daño oxidativo genera un descenso en la concentración de óxido nítrico. Los métodos más óptimos para determinar el daño oxidativo producido por la hiperoxia son el nivel de óxido nítrico y el estado antioxidante total.

AGRADECIMIENTOS

Quisiéramos expresar nuestro agradecimiento a todo el personal, civil y militar del Centro de Buceo de la Armada en la persona de C.N. Antón Contreras Fernández, jefe del CBA y al C.F. Don Amador Sánchez Silvente jefe de la Unidad de Investigación Subacuática así como al Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca, por la colaboración prestada en la realización de este trabajo, ya que sin su ayuda no hubiéramos podido elaborar el presente artículo.

BIBLIOGRAFÍA

1. Delatre J, Bonnefont-Rousselot D. Oxidative stress, free radicals and aging. *Bio-tech Lab Int* 1998; 3(2): 21-23.
2. Halliwell B, Gutteridge JMC. Free radicals in biology and medicine. 2ed. Oxford: Clarendon, 1989: 94-96.

3. Ansari KN. The free radicals- the hidden culprits-an update. *Indian J Med Sci* 1997; 51(9): 319-336.
4. Fernandez V, Videla LA. Biochemical aspects of cellular antioxidant systems. *Biol Res* 1996; 29(2): 177-182.
5. Pérez PL, Pérez de Alejo JS. Métodos para medir el daño oxidativo. *Rev Cub Med Mil* 2000; 29(3): 192-198.
6. Tozzi-Ciancarelli MG, Penco M, Di Massimo C. Influence of acute exercise on human platelet responsiveness: possible involvement of exercise-induced oxidative stress. *Eur J Appl Physiol* 2002; 86: 266-72.
7. Kot J. Oxidative stress during oxygen tolerance test. *Int Marit Health* 2003; 54: 117-26.
8. Pryor WA, Godber SS. Non invasive measures of oxidative stress status in human. *Free Radic Biol Med* 1991; 10: 177-84.
9. Livesey JC, Goleen RN, Shankland EG, Grunbaum Z, Wyman M, Krohn KA. Magnetic resonance spectroscopy measurement of cellular thiol reduction-oxidation state. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1992; 22: 755-7.
10. Favier A. Le stress oxidant intérêt de sa mise en évidence en biologie médicale et probleme posés par le choix d'un marqueur. *Ann Biol Clin* 1997; 55: 9-16.
11. Betbesé AJ, Pérez M, Bak E, Ballús J, Ney A, Mancebo J. Efectos gasométricos y hemodinámicas de la inhalación de óxido nítrico en pacientes con síndrome de distrés respiratorio agudo. *Med Clin (Barc)* 1996; 107: 201-206.
12. Roselaar SE, Nazhat NB, Winyard PG, Jones P, Cunningham J, Blake DR. Detection of oxidants in uremic plasma by electron spin resonance spectroscopy. *Kidney Int* 1995; 48: 199-206.
13. Parivar F, Narasimhan PT, Ross B. Renal corticomedullary metabolite gradients during graded arterial occlusion: a localized 31P magnetic resonant spectroscopy study. *J Am Soc Nephrol* 1991; 2: 200-11.
14. Weber GF. The measurements of oxygen-derived free radicals and related substances in medicine. *J Clin Chem Clin Biochem* 1990; 28: 569-603.
15. Togashi H, Shinzawa H, Matsuo T, Takeda Y, Takahashi T, Aoyama M, Oikawa K, Kamada H. Analysis of hepatic oxidative stress status by electron spin resonance spectroscopy and imaging. *Free Radic Biol Med* 2000; 28: 846-853.
16. Miura Y, Ozawa T. Noninvasive study of radiation-induced oxidative damage using in vivo electron spin resonance. *Free Radic Biol Med* 2000; 28: 854-859.
17. Kay CJ, Barber MJ. Measurement of oxidation-reduction midpoint potentials by room temperature electron paramagnetic resonance potentiometry. *Anal Biochem* 1990; 184: 11-5.
18. Harmon PA, Hendler RW, Friauf WS, Levin IW. Combination of potentiometry and resonance Raman spectroscopy for the analysis of a redox protein. *Anal Biochem* 1995; 224: 309-314.
19. Rivera M, Seetharaman R, Girdhar D, Wirtz M, Zhang X, White S. The reduction potential of cytochrome b5 is modulated by its exposed heme edge. *Biochemistry* 1998; 37: 1485-94.
20. Caldeira J, Palma PN, Regall M, Lampreia J, Calvete J, Schafer W, Legal J, Moura I, Moura JJ. Primary sequence, oxidation-reduction potentials and tertiary structure prediction of *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 27774 flavodoxin. *Eur J Biochem* 1994; 220: 987-95.
21. Millis CD, Cai DY, Stankovich MT, Tien M. Oxidation-reduction potentials and ionization states of extracellular peroxidases from the lignin-degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochemistry* 1989; 28: 8484-9.
22. Levin RL, Garland D, Oliver CN. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol* 1990; 186: 464-478.
23. Butterfield DA, Howard BJ, Yatin S. Free radicals oxidation of brain proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 674-678.
24. Marangon K, Deveraj S, Jialal I. Measurement of protein carbonyls in plasma of smokers and in oxidized LDL by an ELISA. *Clin Chem* 1999; 45: 577-578.
25. Buss H, Can T, Sluis K, Domigan N, Winterbourn C. Protein carbonyl measurement by a sensitive ELISA method. *Free Radical Biol Med* 1997; 23: 361-366.
26. Ghatak A, Brar MJ, Aganwal A, Boel N. Oxy free radical system in heart failure and therapeutic role of oral vitamin E. *Int J Cardiol* 1996; 57(2): 119-127.
27. Shigenaga MK, Gimeno C, Ames BN. Urinary 8-hidroxi-2, deoxignanosine as biological markers of in vivo oxidative DNA damage. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 9697-9701.
28. Fraga CG, Shigenaga MK, Park JW. Oxidative damage to DNA during aging. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 4533-4537.
29. Muscari C, Giaccari A, Giordano E. Role of reactive oxygen species in cardiovascular aging. *Mol Cell Biochem* 1996; 160: 150-166.
30. Visioli F, Colombo C, Balli C. Oxidation of individual fatty acids yields different profiles of oxidation markers. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 245(2): 487-489.

31. Reilly MP, Lawson JA, FitzGerald GA. Eicosanoids and isoicosanoids: induces of cellular function and oxidant stress. *J Nutr* 1998; 128(2 Suppl): 434S-438S.
32. Alessio HM. Exercise-induced oxidative stress before and alter vitamin C supplementation. *Int J Sport Nutr* 1997; 7(1): 1-9.
33. Lagendijk J, Ubbink JB, Vermaak WJ. Measurement of the ratio between the reduced and oxidized forms of coenzyme Q10 in human plasma as a possible marker of oxidative stress. *J Lipid Res* 1996; 37(1): 67-75.
34. Rimm EB. Vitamin E consumption and the risk of coronary heart disease in men. *N Engl J Med* 1994; 328: 1450-1456.
35. Pacifici RE, Davies KJA. Protein lipid and DNA repair systems in oxidative stress. *Gerontology* 1991; 37: 166-180.
36. Harnam D. Role of antioxidant nutrients in aging: over view. *Age* 1995; 18: 51-82.
37. Papas AM. Determinants of antioxidant status in humans. *Lipids* 1996; 31(Suppl): 577-582.
38. Takayama F, Egashira T. Assay for oxidative stress injury by detection of luminol-enhanced chemiluminescence. *Nippon Yakurigsako Zasshi* 1998; 111(3): 177-186.
39. Céspedes EM, Hernández I, Llópiz N. Enzimas que participan como barreras biológicas para eliminar los radicales libres: II Catalasa. *Rev Cubana Invest Biomed* 1996; 15(2): 75-81.
40. Cisneros E, Pupo J, Céspedes EM. Enzimas que participan como barreras pirio-lógicas para eliminar los radicales libres: III. Glutación peroxidasa. *Rev Cubana Invest Biomed* 1997; 16(1): 10-15.
41. Margaritis I, Palazzetti S, Rousseau A-S, Richard MJ, Favier A. Antioxidant supplementation and tapering exercise improve exercise-induced antioxidant response. *J Am Coll Nutr* 2003; 22: 147-156.
42. Palazzetti S, Richard MJ, Favier A, Margaritis I. Overloaded training increases exercise-induced oxidative stress and damage. *Can J Appl Physiol* 2003; 28: 588-604.
43. Powers SK, Hamilton K. Antioxidants and exercise. *Clin Sports Med* 1999; 18: 525-36.
44. Aguilo A, Tauler P, Fuentespina E, Tur JA, Cordova A, Pons A. Antioxidant response to oxidative stress induced by exhaustive exercise. *Physiol Behav* 2005; 84: 1-7.
45. Watson TA, MacDonald-Wicks LK, Garg ML. Oxidative stress and antioxidants in athletes undertaking regular exercise training. *Int J Sport Nutr Exerc Metab* 2005; 15: 131-146.
46. Galassetti PR, Nemet D, Pescatello A, Rose-Gottron C, Larson J, Cooper DM. Exercise, caloric restriction, and systemic oxidative stress. *J Investig Med* 2006; 54: 67-75.
47. Phillips M, Cataneo RN, Greenberg J, Grodman R, Gunawardena R, Naidu A. Effects of oxygen on breath markers of oxidative stress. *Eur Respir J* 2003; 21: 48-51.
48. Lemaitre F, Meunier N, Bedu M. Effect of air diving exposure generally encountered by recreational divers: oxidative stress? *Undersea Hyperb Med* 2002; 29: 39-49.
49. Schmetterer L, Strenn K, Kastner J, Eichler HG, Wolzt M. Exhaled NO during graded changes in inhaled oxygen in man. *Thorax* 1997; 52: 736-738.
50. Comhair SAA, Thomassen MJ, Erzurum SC. Differential induction of extracellular glutathione peroxidase and nitric oxide synthase 2 in airways of healthy individuals exposed to 100% O₂ or cigarette smoke. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2000; 23: 350-354.
51. Banfi G, Malavazos A, Iorio E, Dolci A, Doneda L, Verna R, Corsi MM. Plasma oxidative stress biomarkers, nitric oxide and heat shock protein 70 in trained elite soccer players. *Eur J Appl Physiol* 2006; 96: 483-486.