



## PROGRESOS EN GASTROENTEROLOGÍA

### Estrés oxidativo en la enfermedad de Crohn

Inés Moret<sup>a,b</sup>, Elena Cerrillo<sup>a,c</sup>, Ana Navarro-Puche<sup>a</sup>, Marisa Iborra<sup>b,c</sup>,  
Francisco Rausell<sup>a,b</sup>, Luis Tortosa<sup>a,b</sup> y Belén Beltrán<sup>b,c,\*</sup>

<sup>a</sup> Instituto de Investigación Sanitaria, Hospital La Fe, Valencia, España

<sup>b</sup> CIBEREHD, España

<sup>c</sup> Servicio de Medicina Digestiva, Hospital Universitari i Politècnic La Fe, Valencia, España

Recibido el 11 de enero de 2013; aceptado el 11 de enero de 2013

Disponible en Internet el 1 de mayo de 2013

#### PALABRAS CLAVE

Estrés oxidativo;  
Enfermedad de  
Crohn;  
Catalasa

#### KEYWORDS

Oxidative stress;  
Crohn's disease;  
Catalase

**Resumen** La enfermedad de Crohn (EC) se caracteriza por dar lugar a procesos de inflamación transmural que con mayor frecuencia se localizan en la región del íleon terminal. Aunque los mecanismos fisiopatológicos de la enfermedad no están todavía bien definidos, se ha observado que la respuesta inmunitaria no regulada está asociada a una producción elevada de especies reactivas de oxígeno (ERO). Estos elementos están relacionados con unos sistemas complejos denominados defensas antioxidantes (DAO) que tienen la función de regular los ERO, evitando así sus efectos dañinos. Sin embargo, se ha descrito ampliamente para la EC la presencia de un desequilibrio entre la producción de ERO y su eliminación por los elementos antioxidantes, originando lo que se denomina estrés oxidativo. Enmarcado en este contexto, a continuación se profundiza sobre los hallazgos más destacados relacionados con el estrés oxidativo en la mucosa intestinal y en la sangre periférica.

© 2013 Elsevier España, S.L. y AEEH y AEG. Todos los derechos reservados.

#### Oxidative stress in Crohn's disease

**Abstract** Crohn's disease (CD) is characterized by transmural inflammation that is most frequently located in the region of the terminal ileum. Although the physiopathological mechanisms of the disease are not yet well defined, the unregulated immune response is associated with high production of reactive oxygen species (ROS). These elements are associated with complex systems known as antioxidant defenses, whose function is ROS regulation, thereby preventing the harmful effects of these elements. However, the presence of an imbalance between ROS production and ROS elimination by antioxidants has been widely described and leads to oxidative stress. In this article, we describe the most significant findings on oxidative stress in the intestinal mucosa and peripheral blood.

© 2013 Elsevier España, S.L. and AEEH y AEG. All rights reserved.

\* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: [belenbeltranniclos@gmail.com](mailto:belenbeltranniclos@gmail.com) (B. Beltrán).

## Introducción

La enfermedad inflamatoria intestinal (EII) es un trastorno inflamatorio crónico del tracto gastrointestinal que comprende 2 entidades mayores, la colitis ulcerosa (CU) y la enfermedad de Crohn (EC), y cuyo curso evolutivo alterna brotes de actividad inflamatoria con períodos de remisión. La CU se caracteriza por una inflamación continua de la mucosa del colon, de extensión variable desde el recto hasta el colon proximal. Por el contrario, la EC se caracteriza por una afectación discontinua y de carácter transmural, que puede implicar cualquier tramo del tracto digestivo, aunque con localización más frecuente en el íleon terminal y en el colon.

La etiología específica de la EII continúa siendo desconocida, aunque las evidencias actuales señalan que el inicio y el desarrollo de la enfermedad es de origen multifactorial, resultado de una compleja interacción entre factores genéticos, ambientales y propios del sistema inmunitario de los pacientes. Más concretamente, se cree que la enfermedad acontece en sujetos genéticamente predispuestos como resultado de una activación inadecuada y perpetuada del sistema inmunitario de la mucosa intestinal, en respuesta a un antígeno luminal (probablemente un componente de la propia flora intestinal) y/o otros factores ambientales, que conduciría en última instancia a una pérdida de la homeostasia intestinal, y a un desequilibrio de la respuesta inmunitaria del paciente hacia la perpetuación del proceso inflamatorio<sup>1,2</sup>.

La inflamación, a su vez, es un proceso estrechamente vinculado con la producción de metabolitos reactivos, como las especies reactivas de oxígeno (ERO) y de nitrógeno (ERN), que son producidos en grandes cantidades por las células inmunes activadas que alcanzan la mucosa en la EII. En los últimos años, se ha postulado que estos metabolitos reactivos están implicados de forma directa en la destrucción tisular, sobre todo cuando existe una disminución de las defensas antioxidantes, y que desempeñen por tanto un papel etiopatogénico importante en la EII, lo que ha despertado un creciente interés en el campo del estrés oxidativo<sup>3-5</sup>. Además, estos niveles excesivos de ERO en la EII en comparación con sujetos sanos no solo se han detectado en la mucosa intestinal, sino también en leucocitos de sangre periférica y en una gran variedad de sustancias orgánicas como el plasma, el suero o la saliva y, sobre todo, en los pacientes con EC<sup>6,7</sup>. Esta mayor producción de ERO en la EII se correlaciona, además, positivamente con el grado de actividad de la enfermedad<sup>8,9</sup>. Todo ello apoya fuertemente la posibilidad de que esta alteración en la cascada antioxidante pudiera contribuir a la inducción y perpetuación del proceso inflamatorio en estos pacientes.

## Estrés oxidativo: generalidades

Las especies reactivas de oxígeno (ERO), incluyendo los radicales libres de oxígeno (RLO) y ciertos no radicales (agentes oxidantes convertibles fácilmente en radicales), son bioproductos naturales formados durante el metabolismo del oxígeno y generación de H<sub>2</sub>O. De estas especies se encuentran el anión superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), el peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y el radical hidroxilo (OH<sup>\*</sup>), principalmente.

Son moléculas especialmente reactivas debido a que en su estructura presentan electrones desapareados, sobre todo el OH<sup>\*</sup> que aparece como producto de la reacción de otras ERO con el hierro libre. También se han identificado otro tipo de especies reactivas, en este caso de nitrógeno (ERN), como son el óxido nítrico y el peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>) que presentan un interés biológico creciente, debido en gran medida a los efectos a los que también pueden dar lugar.

Fisiológicamente, se dispone de unos sistemas complejos con la función de servir de defensas antioxidantes (DAO) para regular los ERO y así evitar sus efectos dañinos. Estas defensas antioxidantes son especialmente importantes en determinados tejidos/órganos vitales, sin embargo, si se produce un desequilibrio entre la producción de ERO y su eliminación por los elementos antioxidantes, se da lugar al denominado estrés oxidativo<sup>5,10</sup>. Es importante considerar que cuando se da una situación de estrés oxidativo, las ERO pueden atacar a diversos componentes celulares, siendo los lípidos de membrana, el ADN y las proteínas los más vulnerables. La peroxidación lipídica resultante de la acción de los ERO sobre los ácidos grasos poliinsaturados presentes en la membrana lipídica dará lugar a una alteración de la actividad de diversos elementos allí localizados: enzimas transmembrana, transportadores de membrana y de receptores entre otros, efecto que en última instancia repercutirá en la homeostasia y el metabolismo celular<sup>11</sup>. Para identificar el efecto del estrés oxidativo a ese nivel, se dispone de unos biomarcadores útiles que permiten valorar el grado de peroxidación lipídica: el malondialdehído (MDA), los hidroperóxidos lipídicos y las F<sub>2</sub>-isoprostonas.

Las proteínas son componentes celulares que están presentes en abundancia por lo que son unas dianas importantes para los ERO. La oxidación proteica debida al efecto de los ERO, introduciendo nuevos grupos funcionales como hidroxilos y carbonilos, se traducirá en una modificación trascendental en su función, incluso en su degradación<sup>12</sup>. Además, se ha comprobado que los productos originados por la acción de los oxidantes clorados, resultantes de la actividad de las mieloperoxidasas de neutrófilos y macrófagos, dan lugar a unos elementos (residuos ditirosina, entrecruzamiento proteico, etc.) que participan en la perpetuación del estrés oxidativo y en la inflamación<sup>13</sup>.

También el ADN nuclear y mitocondrial es susceptible a la acción de los ERO, pudiendo resultar en transformaciones tumorales o incluso muerte celular, por ejemplo, apoptosis<sup>14</sup>. La oxidación de las bases nitrogenadas del ADN por acción de las ERO da lugar a los productos: 8-hidroxiguanina, 7,8-dihidro-8-oxo-2'-desoxiguanosina (8-oxo-dG), 8-hidroxiadenina y timina glicol, que pueden ser utilizados como indicadores del daño por estrés oxidativo sobre el ADN<sup>15,16</sup>.

Como se ha mencionado anteriormente, existen mecanismos de regulación de la presencia de ERO. Para ello se dispone de elementos antioxidantes (DAO) que van a disminuir o inhibir la oxidación. Estos elementos pueden ser tanto enzimas como elementos no enzimáticos. Estos últimos se encuentran normalmente en el compartimento extracelular y entre los mecanismos de acción que pueden presentar se incluye el quelar los iones metálicos para impedir que estos intervengan en las reacciones redox. Pertenecientes a este grupo, hay algunos componentes de la dieta que presentan propiedades antioxidantes, como son: la vitamina E que es

capaz de impedir la oxidación de los lípidos de membrana; el  $\beta$ -caroteno como secuestrador de radicales liposolubles, y la vitamina C, con función similar pero para radicales hidrosolubles<sup>17</sup>. Hay además un elemento con una función clave, el glutatión reducido, que es capaz de desarrollar una doble función. Servir de sustrato a una enzima antioxidante (glutatión peroxidasa, G-Px) y además ser capaz de quelar diversos RLO directamente<sup>18</sup>.

Sin embargo, los elementos que desarrollan un papel primordial en la defensa celular contra los RLO son las enzimas antioxidantes (EAO). Son elementos que están presentes en todas las células y que reciben los nombres de: superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (G-Px). Estas enzimas catalizan la reacción de  $O_2^-$  a  $H_2O_2$  (SOD) y de  $H_2O_2$  a  $H_2O$  (CAT y GPx). La superóxido dismutasa manganeso (Mn-SOD, SOD2) ha sido además ampliamente caracterizada como enzima antiapoptótica, efecto que ejerce frente a una amplia variedad de estímulos apoptóticos<sup>19</sup>. Este efecto antiapoptótico de la Mn-SOD se podría interpretar como que el  $O_2^-$  debe tener una implicación directa en el fenómeno apoptótico o bien, que está inhibiendo vías de supervivencia celular. No obstante, conviene señalar que el producto de la reacción de la Mn-SOD es el  $H_2O_2$ , que también está implicado en la regulación de la proliferación y la muerte celular. Este hecho ilustra la necesidad de que exista un balance entre la enzima Mn-SOD y las enzimas encargadas de eliminar el  $H_2O_2$  (CAT y G-Px fundamentalmente). En este sentido, existe evidencia en la literatura especializada de que en células que sobreexpresan la enzima Mn-SOD se produce un aumento compensatorio de la actividad G-Px como respuesta al aumento de  $H_2O_2$ . Sin embargo, este aumento compensatorio parece no implicar a la actividad CAT e incluso se ha visto, que en células resistentes a la apoptosis la expresión de la proteína CAT, así como su actividad se encuentran disminuidas<sup>20</sup>.

Con todo ello, existe suficiente evidencia científica que demuestra que los ERO realizan una función que va más allá del estrés oxidativo, pudiendo participar además en procesos de señalización intracelular: crecimiento, diferenciación y muerte celular, así como en procesos inflamatorios<sup>21</sup>. Sin embargo, quedarían por definir los mecanismos y/o tareas específicas de los ERO en la fisiología celular. Del mismo modo, la función de las EAO se entiende que va más allá del efecto de barrera defensiva, pudiendo ejercer la función de una regulación fina del estado redox celular, con repercusiones importantes en el control del ciclo celular y en la muerte celular programada o apoptosis.

La presencia de RLO o bien de los productos de su oxidación ha sido ampliamente evidenciada en las enfermedades inflamatorias intestinales (EII)<sup>5</sup>. Como se ha mencionado anteriormente, los pacientes con EC se caracterizan por presentar inflamación transmural discontinua que puede incluir cualquier porción del tracto gastrointestinal, pero que se da con mayor frecuencia en la región del íleon terminal. Aunque los mecanismos fisiopatológicos de la enfermedad no están todavía bien definidos, sí que se ha observado que la respuesta inmunitaria no regulada está asociada a una producción elevada de ERO y de especies nitrogenadas (EN) en pacientes con EC respecto a sujetos sanos estudiados como grupo control<sup>10</sup>. Resulta interesante conocer que la presencia de los ERO ha sido detectada en órganos/sistemas muy variados: tracto gastrointestinal, sangre

y sistema respiratorio<sup>5</sup>. Esto ha permitido el desarrollo de estudios sobre la EC empleando técnicas poco invasivas para la obtención de muestras<sup>22,23</sup>. En cualquier caso, la superproducción de ERO/EN y el consecuente estrés oxidativo y la modulación redox antes mencionada han sido asociados con la fisiopatología de la EII, tanto en estudios en animales como en humanos<sup>10</sup>. Enmarcado en este contexto, a continuación se profundiza sobre los hallazgos más importantes descritos en dos compartimentos tan diversos como son la mucosa intestinal y la sangre periférica.

## Estrés oxidativo en mucosa

Se ha observado que en la EC existe un denso infiltrado de células inflamatorias, especialmente macrófagos, neutrófilos y linfocitos que secretan citoquinas proinflamatorias y especies reactivas de oxígeno (ERO) que son los efectores de la cascada de la inflamación<sup>24</sup>. La producción elevada de ERO y la disminución de las enzimas antioxidantes en la mucosa intestinal de los pacientes con EC provocan la aparición de un estrés oxidativo y la consiguiente peroxidación lipídica e inflamación<sup>3,14,25</sup>. También se ha descrito que el incremento de ERO promueve la activación y la translocación del factor de transcripción proinflamatorio NF- $\kappa$ B al núcleo, debido a la fosforilación (e inactivación por ubiquitinación y degradación) de su inhibidor I $\kappa$ B $\alpha$ <sup>26</sup>.

La medida del daño oxidativo en la EII se ha basado normalmente en la valoración de la modificación oxidativa de ciertos marcadores moleculares<sup>27</sup>. La peroxidación lipídica, como se ha indicado anteriormente, viene evidenciada por el aumento en los niveles de malondialdehído (MDA) y 4 hidroxinonenal (4-HNE) en biopsias colónicas de pacientes con la enfermedad<sup>28</sup>. Otro indicador no invasivo de peroxidación lipídica es el aumento de etano y pentano en el aire exhalado de pacientes con EII<sup>29</sup>. En relación con el daño proteico, como marcador de daño oxidativo de proteínas se ha utilizado ampliamente el contenido en grupo carbonilo en células y tejidos<sup>30</sup>. En biopsias de colon de pacientes con EC el contenido del grupo carbonilo en proteínas se ha visto aumentado, así como de 3-nitrotirosina en las células mononucleares de la lámina propia principalmente<sup>31</sup>. La oxidación del ADN en la mucosa solo ha sido evaluada en un único estudio, en el que se vio un aumento de 8-hidroxid-2-desoxiguanosina, un producto de oxidación del ADN, en biopsias de pacientes<sup>32</sup>.

En muestras de mucosa obtenidas de pacientes con EII activa ha sido demostrada una síntesis elevada del mediador proinflamatorio leucotrieno B4 (LTB4) y el factor activador de plaquetas (PAF). Tanto el LTB4 como el PAF son bien conocidos que son activadores de fagocitos, los cuales una vez activados liberan gran cantidad de metabolitos citotóxicos reactivos de oxígeno al compartimento intersticial<sup>33</sup>.

Los metabolitos reactivos de nitrógeno (RNM), como el óxido nítrico (NO), también tienen un importante papel en el daño tisular. En el epitelio intestinal y en células epiteliales está presente la óxido nítrico sintasa (iNOS). iNOS se activa en presencia de factores proinflamatorios como ciertas citoquinas que se encuentran comúnmente en la EII activa. En la mucosa intestinal de pacientes con EII se ha encontrado una alta actividad de iNOS<sup>33</sup>, así como elevados

niveles de metabolitos del óxido nítrico (nitros y nitritos) en la luz colónica<sup>34</sup>.

Se ha demostrado un aumento en la formación de ERO y especies reactivas de nitrógeno (ERN) así como de biomarcadores de daño oxidativo en mucosa intestinal de pacientes con colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn. Mientras que los niveles de antioxidantes como el glutatión, coenzima Q10, glutatión S transferasa (GST), superóxido dismutasa, catalasa, paraoxonasa-1 y metalotioneína están reducidos en pacientes de EII comparados con sujetos control<sup>10</sup>.

La incapacidad para regular la activación de los macrófagos en el tejido, así como el reclutamiento y la activación de leucocitos fagocíticos adicionales, da lugar a un aumento drástico en la producción de ERO por la activación de la NADPH oxidasa.

La activación de la NADPH oxidasa resulta en la producción y liberación de grandes cantidades de superóxido  $O_2^-$  y de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ). Estas dos especies no son particularmente perjudiciales para las células, sin embargo pueden reaccionar con formas redox-activas del hierro de bajo peso molecular dando lugar al extremadamente reactivo radical hidroxilo ( $OH^*$ ). El radical hidroxilo puede reaccionar rápidamente con cualquier biomolécula. Se ha demostrado que depolimeriza la mucina gastrointestinal, produce la peroxidación de lípidos, oxida proteínas y los hidratos de carbono, así como promueve la escisión de las cadenas de ADN<sup>35</sup>.

En la mucosa dañada asociada con episodios severos de EII en la que se produce sangrado intestinal, la liberación de hemoproteínas puede dar lugar a la generación del radical hidroxilo a partir de la reacción del  $H_2O_2$  con ciertas hemoproteínas como hemoglobina y mioglobina<sup>36,37</sup>.

Los metabolitos reactivos pueden también mediar indirectamente en el daño a la mucosa alterando el equilibrio proteasas/antiproteasas que normalmente existe en el intersticio intestinal. La inactivación oxidativa de importantes inhibidores de proteasas, junto con la activación de metaloproteinasas, da lugar a un entorno favorable para elastasas, colagenasas y gelatinasas que median en la degradación de la matriz de la mucosa intersticial<sup>38</sup>.

Entre las terapias actuales empleadas en el tratamiento de la EC se encuentran los antiinflamatorios no esteroideos (por ejemplo, mesalazina), análogos esteroideos y/o moléculas inmunosupresivas. Más recientemente se han introducido nuevos tratamientos con el fin de modular la respuesta inmunitaria exacerbada, entre los que se incluyen los fármacos biológicos (anti-TNF $\alpha$ ) y pro/prebióticos capaces de favorecer la producción del butirato por las bacterias intestinales, ácido graso de cadena corta capaz de modular la transcripción de genes por presentar un doble efecto: inhibir el NF- $\kappa$ B<sup>39</sup> y activar el receptor de peroxisoma-proliferador-activado gamma (PPAR- $\gamma$ ) que pertenece al grupo de factores de transcripción regulados por ligando<sup>40</sup>. En estudios donde se ha evaluado la función del PPAR- $\gamma$  se ha demostrado que este receptor es capaz de modular el estado redox celular a la par que reprime la señalización de la vía del NF- $\kappa$ B y reduce la producción de citoquinas inflamatorias<sup>41</sup>. Cabe destacar que este receptor es capaz de modular una de las enzimas implicadas en la detoxificación celular, la enzima CAT (DAO). Este efecto se ha comprobado en experimentos en los que tras añadir agonistas del PPAR- $\gamma$  aparece un aumento de la CAT.

Estudios más recientes, encaminados a explicar este proceso, han localizado el elemento concreto (PPRE) sobre el que actúan los agonistas del PPAR- $\gamma$  para inducir la transactivación de la catalasa humana<sup>42</sup>.

Aunque los hallazgos preliminares de la intervención antioxidante son prometedores, el valor exacto de estos compuestos antioxidantes precisa una mayor investigación. Futuros estudios clínicos no solo deberían valorar la eficacia de los compuestos antioxidantes de manera individual, sino también del tratamiento combinado de los antioxidantes con los fármacos habitualmente empleados en la enfermedad (por ejemplo, mesalazina, glucocorticoides u otros agentes inmunosupresores). Además del uso individual de los antioxidantes, los beneficios clínicos de los *cocktails* de antioxidantes deberían ser evaluados, ya que los diferentes antioxidantes pueden tener como diana una vía ERO/ERN distinta. Los futuros ensayos clínicos deberían asimismo incorporar los índices de estrés oxidativo y el estado antioxidante endógeno y determinar la correlación entre la terapia antioxidante, la atenuación del estrés oxidativo y la mejora de las condiciones clínicas. De esta forma los estudios ayudarán a establecer la implicación del estrés oxidativo en la fisiopatología de la enfermedad y conducirán al desarrollo de terapias antioxidantes más efectivas. Es importante tener presente que las ERO/ERN son especies que desempeñan un importante papel fisiológico, especialmente en el sistema inmunitario innato. Por lo que el desarrollo de futuros tratamientos antioxidantes debería evitar comprometer de forma significativa la actividad fisiológica de estas especies<sup>10</sup>.

## Estrés oxidativo en sangre periférica

Actualmente se dispone de suficiente evidencia científica para afirmar que el estrés oxidativo relacionado con la EII (y la EC en concreto) no se limita únicamente a la mucosa intestinal, y que tanto la acumulación de ERO y/o los productos de su oxidación como la alteración de las DAO están presentes a nivel sistémico<sup>4,22,23,43-45</sup>.

Aunque existe bastante bibliografía al respecto, se debe considerar que los resultados obtenidos a partir de muestras de plasma y suero han dado lugar a resultados dispares. Maor et al.<sup>46</sup> encontraron que en los pacientes con EC, la enzima G-Px sérica presentaba una actividad más elevada que en los sujetos control, aunque estas diferencias desaparecían si los pacientes estudiados estaban en fase inactiva. Sin embargo, un estudio más reciente no encontró diferencias en la G-Px plasmática de pacientes con EC activa, inactiva o en controles sanos<sup>47</sup>. Incluso otro estudio observó una actividad disminuida<sup>48</sup> en los pacientes con EC. Por otro lado, aunque se ha observado que la inflamación intestinal da lugar a una disminución de las DAO, la mayoría de los estudios indican que la SOD en plasma/suero permanece inalterada o incluso incrementa su actividad<sup>49</sup>. Es también destacable que la enzima CAT ha sido la menos estudiada y de los pocos trabajos reportados hasta la fecha, se observa que la actividad de la enzima en plasma/suero está disminuida<sup>48</sup>.

De lo expuesto anteriormente, hay que constatar que son resultados tan diversos posiblemente debido a sesgos relacionados con la naturaleza de la muestra utilizada.

La SOD1, GPx1 y CAT están predominantemente en el espacio intracelular y aunque se ha postulado que la CAT puede ser liberada al torrente sanguíneo como parte de la respuesta inflamatoria<sup>50</sup> y que algunas isoformas de la G-Px (GPx3) y de la SOD (SOD3) pueden estar presentes extracelularmente<sup>51,52</sup>, la medida de la actividad de estas enzimas directamente en muestras de plasma/suero no parece correlacionarse con la actividad intracelular real<sup>48</sup>. Por lo tanto, emplear células de sangre periférica para determinar la actividad de estas enzimas en la EC parece ser lo más adecuado.

El estudio en profundidad de las células inmunitarias, en concreto de los neutrófilos, que son de las primeras células inmunitarias que migran al lugar de la infección y por tanto contribuyen en gran medida al proceso de respuesta inmunitaria sostenida, ha evidenciado<sup>24</sup> que existe una importante alteración del metabolismo del glutatión (GSH), con un incremento del estrés oxidativo intracelular (aumento de la actividad de la enzima NADPH oxidasa e incremento de las ERN). Incluso se ha podido relacionar la deficiencia del GSH en las células inmunitarias con el incremento de transcripción mediada por el NF- $\kappa$ B y el incremento de las citoquinas proinflamatorias<sup>53</sup>.

Por tanto, parece que las células inmunitarias periféricas de los pacientes con EC presentan una alteración de la capacidad para producir ERO y además se considera que esta alteración, que implica una respuesta inmunitaria anormal, ocurre antes de que las células lleguen a la mucosa intestinal<sup>54</sup>.

A este respecto, nuestro grupo ha caracterizado el estrés oxidativo de los linfocitos de sangre periférica de los pacientes con EC<sup>22,23</sup>. Hemos observado que, tanto en fase de actividad clínica de la enfermedad como en fase inactiva o de remisión, los linfocitos presentan un incremento significativo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Puesto que el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es el producto de la metabolización del O<sub>2</sub><sup>-</sup>, este incremento debe proceder del incremento de O<sub>2</sub><sup>-</sup>. El incremento de la producción de O<sub>2</sub><sup>-</sup> conlleva un aumento de la enzima SOD, efecto que ha sido observado también en las células mononucleares de sangre periférica<sup>23</sup>. Pero además, para evitar que el radical se acumule, el aumento de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> debería llevar asociado un incremento de sus enzimas detoxificantes. Sin embargo, la determinación de la enzima CAT mostró una inhibición permanente en los pacientes con EC. Otros estudios<sup>26</sup> han observado que la enzima G-Px de los pacientes con EC sí que está aumentada, lo que debería ayudar a detoxificar el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Estos resultados, que coinciden con las observaciones realizadas en nuestro laboratorio, ponen de manifiesto que el estrés oxidativo existe, pues el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no se consigue eliminar por completo (a pesar del incremento en la actividad de la enzima G-Px) y es detectable de forma significativa en los pacientes con EC activa.

El estrés oxidativo existente en las células de los pacientes con EC en brote activo genera un daño oxidativo demostrado también por un aumento de la peroxidación lipídica (detección de MDA) y de daño sobre el DNA (detección de 8-oxo-guanosina)<sup>23</sup>. Los experimentos realizados con linfocitos de pacientes en remisión demostraron que la inhibición de la enzima CAT es persistente e independiente de la actividad de la EC. Además, el daño oxidativo detectado (MDA, 8-oxo-guanosina) no se recuperaba al conseguir la remisión de la enfermedad.

Conviene recordar que el papel de la enzima CAT debe ser más complejo que el de solo ayudar a la detoxificación del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Aunque se ha profundizado poco sobre el tema, si que se conoce que la CAT puede estar ejerciendo un papel regulador de la fisiopatología, observándose en la EC autoanticuerpos anticitoplasma de neutrófilo (ANCA) dirigidos específicamente contra la CAT. También se ha observado que el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como ERO relacionada directamente con la catalasa y regulada por esta, en concentraciones subletales, interviene en el proceso apoptótico<sup>55</sup>. En este contexto, el aumento de la concentración intracelular de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (sin llegar a ser citotóxico) es capaz de inhibir la formación del apoptosoma (relacionado con la liberación del citocromo C mitocondrial), y por tanto de la apoptosis, ante una señalización extracelular mediada por el estímulo apoptótico Fas<sup>56</sup>. Del mismo modo, este radical, generado vía inducción de la SOD-Mn determina una resistencia al efecto citotóxico del TNF- $\alpha$ , que a su vez pertenece a la familia de los «death receptors» donde también se incluye el Fas. Además, en el caso de los linfocitos y monocitos, el aumento de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se correlaciona significativamente con algunos marcadores de inflamación, como la PCR y el fibrinógeno, lo que indica que la inflamación es más acusada a medida que aumenta la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en estas células.

Por todo ello, la inhibición persistente de la enzima CAT debe estar ejerciendo una función importante sobre el desarrollo de un estrés oxidativo lesivo y permanente en las células mononucleares de los pacientes con EC. Pero además, su posible relación con la inhibición de la apoptosis observada en esas células pone de manifiesto el interés de explorar esta vía como diana terapéutica. Esto también está justificado por la reversión de la apoptosis en los pacientes con EC tras el tratamiento con fármacos (anti-TNF $\alpha$ , etc.) y que resulta en una clara mejoría clínica de los pacientes.

## Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

## Agradecimientos

Una parte de los resultados recogidos en esta revisión ha sido financiada con (PI06/0730, P509/01827, CA10/01027) y por el CIBER de Enfermedades Hepáticas y Digestivas que es una iniciativa del Instituto de Salud Carlos III (ISCIII).

## Bibliografía

1. Xavier RJ, Podolsky DK. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature*. 2007;448:427–34.
2. Packey CD, Sartor RB. Interplay of commensal and pathogenic bacteria, genetic mutations, and immunoregulatory defects in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases. *J Intern Med*. 2008;263:597–606.
3. Kruidenier L, Kuiper I, Lamers CB, Verspaget HW. Intestinal oxidative damage in inflammatory bowel disease: semi-quantification, localization, and association with mucosal antioxidants. *J Pathol*. 2003;201:28–36.
4. Kruidenier L, Kuiper I, van Duijn W, Mieremet-Ooms MA, van Hogezaand RA, Lamers CB, et al. Imbalanced secondary mucosal antioxidant response in inflammatory bowel disease. *J Pathol*. 2003;201:17–27.

5. Rezaie A, Parker RD, Abdollahi M. Oxidative stress and pathogenesis of inflammatory bowel disease: an epiphenomenon or the cause. *Dig Dis Sci*. 2007;52:2015–21.
6. Tüzün A, Erdil A, Inal V, Aydin A, Bağcı S, Yeşilova Z, et al. Oxidative stress and antioxidant capacity in patients with inflammatory bowel disease. *Clin Biochem*. 2002;35:569–72.
7. Rezaie A, Ghorbani F, Eshgortk A, Zamani MJ, Dehghan G, Taghavi B, et al. Alterations in salivary antioxidants, nitric oxide, and transforming growth factor-beta 1 in relation to disease activity in Crohn's disease patients. *Ann N Y Acad Sci*. 2006;1091:110–22.
8. Simmonds NJ, Allen RE, Stevens TR, van Someren RN, Blake DR, Rampton DS. Chemiluminescence assay of mucosal reactive oxygen metabolites in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 1992;103:186–96.
9. Lih-Brody L, Powell SR, Collier KP, Reddy GM, Cerchia R, Kahn E, et al. Increased oxidative stress and decreased antioxidant defenses in mucosa of inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci*. 1996;41:2078–86.
10. Zhu H, Li R. Oxidative stress and redox signaling mechanisms of inflammatory bowel disease: updated experimental and clinical evidence. *Exp Biol Med*. 2012;237:474–80.
11. Chen JJ, Bertrand H, Yu BP. Inhibition of adenine nucleotide translocator by lipid peroxidation products. *Free Radic Biol Med*. 1995;19:583–90.
12. Dean RT, Fu S, Stocker R, Davies MJ. Biochemistry and pathology of radical mediated protein oxidation. *Biochem J*. 1997;324:1–18.
13. Krzystek-Korpacka M, Neubauer K, Berdowska I, Boehm D, Zielinski B, Petryszyn P, et al. Enhanced Formation of Advanced Oxidation Protein Products in IBD. *Inflamm Bowel Dis*. 2008;14:794–802.
14. Kruidenier L, Verspaget HW. Review article: oxidative stress as a pathogenic factor in inflammatory bowel disease—radicals or ridiculous. *Aliment Pharmacol Ther*. 2002;16:1997–2015.
15. Cathcart R, Schwiers E, Saul RL, Ames BN. Thymine glycol and thymidine glycol in human and rat urine: a possible assay for oxidative DNA damage. *PNAS*. 1984;81:5633–7.
16. Shigenaga MK, Gimeno CJ, Ames BN. Urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine as a biological marker of in vivo oxidative DNA damage. *PNAS*. 1989;86:9697–701.
17. Gutteridge JM. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem*. 1995;41:1819–28.
18. Jefferies H, Coster J, Khalil A, Bot J, McCauley RD, Hall JC. Glutathione. *ANZ J Surg*. 2003;73:517–22.
19. Bernard D, Quatannens B, Begue A, Vandebunder B, Abbadie C. Antiproliferative and antiapoptotic effects of cRel may occur within the same cells via the up-regulation of manganese superoxide dismutase. *Cancer Res*. 2001;61:2656–64.
20. Chovolou Y, Watjen W, Kampkotter A, Kahl R. Resistance to Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )-induced apoptosis in rat hepatoma cells expressing TNF- $\alpha$  is linked to low antioxidant enzyme expression. *J Biol Chem*. 2003;278:29626–32.
21. Herrlich B, Bohmer FD. Redox regulation of signal transduction in mammalian cells. *Biochem Pharmacol*. 2000;59:35–41.
22. Iborra M, Moret I, Rausell F, Bastida G, Aguas M, Cerrillo E, et al. Role of oxidative stress and antioxidant enzymes in Crohn's disease. *Biochem Soc Trans*. 2011;39:1102–6.
23. Beltrán B, Nos P, Dasí F, Iborra M, Bastida G, Martínez M, et al. Mitochondrial dysfunction, persistent oxidative damage, and catalase inhibition in immune cells of naïve and treated Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2010;16:76–86.
24. Biagioni C, Favilli F, Catarzi S, Marcucci T, Fazi M, Tonelli F, et al. Redox state and O<sub>2</sub>- production in neutrophils of Crohn's disease patients. *Exp Biol Med*. 2006;231:186–95.
25. Russo I, Luciani A, De Cicco P, Troncone E, Ciacci C. Butyrate attenuates lipopolysaccharide-induced inflammation in intestinal cells and Crohn's mucosa through modulation of anti-oxidant defense machinery. *PLoS One*. 2012;7:e32841.
26. Gloire G, Legrand-Poels S, Piette J. NF-kappa B activation by reactive oxygen species: fifteen years later. *Biochem Pharmacol*. 2006;72:1493–505.
27. Rumley AG, Paterson JR. Analytical aspects of antioxidants and free radical activity in clinical biochemistry. *Ann Clin Biochem*. 1998;35:181–200.
28. Chiarpotto E, Scavazza A, Leonarduzzi G, Camandola S, Biasi F, Teggia PM, et al. Oxidative damage and transforming growth factor beta 1 in pretumoral and tumoral lesions of human intestine. *Free Rad Biol Med*. 1997;22:889–94.
29. Sedghi S, Keshavarzian A, Klamut M, Eiznhamer D, Zarlign EJ. Elevated breath ethane levels in active ulcerative colitis: evidence for excessive lipid peroxidation. *Am J Gastroenterol*. 1994;89:2217–21.
30. Chevion M, Berenshtein E, Stadtman ER. Human studies related to protein oxidation: protein carbonyl content as a marker of damage. *Free Rad Res*. 2000;33:599–108.
31. Singer II, Kawka DW, Scott S, Weidner JR, Mumford RA, Riehl TE, et al. Expression of inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine in colonic epithelium in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 1996;111:871–85.
32. Lih-Brody L, Powell SR, Collier KP, Reddy GM, Cerchia R, Kahn E, et al. Increased oxidative stress and decreased antioxidant defenses in mucosa of inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci*. 1996;41:2078–86.
33. Almenier HA, Al Menshawy HH, Maher MM, Al Gamal S. Oxidative stress and inflammatory bowel disease. *Front Biosci (Elite Ed)*. 2012;4:1335–44.
34. Oudkerk Pool M, Bouma G, Visser JJ, Kolkman JJ, Tran DD, Meuwissen SG, et al. Serum nitrate levels in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Scand J Gastroenterol*. 1995;30:784–8.
35. Harris ML, Schiller HJ, Reilly PM, Donowitz M, Grisham MB, Bulkley GB. Free radicals and other reactive oxygen metabolites in inflammatory bowel disease: cause, consequence or epiphenomenon? *Pharmacol Ther*. 1992;53:375–408.
36. Alayash AI, Patel RP, Cashion RE. Redox reactions of hemoglobin and myoglobin: biological and toxicological implications. *Antioxid Redox Signal*. 2001;3:313–27.
37. Jour'd'Heuil D, Mills L, Miles AM, Grisham MB. Effect of nitric oxide on hemoprotein-catalyzed oxidative reactions. *Nitric Oxide*. 1998;2:37–44.
38. Pavlick KP, Laroux FS, Fuseler J, Wolf RE, Gray L, Hoffman J, et al. Role of reactive metabolites of oxygen and nitrogen in inflammatory bowel disease. *Free Radic Biol Med*. 2002;33:311–22.
39. Segain JP, Raingeard de la Blétière D, Bourreille A, Leray V, Gervois N, Rosales C, et al. Butyrate inhibits inflammatory responses through NF-kappa B inhibition: implications for Crohn's disease. *Gut*. 2000;47:397–403.
40. Kinoshita M, Suzuki Y, Saito Y. Butyrate reduces colonic paracellular permeability by enhancing PPAR gamma activation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000;293:827–31.
41. Poynter ME, Daynes RA. Peroxisome Proliferator-activated Receptor alpha activation modulates cellular redox status, represses nuclear factor-kB signaling and reduces inflammatory cytokine production in aging. *J Biol Chem*. 1998;273:32833–41.
42. Okuno Y, Matsuda M, Miyata Y, Fukuhara A, Komuro R, Shimabukuro M, et al. Human catalase gene is regulated by peroxisome proliferator activated receptor through a response element distinct from that of mouse. *Endocr J*. 2010;57:303–9.
43. D'Odorico A, Bortolan S, Cardin R, D'Inca' R, Martines D, Ferronato A, et al. Reduced plasma antioxidant concentrations and increased oxidative DNA damage in inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol*. 2001;36:1289–94.

44. Boehm D, Krzystek-Korpacka M, Neubauer K, Matusiewicz M, Berdowska I, Zielinski B, et al. Paraoxonase-1 status in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis.* 2009;15:93–9.
45. Koutroubakis IE, Malliaraki N, Dimoulios PD, Karmiris K, Castanas E, Kouroumalis EA. Decreased total and corrected antioxidant capacity in patients with inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci.* 2004;49:1433–7.
46. Maor I, Rainis T, Lanir A, Lavy A. Oxidative stress, inflammation and neutrophil superoxide release in patients with Crohn's disease: distinction between active and non-active disease. *Dig Dis Sci.* 2008;53:2208–14.
47. Akman T, Akarsu M, Akpınar H, Resmi H, Sezer E. Erythrocyte deformability and oxidative stress in inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci.* 2012;57:464–548.
48. Krzystek-Korpacka M, Neubauer K, Berdowska I, Zielinski B, Paradowski L, Gamian A. Impaired erythrocyte antioxidant defense in active inflammatory bowel disease: impact of anemia and treatment. *Inflamm Bowel Dis.* 2010;16:1467–75.
49. Dincer Y, Erzin Y, Himmetoglu S, Gunes KN, Bal K, Akcay T. Oxidative DNA damage and antioxidant activity in patients with inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci.* 2007;52:1636–41.
50. Yasmineh WG, Theologides A. Catalase as a roving scavenger of hydrogen peroxide: a hypothesis. *J Lab Clin Med.* 1993;122:110–4.
51. Rush JW, Sandiford SD. Plasma glutathione peroxidase in healthy young adults: influence of gender and physical activity. *Clin Biochem.* 2003;36:345–51.
52. Zelko IN, Mariani TJ, Folz RJ. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radic Biol Med.* 2002;33:337–49.
53. Pena LR, Hill DB, McClain CJ. Treatment with glutathione precursor decreases cytokine activity. *J Parenter Enteral Nutr.* 1999;23:1–6.
54. Kitahora T, Suzuki K, Asakura H, Yoshida T, Suematsu M, Watanabe M, et al. Active oxygen species generated by monocytes and polymorphonuclear cells in Crohn's disease. *Dig Dis Sci.* 1988;33:951–5.
55. Moret I, Rausell F, Iborra M, Bastida G, Aguas M, Tortosa L, et al. Apoptosis resistance of Crohn's disease blood T-cells depends on catalase activity inhibition. *Gastroenterology.* 2012;142:885.
56. Kim H, Kim YN, Kim H, Kim CW. Oxidative stress attenuates Fas-mediated apoptosis in Jurkat T cell line through Bfl-1 induction. *Oncogene.* 2005;24:1252–61.