



Vías de señalización de calcio y especies reactivas de oxígeno.

Artículo de revisión bibliográfica.
Ciclo de Metodología Científica II-2022. Grupo 37.

INTEGRANTES

Betina Bevilacqua¹
Karla Bonavota¹
Hernán Melo¹
Maria Victoria Linares¹
Paula Pintos¹
Mateo Schaffner¹

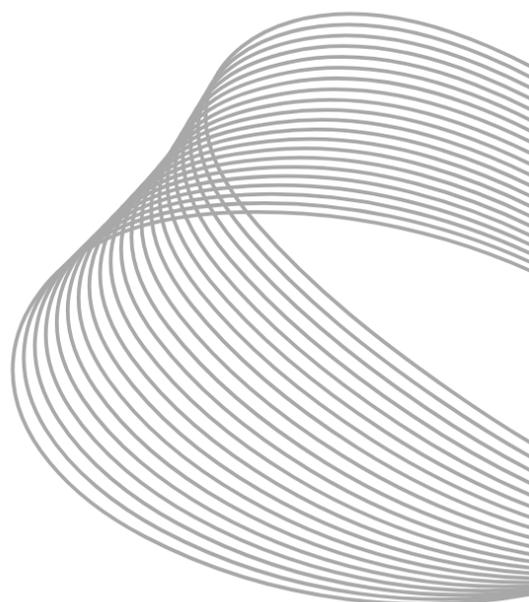
TUTOR

Cristian Justet²

AFILIACIONES

1 - Ciclo de Metodología Científica II 2022-Facultad de Medicina - Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.

2 - Departamento de Bioquímica-Facultad de Medicina - Universidad de la República, Montevideo, Uruguay



Índice de contenidos:

Resumen/Abstract	3
1. Objetivo	4
2. Metodología de búsqueda	4
Conflicto de intereses	4
Notas al pie	4
3. Especies reactivas del oxígeno	5
3.1. Sistema antioxidante	8
<i>Figura 2: Principales reacciones del sistema antioxidante.</i>	8
<i>Figura 3: Homeostasis celulares de Ca²⁺ y ROS.</i>	11
4. Calcio	11
4.1. Homeostasis y señalización	11
4.2. Ca ²⁺ y ROS	14
<i>Figura 4: Reacción catalizada y cofactores de la NOS.</i>	15
5. Mitocondria	16
6. Modelos biológicos: Interacciones de ROS y de Ca²⁺ en el organismo	17
6.1 Enfermedades neurodegenerativas	17
<i>nNOS, ·NO y Ca²⁺</i>	18
<i>Figura 5: Activación y desactivación de nNOS en las células neuronales.</i>	19
6.2 Reproducción	19
6.3 Cardiovascular	22
<i>Aneurisma de Aorta</i>	22
<i>Figura 6: Mecanismo mediante Kallistatina atenúa la AAA.</i>	23
6.4 Cáncer	23
6.5 Inflamación: alteración de la barrera endotelial	24
<i>Figura 7: Modelo de señalización de ROS (H₂O₂) que regula la permeabilidad del endotelio.</i>	26
7. Discusión	26
8. Conclusiones y perspectiva	27
9. Bibliografía	28

Resumen

Las especies reactivas del oxígeno (ROS) son moléculas que, en un comienzo, fueron consideradas como dañinas en nuestro organismo. Esta asociación se debe a que se vinculan con el estrés oxidativo (OS, por su nombre en inglés "Oxidative Stress") y el daño celular. Actualmente se sabe que, más allá del OS, cumplen un rol imprescindible en numerosas vías de señalización celular. Asimismo, el Ca^{2+} es considerado uno de los segundos mensajeros más destacados del organismo. Presenta la capacidad de estimular o inhibir diversas vías moleculares dependiendo de varios factores, como la expresión diferencial de proteínas en la célula, la localización subcelular del incremento de Ca^{2+} y la duración de la señal. Las señales de Ca^{2+} pueden inducir un amplio espectro de efectos, desde la contracción de la fibra muscular, activación de la transcripción, exocitosis, entre otras funciones. Un gran número de vías utilizan las ROS y el Ca^{2+} como señalizadores que median un correcto funcionamiento celular. En consecuencia, las condiciones que provocan la disfunción de una de estas vías de señalización, afectan a otras de manera consecutiva y tienen como resultado el desarrollo de patologías.

En el presente trabajo se plantea estudiar la relación de las ROS, con las vías de señalización de Ca^{2+} y destacar cómo esta interacción puede tomar un papel fisiológico o patológico. En virtud de la gran variedad y efecto de las ROS, se hará énfasis en especial en el superóxido ($\text{O}_2 \cdot^-$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y óxido nítrico ($\cdot\text{NO}$).

Palabras claves: Especies reactivas de oxígeno, calcio, mitocondria.

Abstract

Reactive oxygen species (ROS) are molecules that, at the beginning, were considered harmful. This association is due to they have been linked to oxidative stress (OS) and cell damage. It is currently known that, beyond the OS, they play an essential role in numerous cell signaling pathways. Likewise, Ca^{2+} is considered one of the most important second messengers in the body. Its action depends on the proteins expressed by the cell, the subcellular localization of the increase in Ca^{2+} and the duration of the signal. The increase in cytosolic Ca^{2+} can induce a wide spectrum of effects, from muscle fiber contraction, transcription activation, exocytosis, among other functions. A large number of pathways use ROS and Ca^{2+} as signalers that mediate proper cell function. Conditions that cause dysfunction of one of these signaling pathways, consecutively affects the other and result in the development of pathologies.

In the present work, it is proposed to study the relationship of ROS with Ca^{2+} signaling pathways and highlight how this interaction can take on a physiological or pathological role.

Keywords: Reactive oxygen species, calcium, mitochondria.

1. Objetivo

Realizar una revisión bibliográfica de las vías de señalización de calcio y especies reactivas de oxígeno (ROS, por su nombre en inglés “Reactive oxygen species”), con especial énfasis en su interrelación.

2. Metodología de búsqueda

Se realizó una búsqueda dirigida en Pubmed inicial con el criterio de búsqueda “Reactive oxygen species” AND “calcium signaling” ambos en título.

Como criterios de exclusión se utilizaron revisiones comprendidas entre los últimos 25 años, como tipo de publicación “Review” y “Papers”, excluyéndose trabajos realizados en plantas (NOT plants) o en procariontes (NOT prokaryotic cells), recopilando artículos de los cuales se hizo una selección más puntual según título, resumen y metodología de cada uno.

Una nueva búsqueda se realizará agregando los criterios “NADPH oxidase” OR “nitric oxide synthase” en título, a los antes mencionados. Posteriormente se realizará otra búsqueda de artículos orientada a los sistemas biológicos con los criterios de “Reactive oxygen species derivated” también en Pubmed.

Se complementa la búsqueda con los mismos criterios antes mencionados en plataformas como “google académico”, “Scielo” y “Colibrí” recopilando artículos que serán incluidos en la revisión.

Esta revisión no involucra investigación en seres humanos ni experimentos en animales.

Conflicto de intereses

Se declara la inexistencia de conflicto de intereses.

Notas al pie

Estos autores contribuyeron igualmente al trabajo.

3. Especies reactivas del oxígeno

El grupo de las especies reactivas del oxígeno, es el término colectivo para especies derivadas del O_2 que son más reactivas que el O_2 en sí mismo, esto incluye radicales libres y derivados no radicales (1). En virtud de que las ROS abarcan un conjunto muy amplio de moléculas y su revisión exhaustiva excede los objetivos de la monografía, esta revisión estará acotada principalmente al superóxido ($O_2^{\cdot -}$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), óxido nítrico ($\cdot NO$) y peroxinitrito ($ONOO^{\cdot}$).

Según el tipo, la concentración y la reactividad hacia componentes celulares específicos, funcionan como moléculas de señalización o introducen un estrés oxidativo potencialmente dañino en la célula. El equilibrio redox debe mantenerse bajo estricto control para evitar una acumulación excesiva y el agotamiento de ROS, lo que puede resultar en disfunción celular y diversas patologías. Dentro de sus actividades fisiológicas podemos encontrar que la oxidación inducida por ROS en los grupos tiol de los residuos de cisteína es una herramienta de control de la proliferación celular, la respuesta inmunitaria y el envejecimiento (2). Asimismo, se ha observado que la exposición a altos niveles de ROS tiene un resultado dañino a proteínas, lípidos y ADN, especialmente el ADN mitocondrial (ADNmt) por su falta de histonas y mecanismos de reparación (3).

La formación de ROS puede ocurrir en forma endógena por varios mecanismos diferentes. El $O_2^{\cdot -}$ es una ROS muy importante en la fisiología y patología. Se considera que una proporción muy importante se forma como resultado de la fuga de electrones de la cadena de transporte de electrones (ETC, del inglés Electron Transport Chain), durante la fosforilación oxidativa en las mitocondrias. En los complejos I (NADH deshidrogenasa) y III (ubiquinona citocromo c reductasa), los electrones escapan de la ETC reduciendo el O_2 a aniones $O_2^{\cdot -}$ (4). En virtud de que el $O_2^{\cdot -}$ se forma en el espacio intermembrana, no ingresa a la matriz mitocondrial debido a que no puede atravesar la membrana mitocondrial interna.

Además de este sitio, la producción se puede dar por medio de la piruvato deshidrogenasa; que convierte el piruvato en acetil coenzima A; la Δ -cetoglutarato deshidrogenasa; siendo capaz de catalizar la oxidación de NADH por O_2 con la formación concomitante de H_2O_2 (5); y la monoamino oxidasa; que mediante su desaminación oxidativa, produce los correspondientes aldehídos y H_2O_2 como subproductos (6).

Dentro de las fuentes exógenas de producción de ROS participan componentes ambientales como los contaminantes del aire, humo de tabaco, metales pesados, luz ultravioleta, fármacos,

drogas y alcohol (3). En relación al alcohol se ha observado que podría acelerar la producción de subproductos tóxicos, incluidas las ROS.

Las ROS reaccionan con diferentes metabolitos y macromoléculas de las células del hígado, generando daño oxidativo. La producción excesiva de ROS en el hígado es el principal factor etiológico de la intoxicación por alcohol con agotamiento severo de antioxidantes endógenos como el glutatión. Por lo tanto, reponer el poder reductor es el principal antídoto para el tratamiento de la intoxicación por alcohol (7).

Una de las principales fuentes de ROS exógenas se da por formación secundaria a procesos de desintoxicación de sustancias mediado por el sistema citocromo p450 (CYP, por su sigla en inglés "Cytochrome P450 enzymes") (8).

La CYP es una familia de enzimas que se encarga de la eliminación de xenobióticos del organismo. Esta desintoxicación genera secundariamente la formación de H_2O_2 , el cual se produce debido a la liberación del radical anión $O_2^{\cdot -}$ por la disociación del complejo ternario de un electrón reducido y la protonación del CYP (9) (Ver figura 1). La expresión del gen de dicha enzima se activa por la presencia del sustrato. A su vez, se encuentra mediada por diferentes receptores xenobióticos como son: receptor del hidrocarburo arilo, pregnant X receptor y receptor de androstano constitutivo (10). Los receptores de los xenobióticos se encuentran en la mitocondria asociados a chaperonas. La interacción de los receptores con ligandos (sustancias tóxicas como el alcohol) induce la liberación del complejo. Posteriormente se translocan al núcleo donde actúan como factores de transcripción en la secuencia que regula la expresión de CYP (8).

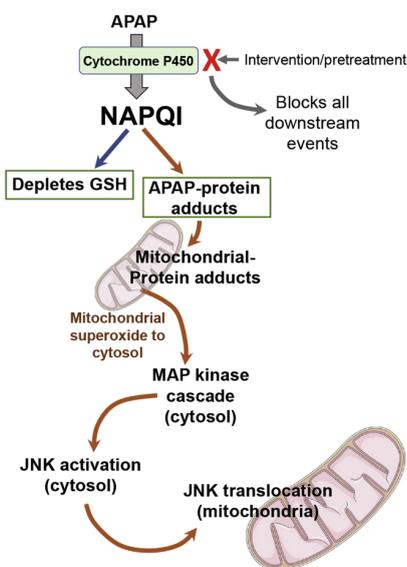


Figura 1: Secuencia de regulación de la expresión de CYP. (11)

3.1. Sistema antioxidante

El sistema antioxidante se puede dividir en endógeno o enzimático, compuesto por enzimas o pequeñas moléculas, y exógeno o no enzimático, compuesto por vitaminas, minerales, ácidos fenólicos (8). El sistema antioxidante enzimático se encuentra formado por diferentes enzimas: superóxido dismutasa (SOD, por sus siglas en inglés "Superoxide dismutase"), catalasa (CAT, por su nombre en inglés "Catalase"), glutatión peroxidasa (GPx por su sigla en inglés "Glutathione peroxidase") y la tiorredoxina (Trx, por su nombre en inglés "Thioredoxin"), entre otras. Las peroxidasas son las encargadas de reducir peróxidos con un residuo de cisteína conservado, el cual sirve como centro de oxidación por peróxidos (12).

Las SOD y las CAT son los principales antioxidantes in vivo. Se cree que las SOD son de primera línea, debido a que una de las funciones de dicha enzima es catalizar la dismutación del radical $O_2^{\cdot-}$ convirtiéndolo en O_2 y H_2O_2 (13). La gran mayoría de los organismos que viven en presencia de O_2 expresan al menos una SOD. Tres clases de SOD han evolucionado en varios organismos que poseen diferentes iones metálicos catalíticos: Cu/Zn SOD, Mn-SOD, Fe-SOD y Ni-SOD. Los eucariotas solo expresan Cu/Zn SOD (en el citoplasma y extracelularmente) y Mn SOD (en la mitocondria) (14). Posteriormente el H_2O_2 formado por la SOD es catalizado por la catalasa convirtiéndose en agua y O_2 (8). En cambio el rol de la GPx se encuentra mediado por el glutatión como reductor para catalizar el H_2O_2 en H_2O (15) (Ver figura 2).

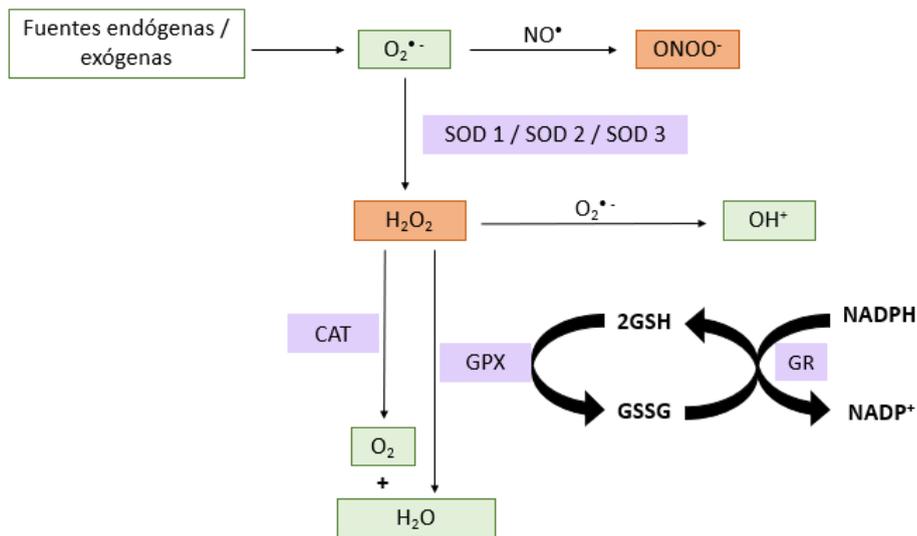


Figura 2: Principales reacciones del sistema antioxidante.

A su vez, las SOD tienen un rol mitocondrial. Debido a que, como se mencionó previamente, en la mitocondria se produce gran cantidad de $O_2^{\cdot-}$ debido al escape de electrones desde los

complejos I y III para reaccionar en forma directa con el O_2 , es necesario la existencia de un sistema antioxidante mitocondrial robusto. En este organelo se expresa localmente la Mn-SOD cuya constante catalítica es muy elevada, indicando una eficiencia alta. La producción de un exceso de $O_2^{\cdot -}$ en las mitocondrias estimula el incremento de la expresión de las Mn-SOD para inhibir así el daño celular. A su vez, el exceso de ROS aumenta la permeabilidad mitocondrial permitiendo la liberación de factores proapoptóticos y activando la vía de muerte celular por apoptosis (16).

Las NADPH oxidasas (NOX) representan una familia de siete isoformas enzimáticas diferentes: NOX1–5 y DUOX1–2. Son proteínas que transfieren electrones a través de las membranas biológicas. En general, el aceptor de electrones es el O_2 y el producto de la reacción de transferencia de electrones es el $O_2^{\cdot -}$. La función biológica de las enzimas NOX es, por tanto, la generación de ROS. Estas enzimas utilizan NADPH como donante de electrones para reducir el O_2 a anión radical $O_2^{\cdot -}$ de acuerdo con la siguiente reacción:



Las NADPH oxidasas duales (DUOX) son enzimas bidireccionales que catalizan la formación de H_2O_2 a partir de O_2 y NADPH o consumen el H_2O_2 y $NADP^+$ para dar O_2 (17).

El sistema antioxidante tiorredoxina se encuentra formado por: NADPH, tiorredoxina reductasa y tiorredoxina. Su función es la reparación del ADN y proteínas al reducir a la ribonucleótido reductasa y a la metionina sulfóxido reductasa (18).

La Trx posee proteínas de unión denominadas ASK1 (por su nombre en inglés “apoptosis signal-regulating kinase 1”) y TBP-2 (por su nombre en inglés “Thioredoxin-Binding Protein-2”), con las cuales actúan en el control de la apoptosis o el estado de los metabolitos como los carbohidratos y proteínas. Se ha observado que las Trx son capaces de controlar el estrés oxidativo debido a que pueden eliminar las ROS (19). Las Trxs presentan un rol importante en la apoptosis. Cuando la Trx se encuentra reducida se une a la proteína de unión ASK1 inhibiendo la apoptosis, pero cuando la misma es oxidada se disocia de ASK1 y se provoca la muerte celular (8). La ASK1 es un miembro de la familia de proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAP3Ks, por su nombre en inglés “Mitogen activated protein kinase”). Es activada por varios factores estresantes, como las ROS, el factor de necrosis tumoral (TNF, por su nombre en inglés “Tumor necrosis factor”), el estrés del retículo endoplásmico y los lipopolisacáridos, situando a ASK1 como un nodo de señalización en el que convergen diferentes estresores (20). La TBP-2 tiene un papel importante en el sistema redox, así como en diferentes enfermedades,

influyendo en la proliferación celular, diferenciación, apoptosis, autofagia y metabolismo. En varios trabajos se ha encontrado evidencia que indica que la función principal de TBP-2 es asociarse con Trx. Los hallazgos sugieren que esta interacción bloquea la función antioxidante de Trx. Asimismo, se han obtenido resultados que muestran que TBP-2 promueve el desarrollo de enfermedades que están involucradas en el daño inflamatorio y oxidativo (21).

En dichos trabajos se ha evidenciado que las ROS provocan el incremento de expresión de genes antioxidantes. Las ROS inducen la disociación de NRF2 (Por su nombre en inglés "Nuclear Factor Erythroid 2") del complejo que lo mantiene secuestrado en el citosol, mediante oxidación de residuos de cisteína claves. Esto permite la translocación al núcleo y su asociación con el ADN, a los elementos sensibles a los antioxidantes (AREs, por su nombre en inglés "antioxidant responsive elements") que activan los promotores objetivo (2,22).

El sistema antioxidante no enzimático se encuentra formado por: vitamina A, vitamina C, vitamina E, minerales, metabolitos y flavonoides (8). La vitamina A (retinol) puede reaccionar de forma directa con radicales peroxilo previo a que se produzca la peroxidación de los lípidos (23). La vitamina C por su capacidad como potente antioxidante hidrofílico, se cree que es de gran importancia para la protección contra procesos degenerativos causados por OS, siendo eficaz en la eliminación del $O_2 \cdot^-$, H_2O_2 , radical hidroxilo ($\cdot OH$), oxígeno singulete y $\cdot NO$ (24). La vitamina E puede detener la peroxidación lipídica debido a que dona su hidrógeno fenólico a los radicales peroxilos, esto permite la formación de radicales tocoferoxilo perdiendo así la capacidad reactiva, deteniendo la reacción de la cadena oxidativa (25). Dicha vitamina puede regenerarse de la vitamina C (8).

En complemento con esto, hay minerales como el selenio y el zinc que tienen un papel importante como antioxidante, debido a su rol como grupos prostéticos manteniendo la actividad de algunas enzimas (26). El zinc presenta diferentes tipos de acción. Uno de los roles es la inhibición de las NADPH oxidasas. Provocando así que dicha enzima no pueda donar su electrón del O_2 para la formación del radical oxígeno singulete. A su vez, el zinc puede actuar en conjunto con la SOD convirtiendo al radical del oxígeno singulete en H_2O_2 . Por otra parte, permite la inhibición del TNF-alfa mediante la activación del NF-kB (por su nombre en inglés "Nuclear factor kappa B) (8).

Se han observado diferentes metabolitos con rol antioxidante, entre los que se encuentran el ácido úrico, bilirrubina y melatonina (27). Diversos estudios indican que el ácido úrico previene la nitrosilación de proteínas inducidas por $ONOO^-$, la peroxidación de lípidos/proteínas y la

bombear Ca^{2+} desde el citosol al espacio extracelular o el ER (por su nombre en inglés “endoplasmic reticulum”) respectivamente, a expensas de ATP (32). Otro mecanismo es el del intercambiador de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ permitiendo el ingreso de 3 iones Na^+ al citoplasma por cada ion Ca^{2+} al espacio extracelular. Estas proteínas pueden variar su jerarquía según el tipo celular en el cual actúen.

De esta forma, el organismo puede responder a estímulos modificando las concentraciones de Ca^{2+} citosólico desencadenando efectos como la modulación de la expresión génica, proliferación celular o cáncer (33).

Casi la totalidad de las células utilizan el Ca^{2+} como señalizador para poder efectuar sus funciones y sobrevivir a alteraciones de la homeostasia. Estas señales pueden considerarse, a fines prácticos, como universales, estando presente incluso en las bacterias (34).

Las proteínas de unión al Ca^{2+} son una familia muy numerosa y heterogénea, por lo que pueden ser clasificadas en dos grandes grupos: con y sin dominio EF. Los dominios EF se unen a iones de Ca^{2+} . Constan de dos hélices alfa situadas aproximadamente perpendiculares una a la otra, unidas por una región de bucle corto (hélice-bucle-hélice) (35). Responden a la unión al Ca^{2+} de 2 formas. Puede ser sin cambios conformacionales significativos, cumpliendo funciones principalmente de tamponador o transportador de Ca^{2+} . Por otro lado, pueden tener un cambio conformacional, por ejemplo en el caso de la calmodulina (CaM), que funcionan como sensores de Ca^{2+} , relacionándose con otros efectores una vez están activos.

La CaM se expresa en todas las células eucariotas y participa en diversos procesos importantes para las células como se mencionó anteriormente (crecimiento, proliferación y movimiento). Es relativamente pequeña y altamente conservada evolutivamente. Consta de 4 dominios EF. La concentración y ubicación de CaM juegan un rol importante en la regulación de la actividad biológica. Su concentración aumenta en células con crecimiento rápido o diferenciación. En respuesta al Ca^{2+} la CaM puede modificar su localización celular (36).

Existen proteínas kinasas dependientes de CaM (CaMKs), estas son activadas por la unión de Ca^{2+} y CaM y fosforilan residuos de tirosina o serina (37). Una proteína muy importante en la señalización por Ca^{2+} es la fosfolipasa C (PLC). Esta es una enzima de membrana con varios dominios. Comprenden 13 familias, divididas en 6 clases. A pesar de ser poco conservadas entre ellas, presentan dominios comunes en todos los organismos, un requerimiento mínimo para su función (38).

La PLC se activa en respuesta a receptores celulares y su sustrato de preferencia es el fosfolípido de membrana fosfatidil inositol 4,5-bisfosfato (PIP₂). La activación de la PLC lleva a la formación de dos compuestos mediante hidrólisis de PIP₂. Por un lado, el diacilglicerol (DAG) que activa la proteína kinasa C (PKC) clásica que también se puede activar por Ca²⁺. La PKC fosforila efectores para activar funciones celulares como la proliferación. Otro producto de la hidrólisis del PIP₂ es el segundo mensajero, inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃). Éste es capaz de activar un receptor específico de IP₃ que es un canal de Ca²⁺ y así puede liberarlo del ER (38,39).

De esta forma, frente a diferentes estímulos los niveles citoplasmáticos de Ca²⁺ son rápidamente elevados causando un pico de concentración citosólica que indica una activación celular (40). La modalidad de incremento de Ca²⁺ es variada dependiendo de la localización y duración. Puede tratarse desde incrementos transitorios muy cortos y localizados como las chispas de Ca²⁺ (sparks) hasta pulsos sostenidos de mayor duración (de varios minutos a horas) como las ondas de Ca²⁺. El Ca²⁺ libre está disponible por un período de tiempo muy corto para actuar como señalizador, porque las proteínas de unión al Ca²⁺ y los canales de Ca²⁺ trabajan en conjunto rápidamente para secuestrar o transportar el Ca²⁺ a los almacenes intracelulares o el exterior de la célula. Además de la participación de canales involucrados en el mantenimiento de la homeostasis del Ca²⁺ (36).

La PLC interactúa con más de 100 proteínas y moléculas siendo necesaria su regulación en la señalización del Ca²⁺. Alteraciones en su función pueden vincularse a apoptosis, autofagia o desarrollo del cáncer (41). A su vez, estos efectos pueden estar vinculados también con el accionar de las ROS. En niveles normales las mismas actúan como moléculas de señalización mediante procesos fisiológicos, mientras que en concentraciones excesivas activan procesos de muerte celular: apoptosis, necrosis, autofagia (8).

La apoptosis es un tipo de muerte celular la cual es iniciada por señales intra y extracelulares por receptores de muerte celular y vías mitocondriales. Posterior al inicio de la apoptosis se produce el aumento de la concentración de ROS en las células. Este aumento produce un desequilibrio en la homeostasis redox, lo que conlleva al daño del ADN, los lípidos y las proteínas. Dicho proceso aumenta el OS celular desencadenando la apoptosis en respuesta a ROS. Se ha visualizado que la misma se activa por medio de dos vías. Una por las cuales las ROS actúan sobre el ligando inductor de apoptosis (TRAIL, por su nombre en inglés "TNF-related apoptosis-inducing ligand"). La otra vía se encuentra mediada por la activación del C-Jun-N-terminal quinasa (JNK) (8).

Más allá de esto, hay otros mecanismos celulares puestos en marcha a través de la señalización de Ca^{2+} . En condiciones de reposo existe un marcado gradiente de cationes entre ambos lados de la membrana celular generado por el Ca^{2+} y el sodio. Hay canales específicos para estos cationes con el poder de impactar en el funcionamiento y excitabilidad de las células. Un canal que actúa como sensor molecular participando en procesos celulares y patogénesis (asma, metástasis, resistencia a la quimioterapia), son los canales de potencial con receptores transitorios (TRP). Éstos comprenden una superfamilia que incluye canales en distintos tipos celulares a través del organismo (42). Algunos canales TRP regulan la tumorigénesis o progresión tumoral, siendo dianas específicas para potenciales tratamientos de cáncer (43).

4.2. Ca^{2+} y ROS

Como se ha mencionado, las ROS y el Ca^{2+} son importantes señalizadores. Interaccionan de manera estrecha en el organismo mediando tanto procesos fisiológicos como condiciones patológicas. Ambos se modulan de manera recíproca, por lo cual existen diversas enzimas involucradas. Esto se evidencia, por ejemplo, en la formación de ROS, donde algunas NADPH oxidasas y NO sintasas, son moduladas por el incremento de Ca^{2+} citosólico. Cabe destacar que esto es altamente dependiente del tipo de célula y tipo de tejido involucrado (44).

Mientras que las ROS son un conjunto muy diverso de moléculas, el Ca^{2+} existe en una sola forma biológica relevante. Su accionar depende de la unión a determinadas proteínas, y la naturaleza de esta interacción va a determinar su actividad señalizadora en diferentes vías celulares (45).

Como fue mencionado previamente, la maquinaria responsable del mantenimiento de la homeostasis de las ROS involucra la familia de las NADPH oxidasas. Dentro de esta familia se destaca la NOX2 como fuente de estrés oxidativo para el combate de patógenos. Su activación es regulada por subunidades citosólicas con GTPasas que necesitan ser fosforiladas por PKC clásica activada por Ca^{2+} (46).

De igual forma que la enzima NOX2 en neutrófilos, NOX1 también es dependiente de Ca^{2+} en respuesta a luz UVA. NOX1 puede ser directamente fosforilada por la PKC (clásica). NOX5, quien tiene 4 dominios EF, puede unir CaM activada por Ca^{2+} en su dominio C-terminal llevando a un cambio conformacional aumentando la actividad enzimática N-terminal. La actividad Ca^{2+} dependiente de NOX5 participa en la proliferación vascular y formación de vasos como en la proliferación celular en diferentes líneas celulares cancerígenas por mecanismo de señalización

paracrina. También parece jugar un rol en falla renal y enfermedades de las arterias coronarias (47).

Por otro lado, DUOX1 está altamente expresada en las células epiteliales de las vías aéreas. Mientras que DUOX 2 en las glándulas salivales y el tracto gastrointestinal. Las DUOX contienen un dominio EF citosólico de unión al Ca^{2+} . Cuando son activadas liberan principalmente H_2O_2 , también $\text{O}_2^{\cdot -}$. En la tiroides, el H_2O_2 producido por las DUOX2 es utilizado por la tiroperoxidasa como un aceptor electrónico para generar T3 y T4. Asimismo, es de relevancia en los procesos de cicatrización, inducidos por ondas de Ca^{2+} , promoviendo el reclutamiento de células inmunes hacia la herida (48).

Otra ROS muy importante tanto en respuestas fisiológicas como patológicas es el $\cdot\text{NO}$. Esta molécula es un radical libre que se sintetiza a partir de O_2 y l-arginina por la óxido nítrico sintasa (NOS), esta enzima contiene varios cofactores como: FAD, FMN, BH_4 y hemo. Los electrones necesarios para la producción de $\cdot\text{NO}$ son suministrados por moléculas de NADPH (1) (Ver figura 4).

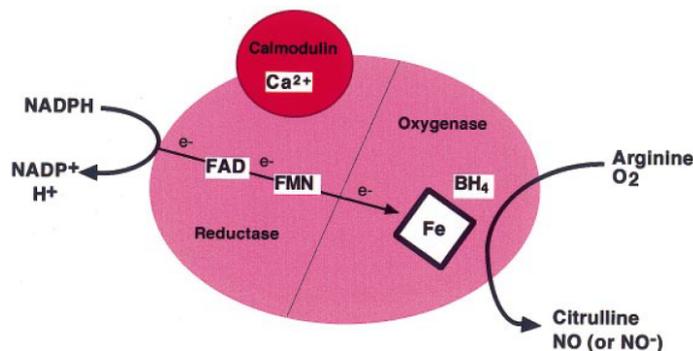


Figura 4: Reacción catalizada y cofactores de la NOS.(49)

El $\cdot\text{NO}$ cumple múltiples funciones en la modulación del tono vascular, la neurotransmisión y la defensa inmunitaria (50). En altas concentraciones puede producir lesiones celulares directas (la inhibición de la ribonucleótido reductasa o de la citocromo oxidasa), o indirectas implicando la conversión del $\cdot\text{NO}$ en otras especies reactivas del nitrógeno (RNS por su nombre en inglés "Reactive Nitrogen Species"). La reacción del $\cdot\text{NO}$ con el superóxido produce la especie oxidante ONOO^- , una ROS y RNS muy reactiva que causa importante daño oxidativo en diversas moléculas como proteínas y lípidos (Ver figura 2). La NOS presenta 3 isoformas, todas dependientes de CaM. La NOS endotelial (eNOS) y la NOS neuronal (nNOS) son las isoformas que se expresan de forma constitutiva en los respectivos tejidos. Estas enzimas para su acción

requieren Ca^{2+} , normalmente el nivel de Ca^{2+} libre intracelular es bajo y restringe su actividad. La tercera isoforma es la NOS inducible (iNOS) que está presente en los sitios de inflamación para generar concentraciones rápidas de $\cdot\text{NO}$ (1).

5. Mitocondria

En la mitocondria, la producción de ROS está principalmente ligada a la fuga de electrones de la ETC. Además, se plantea que también está vinculada a las señales de Ca^{2+} en la célula. El Ca^{2+} promueve la síntesis de ATP estimulando las enzimas del ciclo de Krebs y la fosforilación oxidativa. Se ha sugerido que un incremento en el metabolismo consume más O_2 resultando en un aumento en la fuga de electrones y los niveles de ROS producidos. En condiciones normales, el Ca^{2+} puede potenciar la generación de las ROS, induciendo cambios conformacionales tridimensionales de los complejos de la ETC, llevando a la formación de ROS mitocondrial (51).

Como se mencionó previamente, el pasaje de electrones a través de la ETC forma $\text{O}_2 \cdot^-$ cuando las formas reducidas del mononucleótido de flavina o la ubiquinona pasan un electrón al O_2 . La formación de este en la mitocondria es un proceso continuo que genera una fuente de estrés oxidativo para la célula. De este modo, la supervivencia de la célula depende de que cuente con mecanismos de defensa antioxidante, como amortiguador del proceso.

El poro de permeabilidad transitoria mitocondrial (mPTP) es sensible al Ca^{2+} y al voltaje. Su apertura provoca que se equilibre el gradiente de protones. Esto causa la despolarización mitocondrial, seguido de la inhibición de la ETC produciendo ROS y una liberación masiva de Ca^{2+} de la matriz (46).

El grupo de Bertero E. y Maack C. ha desarrollado el concepto de balance de ROS optimizado. Este concepto hace referencia a un estado intermedio Redox donde la liberación de ROS es mínima por parte de la cadena de transporte de electrones y la capacidad antioxidante se encuentra en niveles adecuados para hacer frente al mismo. Esta capacidad antioxidante en la mitocondria se ve favorecida gracias al papel del Ca^{2+} como estimulador del ciclo de Krebs activando a las enzimas deshidrogenasas involucradas en el mismo (46).

De manera inversa, la concentración de ROS puede afectar el estado redox de los residuos de cisteína de canales de Ca^{2+} o desacoplando la actividad ATPasa de las bombas. Estos desequilibrios afectan directamente el flujo de Ca^{2+} en el citosol y dentro de los almacenes intracelulares, influyendo así en patologías degenerativas como Alzheimer o Parkinson, e inclusive promoviendo el crecimiento tumoral y metástasis (52).

6. Modelos biológicos: Interacciones de ROS y de Ca²⁺ en el organismo

Como se mencionó anteriormente, en medios con elevados niveles de OS se producen altos niveles de ROS por las células. En reacción a este exceso, el organismo desencadena respuestas para atenuar dicho aumento. Se ha observado que en concentraciones moderadas las ROS actúan como moléculas de señalización para procesos fisiológicos como la cicatrización (53).

En cambio, cuando las concentraciones son muy elevadas actúan incrementando aún más el OS. Un aumento de las ROS por encima de cierto umbral puede generar daño oxidativo a tal punto que la capacidad de las células de mantener la homeostasis es superada y se desencadena la muerte celular programada. Se ha demostrado que dicha acción de las ROS tiene un papel importante en la patogénesis de varias enfermedades, debido a que genera daño en distintos componentes celulares (53).

6.1 Enfermedades neurodegenerativas

Las enfermedades neurodegenerativas incluyen la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Alzheimer, la esclerosis múltiple y la esclerosis lateral amiotrófica. En estas, las células nerviosas del cerebro y la médula espinal sufren disfunciones mitocondriales, así como excitotoxicidad y finalmente apoptosis, que conducen a una pérdida funcional. Dado que el sistema nervioso central tiene una tasa metabólica alta y una capacidad relativamente reducida para la regeneración celular, las células nerviosas son particularmente susceptibles de ser dañadas por las ROS (3).

Particularmente en las enfermedades de Parkinson y en la enfermedad de Alzheimer se ha visto un daño en la proteína DJ-1 mediado por ROS. Esta proteína presenta una función importante en la reducción del estrés oxidativo por su propiedad antioxidante, regulando el daño celular. La disminución de la actividad de esta proteína genera aún más daño oxidativo contribuyendo a la formación y progreso de estas enfermedades (8). El Ca²⁺ también se ve involucrado en las alteraciones neuronales. En las neuronas de ratones envejecidos se exhiben niveles de Ca²⁺ aumentados en reposo, generando un aumento de flujo de Ca²⁺ entre el ER y las mitocondrias cambiando el patrón de expresión de algunas proteínas (3).

Otros experimentos en ratas revelaron que con los cambios en la homeostasis de ROS, su aumento y la disminución de eliminación de los antioxidantes generaron un cambio tanto en la

disposición morfológica de las neuronas, como en la homeostasis del Ca^{2+} y su metabolismo durante el envejecimiento (3,54).

Como ya se mencionó, la alteración en la señalización de Ca^{2+} y producción de ROS causan diversos tipos de trastornos en el organismo. Dentro de estas encontramos a la enfermedad de Huntington (EH), la cual es un trastorno neurodegenerativo hereditario y progresivo (55), causado por una alteración en el gen que codifica la Huntingtina (HTT). Este gen alterado (HTTexp) lleva a la amplificación de la proteína HTT expresada en la EH, la cual por medio de la facilitación de la activación de los receptores NMDA y receptores de inositol 1,4,5 trifosfato tipo 1 ($\text{InsP}_3\text{R1}$) conducen a una señalización de Ca^{2+} intracelular aumentada en neuronas (56).

Jiu-Qiang Wang y colaboradores, encontraron que las mitocondrias de las células en la enfermedad de Huntington producen una señalización excesiva de Ca^{2+} en la matriz, y lo correlacionaron con el aumento del OS, mediante el aumento de las concentraciones de $\text{O}_2^{\cdot-}$ generado en la ETC. Estos hallazgos se dieron mediante experimentos en células de ratones modificados genéticamente para expresar HTTexp. Así comprobaron que tanto la señalización de Ca^{2+} mitocondrial, como la generación de $\text{O}_2^{\cdot-}$ está desregulada en fibroblastos embrionarios y neuronas estriales de un modelo de ratón transgénico de EH. Resultados similares fueron obtenidos utilizando neuronas de ratones del modelo EH y fibroblastos de pacientes con EH. Finalmente en su investigación, Jiu-Qiang Wang y cols. correlacionaron este aumento de la actividad oxidativa mitocondrial de forma proporcional con un mayor daño al ADNmt, en comparación a las células control sin expresión de la enfermedad. Los investigadores sugieren profundizar en la combinación de bloqueadores selectivos de Ca^{2+} y antioxidantes como una posible estrategia neuroprotectora para la EH (56).

El estudio y control de las disfunciones en el balance de ROS y Ca^{2+} podrían dirigir a estrategias terapéuticas novedosas en las enfermedades neurodegenerativas.

nNOS, $\cdot\text{NO}$ y Ca^{2+}

Como se mencionó anteriormente el $\cdot\text{NO}$ es una especie oxidante de gran relevancia tanto por su rol señalizador como por su capacidad de generar estrés oxidativo fisiológico o patológico. La principal fuente de $\cdot\text{NO}$ en las células neuronales proviene de la actividad de la nNOS. Dicha enzima se activa a concentraciones intracelulares elevadas de Ca^{2+} y se asocia a los procesos de plasticidad sináptica (57). Sin embargo, él $\cdot\text{NO}$ se vuelve nocivo a concentraciones excesivas y se asocia con el riesgo de desarrollar isquemia cerebral, Parkinson y Alzheimer (58). Por esta

razón la producción, liberación y difusión de $\cdot\text{NO}$ en el sistema nervioso central se regula con precisión mediante la activación y desactivación de la nNOS.

La nNOS es un monómero en su forma inactiva, tiene una estructura de bidominio, uno oxigenasa y otro reductasa (49). El N-terminal de nNOS contiene también un dominio PDZ, involucrado en la interacción con otras proteínas. La nNOS interactúa con receptores de N-metil-D-aspartato (NMDA-R) mediante la proteína de densidad postsináptica 95 (PSD-95) (59). Los NMDA-R son receptores de glutamato que se localizan en las células neuronales y median la respuesta generada por la sinapsis neuronal (60). La PSD-95 pertenece a la familia de las guanilato quinasas asociadas a la membrana y se sitúa en sitios postsinápticos para la agrupación de receptores, canales iónicos y proteínas de señalización asociadas (61).

El incremento de la concentración de Ca^{2+} intracelular activa la producción de $\cdot\text{NO}$ por la nNOS. El exceso de $\cdot\text{NO}$ conduce a la nitrosilación de las Cys744 y Cys798 del NMDA-R, que desactiva el receptor y disminuye la afluencia de Ca^{2+} . La PMCA interactúa con el dominio PDZ de nNOS permitiendo la salida de Ca^{2+} y así restaurar las concentraciones basales, disminuyendo la producción de $\cdot\text{NO}$ (62) (Ver figura 5).

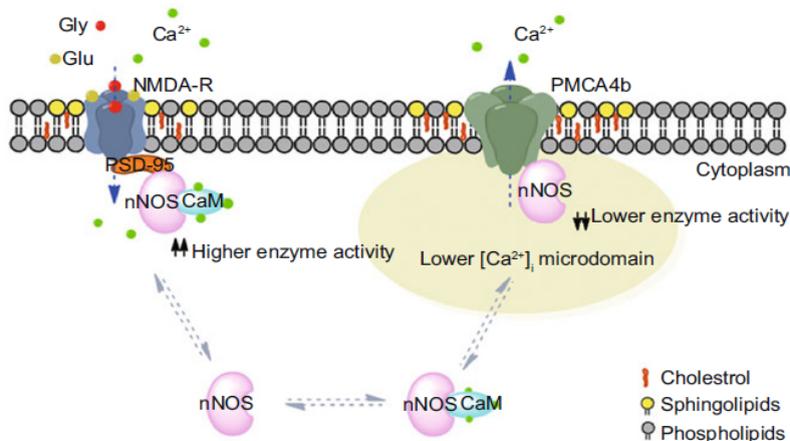


Figura 5: Activación y desactivación de nNOS en las células neuronales. Extraído de (62)

6.2 Reproducción

Infertilidad se define como la imposibilidad de concebir un embarazo tras un año de relaciones sexuales regulares sin protección. En países como Uruguay, donde la tasa de natalidad se encuentra en progresivo descenso, la infertilidad presenta marcada relevancia. Esta problemática toma fuerza considerando que afecta cerca del 15% de las parejas en edad

reproductiva (63). Si bien el factor masculino no ha sido priorizado, actualmente se sabe que contribuye al menos en el 40% de los casos de infertilidad en una pareja.

Para que la fecundación pueda suceder, es importante que los espermatozoides atraviesen una serie de modificaciones (64). En el testículo son células inmóviles y carecen de capacidad fertilizante. Un primer acontecimiento de relevancia es la maduración en el epidídimo, donde los espermatozoides adquieren la capacidad de movimiento anterógrado, lineal, con un batido flagelar casi simétrico (65). Sin embargo, para ser capaces de fertilizar, deben atravesar un paso final que transcurre en el aparato reproductor femenino y se denomina capacitación. Es un proceso tiempo dependiente, donde suceden cambios bioquímicos que incluyen pérdida de colesterol (66), fosforilación de proteínas e hiperactivación.

La motilidad de los espermatozoides hiperactivados generan un batido flagelar vigoroso, produciendo curvaturas asimétricas de gran amplitud que les permiten penetrar en la zona pelúcida del ovocito (67). Para que la hiperactivación pueda suceder, es necesario un aumento de la concentración intracelular de Ca^{2+} . Existe un canal catiónico del espermatozoide (CatSper), sensible al pH y selectivo para el Ca^{2+} (68). Se postula que la hiperactivación se desencadena por la activación de CaMKII, que es regulado por el complejo $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$.

Los espermatozoides con alteraciones en CatSper muestran una disminución gradual en la motilidad (69) y menor producción de ATP en comparación con los espermatozoides salvajes. Esto sugiere que la entrada de Ca^{2+} a través de CatSper podría regular también otros procesos, como el inicio de la glucólisis flagelar y estimular las enzimas del ciclo de Krebs en las mitocondrias. Es probable que se requiera Ca^{2+} a través de CatSper, o en combinación con Ca^{2+} liberado mediante el estímulo de receptores IP3 de almacenes intracelulares para la producción sostenida de ATP necesaria para la motilidad e hiperactivación (70).

Cuando se produce ATP, al igual que en células somáticas, la mitocondria espermática es la mayor fuente de ROS (71). Es importante destacar que los espermatozoides son células con una susceptibilidad particular hacia el daño oxidativo debido a sus inadecuados sistemas de reparación celular, así como defensas antioxidantes insuficientes, producto de la pérdida de citoplasma y organelos durante su diferenciación (72).

El $\text{O}_2^{\cdot -}$ y H_2O_2 son ROS que se genera de manera habitual en el espermatozoide y son clave para la capacitación espermática (66).

El $O_2^{\cdot -}$ se destaca como contribuyente en la fosforilación de tirosinas en el proceso de capacitación. Parte de este fenómeno involucra la inactivación de la PMCA que provoca aumento del Ca^{2+} citosólico. En este contexto la adenilato ciclasa es activada por el Ca^{2+} y el $O_2^{\cdot -}$ generado por la ETC. El aumento intracelular de Ca^{2+} dado por un aumento del flujo de entrada e inactivación de la PMCA lleva a que, junto al $O_2^{\cdot -}$, se active la adenilato ciclasa para generar AMPc. El AMPc estimula a la NADPH oxidasa aumentando la producción de H_2O_2 . Éste va a favorecer la fosforilación de tirosinas induciendo la tirosina quinasa (PTK) e inhibiendo la fosfotirosin fosfatasa (PTPasa), que desfosforila los residuos de tirosina. El paso final en el proceso de hiperactivación es, presumiblemente, aumento de la fosforilación de tirosina. Esta proteína flagelar es un importante biomarcador de capacitación (72).

Se plantea que la NADPH oxidasa vinculada con la motilidad espermática es una NOX5. NOX5 se activa cuando el Ca^{2+} se une a su dominio EF citosólico. Esta unión provoca cambios conformacionales en la célula, lo que induce la producción de ROS. Aún no se ha podido determinar si NOX5 se sobreexpresa en los espermatozoides de pacientes que presentan infertilidad asociada con OS (73).

Por otro lado, las desregulaciones en estos mecanismos pueden producir aumentos en la concentración de ROS y generar alteraciones vinculadas al OS. En este sentido, se ha visto que parámetros espermáticos anormales se correlacionan con un aumento en la producción de H_2O_2 . Es consistente con diversos estudios que demuestran relación positiva entre la producción de ROS con oligoespermia, astenoespermia y teratoespermia (74–76).

El aumento de la producción de ROS intracelular puede tener como consecuencia la peroxidación de lípidos. La membrana plasmática se ve modificada a nivel de su estructura, donde el 60% de los ácidos grasos de membrana se pierden, disminuyendo su fluidez, potenciando la permeabilidad no específica de determinados iones e inhibiendo receptores de membrana y enzimas. Esto se ve reflejado como un descenso en la motilidad espermática (77).

Con todo en consideración, si bien las ROS son un señalizador indiscutible para el correcto desarrollo de los espermatozoides y adquisición de su capacidad fertilizante, alteraciones en su regulación puede llevar a efectos sumamente perjudiciales.

En la actualidad, la evaluación del semen es un eje de laboratorio para evaluar la fertilidad masculina. La medición de oxidantes en combinación con la capacidad antioxidante de una muestra podría ser importante para evaluar el estado funcional de los espermatozoides de hombres infértiles (78).

6.3 Cardiovascular

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) representan el 31% de todas las muertes en el mundo. La edad es ampliamente reconocida como el principal factor de riesgo de ECV, la cual está íntimamente relacionada con el envejecimiento cardíaco. Este se define como el deterioro gradual de la estructura y función cardíaca con la edad (79).

El estrés oxidativo derivado de las mitocondrias juega un papel crucial en el envejecimiento cardíaco a través del daño irreversible al ADNmt. La principal ROS involucrada en este fenómeno es el $O_2^{\cdot -}$ generado a nivel de la ETC (80).

El daño del ADNmt, reduce la estabilización del suministro adecuado de ATP durante el envejecimiento cardíaco, altera el equilibrio en la apoptosis celular, y la bioenergética mitocondrial (79).

Quan y colaboradores evidencian que el daño oxidativo del ADNmt se vincula directamente con enfermedades cardiovasculares, fibrosis, hipertrofia cardíaca e insuficiencia cardíaca. En los ratones en los que hubo sobreexposición de las enzimas depuradoras de ROS resultó en una mayor resistencia a estas alteraciones (79). En forma consistente con dichos estudios, en los trabajos de Dietl y colaboradores, se relaciono el aumento de ROS mitocondriales con la presencia de insuficiencia cardíaca (81).

Frente a estos datos, se ve la importancia de esclarecer los mecanismos potenciales del envejecimiento cardíaco para promover el desarrollo de terapias antienvjecimiento con objetivo de prevenir o retrasar los cambios cardiovasculares e influir en la morbimortalidad cardiovascular (79).

Aneurisma de Aorta

El aneurisma de aorta abdominal (AAA) es una enfermedad cardiovascular con alta mortalidad (82). En la actualidad el principal tratamiento de esta patología es principalmente quirúrgico. Sin embargo, su incidencia está aumentando por lo que se hace imperativo el desarrollo de un tratamiento farmacológico alternativo. (83).

Diversos investigadores han planteado que existe una relación en la patogénesis de la AAA con la inflamación, la apoptosis celular del músculo liso y el OS. Para demostrarlo, Smriti Murali Krishna y colaboradores utilizaron un inhibidor de las serinas proteasas denominada Kallistatina (84). Se trata de una SERPINA, una proteína inhibidora de proteasas que se ha demostrado es capaz de inhibir a metaloproteasas, NADPH oxidasas y receptores de VEGF (Por

su nombre en inglés “Vascular Endothelial Growth Factor”) y TNF, así como la vía Wnt/Fzd. En el trabajo mencionado anteriormente, se observó que la Kallistatina sérica se asocia negativamente con los casos de AAA diagnosticados. Los autores encontraron que en ratones mutantes con sobreexpresión transgénica de Kallistatina se reduce la concentración plasmática de citoquinas en modelo de AAA murinos. Asimismo, confirmaron que la Kallistatina tiene efecto antioxidante sobre este modelo de AAA, dependiente de la vía de la sirtuina 1 (84). (Ver figura 6)

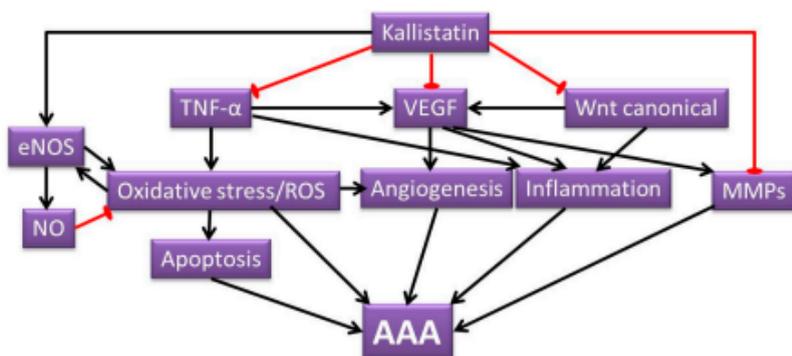


Figura 6: Mecanismo mediante el cual la Kallistatina atenúa la AAA (85).

Los autores concluyen que el rol protector sobre AAA que ejerce la Kallistatina la hace un objetivo terapéutico de gran interés para el tratamiento de esta patología (84).

6.4 Cáncer

El cáncer es una enfermedad donde los sistemas de control de la proliferación celular fallan y esto lleva a la multiplicación descontrolada de células anormales del organismo. Para que una célula potencialmente cancerígena llegue a ocasionar la enfermedad debe evadir una serie de controles tanto de su propia homeostasis como del sistema inmune innato. El desarrollo del mismo es multifactorial, dentro de estos podemos encontrar los errores en la multiplicación celular, daños en el ADN, herencia familiar (86).

Las ROS poseen un rol importante en la fisiopatología del cáncer dependiendo de las concentraciones generadas en el organismo. Cuando hay un incremento del OS se genera un desbalance, el que conlleva la acumulación de ROS en altas concentraciones. Estos niveles excesivos producen daño oxidativo en el ADN (87).

En respuesta a este daño, normalmente se activa la proteína p53, proteína supresora de tumores, con el fin de reparar el ADN. En diferentes trabajos, se ha observado que la respuesta

de la p53 es limitada. Cuando se sobrepasa su capacidad aumenta la probabilidad de mutaciones y activación constitutiva de oncogenes así como la inactivación de genes del sistema antioxidante, lo que en conjunto desencadena la inestabilidad genómica. Este proceso favorece la mutación, esencial para que las células se seleccionen de acuerdo a las presiones de su entorno y el cáncer pueda evolucionar evadiendo los mecanismos de control del organismo (87). El OS tiene una desventaja para la progresión tumoral, se ha observado que los niveles excesivos de ROS son tóxicos para las propias células cancerígenas debido a que aumenta la vulnerabilidad al daño (88).

Es por esta razón que se han realizado muchos esfuerzos para comprender con profundidad los mecanismos de formación de ROS en células cancerígenas, con el objetivo de desarrollar estrategias para inducir un aumento del estrés oxidante con función quimioterapéutica (89).

Un ejemplo de esta estrategia son los trabajos de Sang Hun Kim y colaboradores del 2016. En dichos trabajos se estudió el efecto de la monensina sobre células de cáncer de próstata humano. La monensina es un ionóforo de cationes monovalentes cuyo principal efecto es la entrada de Na^+ desde el medio extracelular. Los autores demuestran que en células de cáncer de próstata independientes de andrógenos (PC-3) el tratamiento con monensina induce apoptosis dependiente de caspasa. Este fenómeno es estimulado por la formación de ROS y la disminución del Ca^{2+} intracelular, tal como lo demuestran los experimentos usando el inhibidor de la respiración difeniliodonio (DPI) y el inhibidor de canales de Ca^{2+} tipo L (verapamil) respectivamente. Cabe destacar que ambas señales estimuladoras de la apoptosis son independientes una de otra en este modelo (90).

6.5 Inflamación: alteración de la barrera endotelial

La inflamación es un proceso por el cual se reclutan células del sistema inmune y componentes moleculares plasmáticos hacia un sitio extravascular. El aumento de permeabilidad de la barrera endotelial es un evento necesario en la inflamación que permite la translocación de células como polimorfonucleares y macrófagos desde la circulación al tejido afectado.

En algunas situaciones esta respuesta se ve exacerbada y sobrepasa la capacidad del tejido de contener la respuesta inflamatoria, por lo que se desarrollan patologías como la injuria aguda de pulmón (IRA) o el síndrome de dificultad respiratoria (SDRA) (91).

La barrera endotelial cumple su función como barrera semipermeable, regulando así la homeostasis, permitiendo el pasaje de diferentes solutos, proteínas y células inflamatorias.

El pasaje de proteínas y/o células ocurre por dos mecanismos: la vía transcelular, mediada por las caveolas o la vía paracelular a través de las uniones interendoteliales. Una respuesta inflamatoria aguda puede desencadenar la pérdida de la función de la barrera endotelial, lo que provoca la extravasación de polimorfonucleares (PMN) y la activación de macrófagos, las cuales liberan compuestos citotóxicos y proinflamatorios (92).

Dentro de los compuestos liberados por las células inflamatorias se encuentran ROS como el $O_2^{\cdot-}$, el H_2O_2 y el $\cdot OH$, que a concentraciones fisiológicas desempeñan funciones de regulación del tono vascular, monitoreo de la tensión de O_2 y producción de eritropoyetina.

Durante los procesos inflamatorios los PMN y los macrófagos activados generan cantidades sustanciales de ROS, debido a que expresan NOX2. La producción de H_2O_2 por la NOX2, aumenta la adhesividad de las células proinflamatorias al endotelio. Si bien las células cuentan con mecanismos para eliminar las ROS, durante la crisis inflamatoria los mecanismos antioxidantes son saturados (93).

La producción de ROS en el endotelio induce un aumento del Ca^{2+} citosólico generando un incremento en la permeabilidad de la barrera endotelial. Las células endoteliales expresan TRP que pueden ser activados por acción de las ROS. Dentro de esta familia de canales, el TRPC6 se expresa en las células endoteliales pulmonares y puede ser activado por H_2O_2 (94). El aumento de Ca^{2+} intracelular a través de los canales TRPC, activan vías de señalización que actúan sobre las uniones adherentes provocando la contracción de las células endoteliales y aumentando la permeabilidad de la barrera endotelial. Una de las vías involucradas es la ROS- Ca^{2+} -PKC λ , que se activa en presencia de H_2O_2 y tiene como consecuencia un cambio en la distribución de la PKC λ (95).

También está la vía ROS-ICAM-1-Src, la activación de esta vía involucra la adhesión y extravasación de los PMN. Frente al incremento de H_2O_2 , aumenta la expresión de ICAM-1 que es el contra receptor de las B_2 integrinas de los PMN permitiendo su adhesión, esta interacción promueve la activación de Src, que cumple un rol en la regulación de la NOX induciendo la producción de H_2O_2 (96) (Ver figura 7).

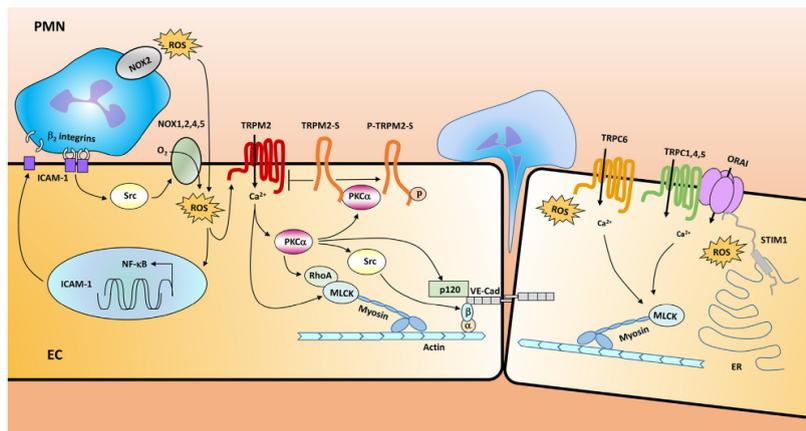


Figura 7: Modelo de señalización de ROS (H_2O_2) que regula la permeabilidad del endotelio (96). Otros de los canales de la familia TRP involucrados en este mecanismo son el TRPM2 y TRPM2-S. Dichos canales interactúan en la membrana plasmática regulando negativamente la entrada de Ca^{2+} por TRPM2. El aumento de la expresión de TRPM2-S inhibe la entrada de Ca^{2+} que induce el H_2O_2 , disminuyendo la permeabilidad endotelial (96).

7. Discusión

Como se ha mencionado, la función de las ROS varía dependiendo de la concentración, localización y diversos factores que le permitirán comportarse como señalizadores u ocasionar daño oxidativo a las células. Tanto las ROS como el Ca^{2+} pueden actuar como segundos mensajeros en forma independiente. Sin embargo, es frecuente encontrar estas dos vías de señalización interrelacionadas.

Un punto de encuentro importante en la formación de ROS y la regulación del Ca^{2+} es la mitocondria. Este organelo es una fuente muy importante de ROS, en virtud de que los electrones que se transportan a través de la ETC pueden escaparse al pasar por el complejo I y III para reaccionar directamente con el O_2 y formar $O_2^{\cdot-}$. En condiciones fisiológicas el $O_2^{\cdot-}$ se forma de manera constante, no obstante, en situaciones patológicas se puede generar un aumento o disminución en la tasa de formación del radical. De este modo, la mitocondria genera constantemente OS para el cual cuenta con defensas antioxidantes como la Mn-SOD, CAT, GPx, Trx, entre otras.

Por su parte, el Ca^{2+} es un segundo mensajero muy estudiado cuya concentración es mantenida en valores muy bajos respecto al medio extracelular por una serie de bombas e intercambiadores a nivel de la membrana plasmática, el retículo endoplásmico y la mitocondria.

Las señales de Ca^{2+} y ROS pueden vincularse de distintas formas tanto en el sistema antioxidante como los sistema nervioso, sistema reproductor, en la patogénesis de las enfermedades cardiovasculares, en la regulación del ciclo celular, la activación de la apoptosis y en procesos inflamatorios. La formación de ROS y el OS juegan un rol de gran relevancia en el desarrollo de condiciones patológicas en distintos sistemas biológicos. Un ejemplo es el sistema antioxidante de la Trx que interviene en procesos como la proliferación celular, diferenciación, apoptosis, autofagia y metabolismo. La pérdida de la función antioxidante puede promover el desarrollo de enfermedades provocadas por el daño inflamatorio y oxidativo.

El estudio y control de las disfunciones en el balance de $\text{O}_2 \cdot^-$, $\cdot\text{NO}$ y Ca^{2+} podrían dirigir a estrategias terapéuticas para evitar el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas. Se plantea el uso de inhibidores de Ca^{2+} y antioxidantes para combatir, por ejemplo, la EH.

En cuanto al sistema reproductor, se ha comprobado que el $\text{O}_2 \cdot^-$ y H_2O_2 son fundamentales en procesos de la capacitación espermática como la fosforilación de proteínas e hiperactivación. Asimismo, y en relación con lo comentado previamente, un aumento en la producción H_2O_2 se correlaciona con parámetros espermáticos anormales. La medición de oxidantes presenta relevancia al momento de evaluar el estado funcional de las muestras.

Las ROS también presentan un rol importante en la patogénesis de las enfermedades cardiovasculares. Se ha observado que el estrés oxidativo derivado de las mitocondrias juega un papel crucial en el envejecimiento cardíaco. La Kallistatina podría tener un rol importante en el tratamiento farmacológico de la AAA, debido a su papel protector en dicha patología.

En relación al cáncer, se ha visto que la Monensina es un posible fármaco por su poder de regulación de proteínas dependientes de las concentraciones de ROS y Ca^{2+} , dado que detienen el ciclo celular y activan la apoptosis.

En procesos inflamatorios mediados en el endotelio pulmonar, el H_2O_2 y el Ca^{2+} generan un aumento de la permeabilidad endotelial que puede progresar a enfermedades como IRA o SDRA.

8. Conclusiones y perspectiva

El universo de las ROS es muy amplio y su interrelación con otras vías de señalización lo es aún más. Como se ha mencionado previamente las señales de Ca^{2+} y ROS tienen efectos muy

variados dependiendo de la naturaleza de las ROS, el tipo celular y otros factores. En esta monografía se ha expuesto una fracción del conocimiento alcanzado a la fecha sobre la relación entre ambos señalizadores, dejando en evidencia la gran relevancia de estas señales tanto en la modulación de respuestas fisiológicas como en la etiología de varias patologías.

9. Bibliografía

1. Halliwell B, Gutteridge JMC. Free radicals in biology and medicine. Fifth edition. Oxford, United Kingdom: Oxford University Press; 2015. 905 p.
2. Schieber M, Chandel NS. ROS Function in Redox Signaling and Oxidative Stress. *Curr Biol.* mayo de 2014;24(10):R453-62.
3. Madreiter-Sokolowski CT, Thomas C, Ristow M. Interrelation between ROS and Ca²⁺ in aging and age-related diseases. *Redox Biol.* septiembre de 2020;36:101678.
4. Zorov DB, Juhaszova M, Sollott SJ. Mitochondrial Reactive Oxygen Species (ROS) and ROS-Induced ROS Release. *Physiol Rev.* julio de 2014;94(3):909-50.
5. Tretter L. Generation of Reactive Oxygen Species in the Reaction Catalyzed by -Ketoglutarate Dehydrogenase. *J Neurosci.* 8 de septiembre de 2004;24(36):7771-8.
6. Ugun-Klusek A, Theodosi TS, Fitzgerald JC, Burté F, Ufer C, Boock DJ, et al. Monoamine oxidase-A promotes protective autophagy in human SH-SY5Y neuroblastoma cells through Bcl-2 phosphorylation. *Redox Biol.* enero de 2019;20:167-81.
7. Leung TM, Lu Y. Alcoholic Liver Disease: from CYP2E1 to CYP2A5. *Curr Mol Pharmacol.* 2017;10(3):172-8.
8. He L, He T, Farrar S, Ji L, Liu T, Ma X. Antioxidants Maintain Cellular Redox Homeostasis by Elimination of Reactive Oxygen Species. *Cell Physiol Biochem.* 2017;44(2):532-53.
9. Fan P, Li L, Rezaei A, Eslamfam S, Che D, Ma X. Metabolites of Dietary Protein and Peptides by Intestinal Microbes and their Impacts on Gut. *Curr Protein Pept Sci.* 2015;16(7):646-54.
10. Denison MS, Nagy SR. Activation of the Aryl Hydrocarbon Receptor by Structurally Diverse Exogenous and Endogenous Chemicals. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* abril de 2003;43(1):309-34.
11. Jaeschke H, Adelusi OB, Akakpo JY, Nguyen NT, Sanchez-Guerrero G, Umbaugh DS, et al. Recommendations for the use of the acetaminophen hepatotoxicity model for mechanistic studies and how to avoid common pitfalls. *Acta Pharm Sin B.* diciembre de 2021;11(12):3740-55.
12. Sue Goo Rhee. Overview on Peroxiredoxin. *Mol Cells.* 31 de enero de 2016;39(1):1-5.
13. He L, Eslamfam S, Ma X, Li D. Autophagy and the nutritional signaling pathway. *Front Agric Sci Eng.* 2016;3(3):222.
14. Wang Y, Branicky R, Noë A, Hekimi S. Superoxide dismutases: Dual roles in controlling ROS damage and regulating ROS signaling. *J Cell Biol.* 4 de junio de 2018;217(6):1915-28.
15. Han P, Ma X, Yin J. The effects of lipoic acid on soybean β -conglycinin-induced anaphylactic reactions in a rat model. *Arch Anim Nutr.* junio de 2010;64(3):254-64.
16. Zangar R. Mechanisms that regulate production of reactive oxygen species by cytochrome P450. *Toxicol Appl Pharmacol.* septiembre de 2004;199(3):316-31.
17. Buvelot H, Jaquet V, Krause KH. Mammalian NADPH Oxidases. En: Knaus UG, Leto TL, editores. *NADPH Oxidases [Internet].* New York, NY: Springer New York; 2019 [citado 13 de noviembre de 2022]. p. 17-36. (Methods in Molecular Biology; vol. 1982). Disponible en: http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-9424-3_2
18. Lu J, Holmgren A. The thioredoxin antioxidant system. *Free Radic Biol Med.* enero de 2014;66:75-87.
19. Lillig CH, Holmgren A. Thioredoxin and Related Molecules—From Biology to Health and Disease. *Antioxid Redox Signal.* enero de 2007;9(1):25-47.
20. Challa TD, Wueest S, Lucchini FC, Dedual M, Modica S, Borsigova M, et al. Liver ASK1 protects from non-alcoholic fatty liver disease and fibrosis. *EMBO Mol Med [Internet].* octubre de 2019 [citado 13 de noviembre de 2022];11(10). Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.15252/emmm.201810124>
21. Hu J, Yu Y. The Function of Thioredoxin-Binding Protein-2 (TBP-2) in Different Diseases. *Oxid Med Cell Longev.* 2018;2018:1-10.
22. Shi L, Wu L, Chen Z, Yang J, Chen X, Yu F, et al. MiR-141 Activates Nrf2-Dependent Antioxidant Pathway via Down-Regulating the Expression of Keap1 Conferring the Resistance of Hepatocellular Carcinoma Cells to 5-Fluorouracil. *Cell Physiol Biochem.* 2015;35(6):2333-48.
23. Jee JP, Lim SJ, Park JS, Kim CK. Stabilization of all-trans retinol by loading lipophilic antioxidants in solid lipid nanoparticles. *Eur J Pharm Biopharm.* junio de 2006;63(2):134-9.
24. Barros AIRNA, Nunes FM, Gonçalves B, Bennett

- RN, Silva AP. Effect of cooking on total vitamin C contents and antioxidant activity of sweet chestnuts (*Castanea sativa* Mill.). *Food Chem.* septiembre de 2011;128(1):165-72.
25. Burton GW, Traber MG. Vitamin E: Antioxidant Activity, Biokinetics, and Bioavailability. *Annu Rev Nutr.* julio de 1990;10(1):357-82.
 26. Tabassum A, Bristow RG, Venkateswaran V. Ingestion of selenium and other antioxidants during prostate cancer radiotherapy: A good thing? *Cancer Treat Rev.* mayo de 2010;36(3):230-4.
 27. Ratnam DV, Ankola DD, Bhardwaj V, Sahana DK, Kumar MNVR. Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective. *J Controlled Release.* julio de 2006;113(3):189-207.
 28. W. Waring S, J. Webb D, R. J. Maxwell S. Systemic Uric Acid Administration Increases Serum Antioxidant Capacity in Healthy Volunteers: *J Cardiovasc Pharmacol.* septiembre de 2001;38(3):365-71.
 29. Kim SD, Antenos M, Squires EJ, Kirby GM. Cytochrome P450 2A5 and bilirubin: Mechanisms of gene regulation and cytoprotection. *Toxicol Appl Pharmacol.* julio de 2013;270(2):129-38.
 30. Martín M, Macías M, Escames G, Reiter RJ, Agapito MT, Ortiz GG, et al. Melatonin-induced increased activity of the respiratory chain complexes I and IV can prevent mitochondrial damage induced by ruthenium red in vivo: Melatonin and mitochondrial oxidative phosphorylation enzymes. *J Pineal Res.* mayo de 2000;28(4):242-8.
 31. Baird GS. Ionized calcium. *Clin Chim Acta.* abril de 2011;412(9-10):696-701.
 32. Boczek T, Sobolczyk M, Mackiewicz J, Lisek M, Ferenc B, Guo F, et al. Crosstalk among Calcium ATPases: PMCA, SERCA and SPCA in Mental Diseases. *Int J Mol Sci.* 10 de marzo de 2021;22(6):2785.
 33. Patergnani S, Danese A, Bouhamida E, Aguiari G, Previati M, Pinton P, et al. Various Aspects of Calcium Signaling in the Regulation of Apoptosis, Autophagy, Cell Proliferation, and Cancer. *Int J Mol Sci.* 6 de noviembre de 2020;21(21):8323.
 34. Putney JW, Tomita T. Phospholipase C signaling and calcium influx. *Adv Biol Regul.* enero de 2012;52(1):152-64.
 35. Marques R, Maia CJ, Vaz C, Correia S, Socorro S. The diverse roles of calcium-binding protein regucalcin in cell biology: from tissue expression and signalling to disease. *Cell Mol Life Sci.* enero de 2014;71(1):93-111.
 36. Chin D, Means AR. Calmodulin: a prototypical calcium sensor. *Trends Cell Biol.* agosto de 2000;10(8):322-8.
 37. Takemoto-Kimura S, Suzuki K, Horigane S ichiro, Kamijo S, Inoue M, Sakamoto M, et al. Calmodulin kinases: essential regulators in health and disease. *J Neurochem.* junio de 2017;141(6):808-18.
 38. Bunney TD, Katan M. PLC regulation: emerging pictures for molecular mechanisms. *Trends Biochem Sci.* febrero de 2011;36(2):88-96.
 39. Bill CA, Vines CM. Phospholipase C. En: Islam MdS, editor. *Calcium Signaling* [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2020 [citado 13 de noviembre de 2022]. p. 215-42. (*Advances in Experimental Medicine and Biology*; vol. 1131). Disponible en: http://link.springer.com/10.1007/978-3-030-12457-1_9
 40. Baba Y, Matsumoto M, Kurosaki T. Calcium signaling in B cells: Regulation of cytosolic Ca²⁺ increase and its sensor molecules, STIM1 and STIM2. *Mol Immunol.* diciembre de 2014;62(2):339-43.
 41. Deka SJ, Trivedi V. Potentials of PKC in Cancer Progression and Anticancer Drug Development. *Curr Drug Discov Technol.* 24 de junio de 2019;16(2):135-47.
 42. Moran MM. TRP Channels as Potential Drug Targets. 2017;24.
 43. Zhong T, Zhang W, Guo H, Pan X, Chen X, He Q, et al. The regulatory and modulatory roles of TRP family channels in malignant tumors and relevant therapeutic strategies. *Acta Pharm Sin B.* abril de 2022;12(4):1761-80.
 44. Araki S, Osuka K, Takata T, Tsuchiya Y, Watanabe Y. Coordination between Calcium/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II and Neuronal Nitric Oxide Synthase in Neurons. *Int J Mol Sci.* 27 de octubre de 2020;21(21):7997.
 45. Smedler E, Uhlén P. Frequency decoding of calcium oscillations. *Biochim Biophys Acta BBA - Gen Subj.* marzo de 2014;1840(3):964-9.
 46. Bertero E, Maack C. Calcium Signaling and Reactive Oxygen Species in Mitochondria. *Circ Res.* 11 de mayo de 2018;122(10):1460-78.
 47. Montezano AC, Burger D, Paravicini TM, Chignalia AZ, Yusuf H, Almasri M, et al. Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Reduced Oxidase 5 (Nox5) Regulation by Angiotensin II and Endothelin-1 Is Mediated via Calcium/Calmodulin-Dependent, Rac-1-Independent Pathways in Human Endothelial Cells. *Circ Res.* 30 de abril de 2010;106(8):1363-73.
 48. Razzell W, Evans IR, Martin P, Wood W. Calcium Flashes Orchestrate the Wound Inflammatory Response through DUOX Activation and Hydrogen Peroxide Release. *Curr Biol.* marzo de 2013;23(5):424-9.
 49. Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J.* 1 de agosto de 2001;357(3):593-615.
 50. Duan W, Zhou J, Li W, Zhou T, Chen Q, Yang F, et al. Plasma membrane calcium ATPase 4b inhibits nitric oxide generation through calcium-induced dynamic interaction with neuronal nitric oxide synthase. *Protein Cell.* abril

- de 2013;4(4):286-98.
51. Brookes PS, Yoon Y, Robotham JL, Anders MW, Sheu SS. Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle. *Am J Physiol-Cell Physiol.* octubre de 2004;287(4):C817-33.
 52. Görlach A, Bertram K, Hudecova S, Krizanova O. Calcium and ROS: A mutual interplay. *Redox Biol.* diciembre de 2015;6:260-71.
 53. He L, He T, Farrar S, Ji L, Liu T, Ma X. Antioxidants Maintain Cellular Redox Homeostasis by Elimination of Reactive Oxygen Species. *Cell Physiol Biochem.* 2017;44(2):532-53.
 54. Castelli V, Benedetti E, Antonosante A, Catanesi M, Pitari G, Ippoliti R, et al. Neuronal Cells Rearrangement During Aging and Neurodegenerative Disease: Metabolism, Oxidative Stress and Organelles Dynamic. *Front Mol Neurosci.* 28 de mayo de 2019;12:132.
 55. MacDonald ME. Huntingtin: Alive and Well and Working in Middle Management. *Sci STKE* [Internet]. 4 de noviembre de 2003 [citado 5 de noviembre de 2022];2003(207). Disponible en: <https://www.science.org/doi/10.1126/stke.2003.207.pe48>
 56. Wang JQ, Chen Q, Wang X, Wang QC, Wang Y, Cheng HP, et al. Dysregulation of Mitochondrial Calcium Signaling and Superoxide Flashes Cause Mitochondrial Genomic DNA Damage in Huntington Disease. *J Biol Chem.* febrero de 2013;288(5):3070-84.
 57. Calabrese V, Mancuso C, Calvani M, Rizzarelli E, Butterfield DA, Giuffrida Stella AM. Nitric oxide in the central nervous system: neuroprotection versus neurotoxicity. *Nat Rev Neurosci.* octubre de 2007;8(10):766-75.
 58. Torreilles F, Salman-Tabcheh S, Guérin MC, Torreilles J. Neurodegenerative disorders: the role of peroxynitrite. *Brain Res Rev.* agosto de 1999;30(2):153-63.
 59. Brenman JE, Chao DS, Gee SH, McGee AW, Craven SE, Santillano DR, et al. Interaction of Nitric Oxide Synthase with the Postsynaptic Density Protein PSD-95 and α 1-Syntrophin Mediated by PDZ Domains. *Cell.* marzo de 1996;84(5):757-67.
 60. Neira F, Ortega JL. Antagonistas de los receptores glutamatérgicos NMDA en el tratamiento del dolor crónico. *Rev Soc Esp Dolor Vol11 No4 Madr May 2004* [Internet]. 2004; Disponible en: https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1134-80462004000400005
 61. Coley AA, Gao WJ. PSD95: A synaptic protein implicated in schizophrenia or autism? *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* marzo de 2018;82:187-94.
 62. Duan W, Zhou J, Li W, Zhou T, Chen Q, Yang F, et al. Plasma membrane calcium ATPase 4b inhibits nitric oxide generation through calcium-induced dynamic interaction with neuronal nitric oxide synthase. *Protein Cell.* abril de 2013;4(4):286-98.
 63. Vander Borgh M, Wyns C. Fertility and infertility: Definition and epidemiology. *Clin Biochem.* diciembre de 2018;62:2-10.
 64. Dey S, Brothag C, Vijayaraghavan S. Signaling Enzymes Required for Sperm Maturation and Fertilization in Mammals. *Front Cell Dev Biol.* 18 de diciembre de 2019;7:341.
 65. Signaling mechanisms in mammalian sperm motility[†]. *Biol Reprod* [Internet]. 20 de diciembre de 2016 [citado 9 de noviembre de 2022]; Disponible en: <https://academic.oup.com/biolreprod/article/96/1/2/2725482/Signaling-mechanisms-in-mammalian-sperm-motility>
 66. De Jonge C. Biological basis for human capacitation—revisited. *Hum Reprod Update.* 23 de enero de 2017;humupd;dmw048v1.
 67. Suarez SS. Control of hyperactivation in sperm. *Hum Reprod Update.* 29 de septiembre de 2008;14(6):647-57.
 68. Visconti PE, Krapf D, de la Vega-Beltrán JL, Acevedo JJ, Darszon A. Ion channels, phosphorylation and mammalian sperm capacitation. *Asian J Androl.* mayo de 2011;13(3):395-405.
 69. Qi H, Moran MM, Navarro B, Chong JA, Krapivinsky G, Krapivinsky L, et al. All four CatSper ion channel proteins are required for male fertility and sperm cell hyperactivated motility. *Proc Natl Acad Sci.* 23 de enero de 2007;104(4):1219-23.
 70. Navarro B, Kirichok Y, Chung JJ, Clapham DE. Ion channels that control fertility in mammalian spermatozoa. *Int J Dev Biol.* 2008;52(5-6):607-13.
 71. Agarwal A, Deepinder F. Determination of seminal oxidants (reactive oxygen species). En: Lipshultz LI, Howards SS, Niederberger CS, editores. *Infertility in the Male* [Internet]. 4.ª ed. Cambridge University Press; 2009 [citado 9 de noviembre de 2022]. p. 618-32. Disponible en: https://www.cambridge.org/core/product/identifier/9780511635656%23c87289-39-1/type/book_part
 72. Dutta S, Majzoub A, Agarwal A. Oxidative stress and sperm function: A systematic review on evaluation and management. *Arab J Urol.* 3 de abril de 2019;17(2):87-97.
 73. Musset B, Clark RA, DeCoursey TE, Petheo GL, Geiszt M, Chen Y, et al. NOX5 in Human Spermatozoa. *J Biol Chem.* marzo de 2012;287(12):9376-88.
 74. Agarwal A, Mulgund A, Sharma R, Sabanegh E. Mechanisms of oligozoospermia: an oxidative stress perspective. *Syst Biol Reprod Med.* agosto de 2014;60(4):206-16.
 75. Agarwal A, Tvrda E, Sharma R. Relationship amongst teratozoospermia, seminal oxidative stress and male infertility. *Reprod Biol Endocrinol.* 2014;12(1):45.
 76. Bonanno O, Romeo G, Asero P, Pezzino FM, Castiglione R, Burrello N, et al. Sperm of patients

- with severe asthenozoospermia show biochemical, molecular and genomic alterations. *Reproduction*. diciembre de 2016;152(6):695-704.
77. Aitken RJ, Baker MA, De Iuliis GN, Nixon B. New Insights into Sperm Physiology and Pathology. En: Habenicht UF, Aitken RJ, editores. *Fertility Control* [Internet]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2010 [citado 9 de noviembre de 2022]. p. 99-115. (Handbook of Experimental Pharmacology; vol. 198). Disponible en: http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-02062-9_7
 78. Irigoyen P, Pintos-Polasky P, Rosa-Villagran L, Skowronek MF, Cassina A, Sapiro R. Mitochondrial metabolism determines the functional status of human sperm and correlates with semen parameters. *Front Cell Dev Biol*. 30 de agosto de 2022;10:926684.
 79. Quan Y, Xin Y, Tian G, Zhou J, Liu X. Mitochondrial ROS-Modulated mtDNA: A Potential Target for Cardiac Aging. *Oxid Med Cell Longev*. 27 de marzo de 2020;2020:1-11.
 80. Ungvari Z, Tarantini S, Donato AJ, Galvan V, Csiszar A. Mechanisms of Vascular Aging. *Circ Res*. 14 de septiembre de 2018;123(7):849-67.
 81. Dietl A, Maack C. Targeting Mitochondrial Calcium Handling and Reactive Oxygen Species in Heart Failure. *Curr Heart Fail Rep*. agosto de 2017;14(4):338-49.
 82. Sampson UKA, Norman PE, Fowkes FGR, Aboyans V, Song Y, Harrell Jr. FE, et al. Global and Regional Burden of Aortic Dissection and Aneurysms: Mortality Trends in 21 World Regions, 1990 to 2010. *Glob Heart*. 1 de marzo de 2014;9(1):171.
 83. Golledge J. Abdominal aortic aneurysm: update on pathogenesis and medical treatments. *Nat Rev Cardiol*. abril de 2019;16(4):225-42.
 84. Krishna SM, Li J, Wang Y, Moran CS, Trollope A, Huynh P, et al. Kallistatin limits abdominal aortic aneurysm by attenuating generation of reactive oxygen species and apoptosis. *Sci Rep*. diciembre de 2021;11(1):17451.
 85. Li J, Krishna S, Golledge J. The Potential Role of Kallistatin in the Development of Abdominal Aortic Aneurysm. *Int J Mol Sci*. 11 de agosto de 2016;17(8):1312.
 86. Winslow T. Infografías básicas sobre el cáncer. :8.
 87. Trachootham D, Alexandre J, Huang P. Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach? *Nat Rev Drug Discov*. julio de 2009;8(7):579-91.
 88. Young B, Purcell C, Kuang YQ, Charette N, Dupré DJ. Superoxide Dismutase 1 Regulation of CXCR4-Mediated Signaling in Prostate Cancer Cells is Dependent on Cellular Oxidative State. *Cell Physiol Biochem*. 2015;37(6):2071-84.
 89. Panieri E, Santoro MM. ROS homeostasis and metabolism: a dangerous liason in cancer cells. *Cell Death Dis*. junio de 2016;7(6):e2253-e2253.
 90. Kim SH, Kim KY, Yu SN, Park SG, Yu HS, Seo YK, et al. Monensin Induces PC-3 Prostate Cancer Cell Apoptosis via ROS Production and Ca²⁺ Homeostasis Disruption. *Anticancer Res*. 1 de noviembre de 2016;36(11):5835-44.
 91. Ware LB, Matthay MA. The Acute Respiratory Distress Syndrome. *N Engl J Med*. 4 de mayo de 2000;342(18):1334-49.
 92. Chow CW, Herrera Abreu MT, Suzuki T, Downey GP. Oxidative Stress and Acute Lung Injury. *Am J Respir Cell Mol Biol*. octubre de 2003;29(4):427-31.
 93. Dröge W. Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. *Physiol Rev*. 1 de enero de 2002;82(1):47-95.
 94. Massullo P, Sumoza-Toledo A, Bhagat H, Partida-Sánchez S. TRPM channels, calcium and redox sensors during innate immune responses. *Semin Cell Dev Biol*. diciembre de 2006;17(6):654-66.
 95. Reyland M E. Protein kinase C isoforms: Multi-functional regulators of cell life and death. *Front Biosci*. 2009;Volume(14):2386.
 96. Di A, Mehta D, Malik AB. ROS-activated calcium signaling mechanisms regulating endothelial barrier function. *Cell Calcium*. septiembre de 2016;60(3):163-71.