

ARTÍCULOS TÉCNICOS

REACTIVOS INTERMEDIARIOS DEL NITRÓGENO: UN MECANISMO DE DEFENSA CONTRA LA INFECCIÓN

(REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA)

Ruth M. Valbuena S. MV., MS.¹

RESUMEN

Los reactivos intermediarios del nitrógeno (RNI) comprenden el óxido nítrico (NO), los nitritos (NO₂⁻) y los nitratos (NO₃⁻). Estos compuestos constituyen un mecanismo antimicrobiano diferente al de los radicales del oxígeno, ejercen acción antibacteriana, antiparasitaria, antimicótica y antitumoral, actuando en general contra patógenos intracelulares.

Palabras Claves Adicionales: Reactivos intermediarios del nitrógeno (RNI), Oxido nítrico (NO).

ABSTRACT

REACTIVE NITROGEN INTERMEDIATES: A PROTECTIVE MECHANISM AGAINST INFECTION

(BIBLIOGRAPHIC REVIEW)

The reactive nitrogen intermediates are nitric oxide (NO), nitrites (NO₂⁻) and nitrates (NO₃⁻). These compounds have a different antimicrobial effect than the oxygen radicals. This effect is essentially against intracellular pathogens as bacterias, parasites and fungus. Antitumoral effect has been also reported.

Additional Index Words: Reactive nitrogen intermediates (RNI), nitric oxide (NO)

Los RNI están constituidos por NO, NO₂⁻ y NO₃⁻ compuestos involucrados en actividades antimicrobianas con acciones

antibacterianas, antiparasitarias, antimicóticas y antitumorales. Esta revisión bibliográfica pretende profundizar en el conoci-

¹ Inmunología. Sección de Biotecnología. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria - CORPOICA. CEISA. AA. 29743. Santafé de Bogotá.

miento de los RNI, las fuentes potenciales de producción, sus actividades, biosíntesis tanto en mamíferos como en aves, y los diferentes mecanismos a través de los cuales ejercen su acción.

RESEÑA HISTÓRICA

El planteamiento de la existencia de un mecanismo microbicida independiente del oxígeno fue hecho inicialmente en 1983 cuando los experimentos realizados por Murray *et al.*, les permitieron concluir que los macrófagos de pacientes con enfermedad granulomatosa crónica, los cuales, no obstante estar incapacitados para realizar el proceso de explosión respiratoria requerido para la generación de metabolitos del oxígeno, mostraron actividad antimicrobiana al ser estimulados con sobrenadantes de linfocitos activados y expuestos a *Toxoplasma gondii* y *Chlamidia psittaci* (Byrne *et al.*, 1982).

Posteriormente Sibley *et al.*, (1985) también demostraron la existencia de mecanismos microbicidas diferentes a los dependientes del oxígeno, empleando inhibidores de la explosión respiratoria. En 1988 Stuehr y Marletta concluyeron que los macrófagos de ratón estimulados con lipopolisacárido (LPS) sintetizan NO_2^- y NO_3^- , producción que se incrementa si a los cultivos de macrófagos se les adiciona linfocitos T. Estos hallazgos permitieron postular que el efecto mejo-

rador en la producción de RNI estaba dado por el interferón gamma (IFN γ).

En 1987 Miwa *et al.*, observaron que con la adición de aminas secundarias, como la morfolina, a cultivos de macrófagos, se generaban NO_2^- , NO_3^- , nitrosaminas, hecho que les permitió hipotetizar la existencia de un precursor intermediario de los NO_2^- , el cual posiblemente podía ser el NO. (Hibbs *et al.*, 1987; Iyengar *et al.*, 1987).

Estudios posteriores permitieron evidenciar que la L-Arginina es el precursor para la generación de los RNI: NO, NO_2^- y NO_3^- y se estableció la vía de biosíntesis de estos compuestos (Ding *et al.*, 1988; Hibbs *et al.*, 1987).

SÍNTESIS DE LOS RNI

En la L-Arginina, por acción de la enzima nitróxido sintetasa dependiente de NADPH, se remueve el nitrógeno guanidino terminal y se forman la L-citrulina y el NO, compuesto este último que en presencia de oxígeno molecular (O_2) y de agua produce NO_2^- y NO_3^- . Por otra parte, el NO puede alternativamente reaccionar con el anión superóxido (O_2^-) para formar peroxy-nitritos (ONOO^-), compuesto muy inestable que rápidamente genera radicales hidróxilos (OH) y dióxido de nitrógeno (NO_2) (Figura. 1). (Iyengar *et al.*, 1987; Liew *et al.*, 1990).

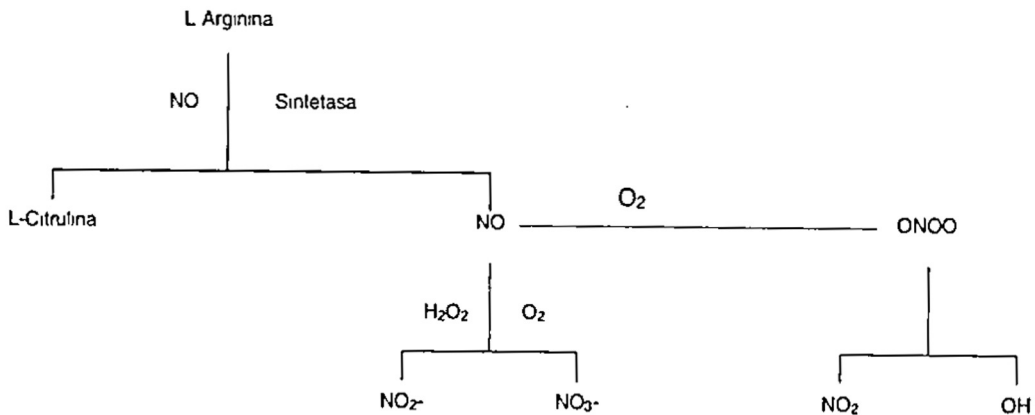


FIGURA 1. Síntesis de reactivos intermediarios del Nitrógeno.

Potencialmente cualquier célula del organismo puede formar NO. Su producción ha sido demostrada en células endoteliales, en neuronas, en hepatocitos, a nivel gástrico y en células fagocíticas polimorfonucleares y mononucleares. (Hibbs *et al.*, 1987; Palmer *et al.*, 1990; Stuehr y Marletta, 1988).

ACTIVIDAD DE LOS RNI

Los RNI poseen actividad fisiológica e inmunológica. Fisiológicamente regulan el tono vascular y controlan la agregación plaquetaria a nivel endotelial. En bajas concentraciones pueden funcionar como neurotransmisores en el sistema nervioso central, y a nivel gástrico actúan facilitando la repleción durante el proceso digestivo (Lancaster y Hibbs, 1980; Stuehr y Marletta, 1990; Sung *et al.*, 1991). En el sistema inmune ejercen acción antibacteriana, antiparasitaria, antimicótica y antitumoral, actuando en general contra patógenos intracelulares (Adams *et al.*, 1990; Denis, 1991; Drapier y Hibbs, 1988; Green *et al.*, 1990 y 1991; Hibbs *et al.*, 1987)

La producción de RNI es inducible en macrófagos cuando éstos son estimulados con citoquinas como el IFN- γ , y el factor de necrosis tumoral alfa o beta (TNF α/β), o con productos bacteridianos como el LPS

La adición simultánea de IFN- γ y TNF α/β o la de IFN- $\gamma/\alpha/\beta$ y LPS incrementan entre cinco y seis veces la producción de NO $_2^-$, que cuando sólo se adiciona IFN- $\gamma/\alpha/\beta$, mientras que la sola adición de TNF β o de LPS no tiene efecto sobre la producción de NO $_2^-$ (Ding *et al.*, 1988).

Entre las diferentes clases de interferón $\alpha/\beta/\gamma$ el g es el que induce mayor producción de NO $_2^-$ siendo ésta directamente proporcional a la concentración utilizada

La cuantificación de los niveles de NO $_2^-$ y NO $_3^-$ se realiza mediante la reacción colorimétrica de Greiss y se utiliza como indicador de la oxidación de la L-Arginina por macrófagos activados, además de constituir un

parámetro para evaluar la activación de los macrófagos y su función efectora (Hibbs *et al.*, 1987).

Evidencias de la actividad antiparasitaria dependiente del NO son los resultados obtenidos por Liew *et al.*, 1990, quienes comprobaron que macrófagos peritoneales de origen murino estimulados *in vitro* con IFN- γ en presencia de LPS son eficientes para causar la muerte a las *Leishmanias*, y esta actividad puede ser completamente inhibida adicionando al cultivo un inhibidor selectivo de la oxidación del nitrógeno guanidino terminal de la L-Arginina (Palmer *et al.*, 1990)

La importancia de la generación de NO *in vivo* fue demostrada en ratones de la cepa CBA/t6t6 infectados con L. mayor, los cuales mostraron exacerbación de las lesiones cuando se inyectó en éstas un inhibidor de la oxidación de la L-Arginina, lo cual resultó en un incremento de 10 4 veces el número de parásitos que se extrajeron de la lesión (Adams *et al.*, 1990, Green *et al.*, 1990).

Macrófagos de origen murino activados con citoquinas también han demostrado ser citotóxicos para bacterias y células tumorales, a través de un mecanismo mediado por la producción de reactivos intermedios del nitrógeno (Lancaster y Hibbs, 1980, Liew y Cox, 1991, Liew *et al.*, 1990)

MECANISMOS DE ACCIÓN DE LOS RNI

Los mecanismos propuestos acerca de cómo el NO ejerce su acción son 1) Inactivación de enzimas; entre ellas principalmente las que contienen un grupo catalíticamente activo constituido por hierro y azufre (Fe y S) El NO reacciona con el Fe formando complejos nitrosil-Fe-S los cuales inactivan la enzima. Enzimas que poseen dicho grupo activo son la ribonucleótido reductasa, la aconitasa y las oxidoreductasas NADPH ubiquinona y succinato ubiquinona, la inactivación de estas enzimas conduce a la inhibición de la síntesis de DNA, del ciclo del ácido cítrico

y la respiración mitocondrial, respectivamente; 2) El NO puede también reaccionar con aminos produciendo nitrosaminas, compuestos altamente oxidantes involucrados en daño tisular y carcinogénesis; 3) El NO puede alternativamente reaccionar con el O₂, produciendo un compuesto a partir del cual se generan radicales hidroxilos (OH), metabolitos altamente oxidantes involucrados en daño celular y tisular (Drapier y Hibbs, 1988; Green *et al.*, 1991; Iyengar *et al.*, 1987, Liew y Cox, 1991).

Los macrófagos, además de ser fuente potencial de NO, son autoreguladores de este compuesto a través de la producción de arginasa, enzima que reduce la arginina extracelular. Otro mecanismo de autocontrol lo constituye el factor de crecimiento beta el cual actúa inhibiendo la generación de intermediarios del N (Drapier y Hibbs, 1988, Palmer *et al.*, 1990)

El conocimiento acerca de la biosíntesis de los RNI en los mamíferos vertebrados capaces de sintetizar "de novo" la L-Arginina permitió cuestionar cómo sería la síntesis de los RNI en la especie aviar, incapaz de sintetizar de novo el aminoácido precursor.

BIOSÍNTESIS DE LOS RNI EN MAMÍFEROS NO VERTEBRADOS

Los mamíferos, animales ureotélicos (especies en las cuales la urea es el producto final del metabolismo nitrogenado), producen RNI a partir de la L-Arginina; mientras que las aves, animales urotélicos (especies en las cuales el ácido úrico es el producto final del metabolismo nitrogenado), son incapaces de sintetizar la arginina puesto que no realizan el ciclo completo de la urea por ausencia de la carbamilsfata sintetasa, enzima presente en las mitocondrias hepáticas de todos los organismos ureotélicos incluyendo el hombre; y una baja actividad de la ornitintrancarbamilasa, enzima también presente en las mitocondrias hepáticas. Por estas razones, las aves, además de no sintetizar arginina realizan el metabolismo nitro-

genado más en los riñones que en el hígado, a diferencia de los mamíferos (Austic y Nesheim, 1991; Sung *et al.*, 1991; Tamir y Ratner, 1983).

La producción de RNI por los macrófagos de pollo fue muy cuestionada hasta cuando en 1991 Sung *et al.* definieron las condiciones bajo las cuales los macrófagos de esta especie produjeron NO₂. Tal producción fue corroborada cultivando macrófagos peritoneales de pollo, estimulados con LPS, en medio de cultivo adicionado de L-Arginina. La medición de las concentraciones de los NO₂ se hizo mediante el reactivo de Greiss y su producción resultó directamente proporcional a la dosis tanto de LPS como de la L-Arginina (Ding *et al.*, 1988; Sung *et al.*, 1991).

Dada la incapacidad de los pollos para sintetizar arginina, el abastecimiento de este aminoácido es absolutamente dependiente de la dieta, lo cual convierte a esta especie en un sistema controlable y altamente confiable para evaluar la actividad inmunológica de los RNI, ya sea ésta antibacteriana, antiparasitaria, antimicótica o antitumoral (Green *et al.*, 1990 y 1991; Hibbs *et al.*, 1987, Sung *et al.*, 1991). Por otra parte, esta especie permitiría realizar ensayos experimentales a nivel de granja, utilizando las dietas existentes con el fin de evaluar la producción de los RNI por dieta y efectuar ensayos de patogenésis con diferentes agentes etiológicos, relacionando la presentación de las patologías con la producción y cuantificación de los RNI, además de poder estudiar el efecto de la L-Arginina en la inmunidad del huésped.

CONCLUSIÓN

En conclusión, las células fagocíticas de las especies uricotélicas y ureotélicas en el cumplimiento de su función de brindar protección al huésped contra la agresión, sea ésta de origen infeccioso o no, además de poseer mecanismos para la generación de radicales del oxígeno responsables de

la acción antimicrobiana, poseen otro mecanismo especializado en la producción de radicales del N, entre ellos el NO y los NO₂, compuestos que ejercen efecto antimicrobiano contra bacterias, parásitos, hongos y evitando el desarrollo de células tumorales que actúan contra patógenos intracelulares en general.

Los mamíferos generan los RNI a partir de la L-Arginina, la cual pueden sintetizar de novo a diferencia de las aves, especie que dada su incapacidad de síntesis de dicho aminoácido, produce los RNI a partir del abastecimiento de arginina en la dieta. Por esta razón las aves constituyen un modelo de investigación confiable para evaluar no sólo la producción de los RNI en esta especie, sino también para valorar la actividad inmunológica de dichos compuestos

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Adams, L.; Hibbs J.; Taintor R.; Krahenbuhl, J. 1990 Microbiostatic effect of murine activated macrophages for *Toxoplasma gondii* J Immunol 144:2725-2729
2. Austic, R.; Nesheim, M. 1991 Arginine, ornithine and proline metabolism of chicks Influence of diet and heredity J Nutr 101 1403-1407
3. Byrne, G.; Faubion, I. 1982 Lymphokine mediated microbiostatic mechanism restrict *Chlamydia psittaci* growth in macrophages J Immunol 128 469-473
4. Denis, M. 1991 Tumor necrosis factor and granulocyte macrophage colony stimulating factor stimulate human macrophages to restrict growth of virulent mycobacterium avium J of Leukocyte Biol 49:380-387
5. Ding, A.; Nathan, C.; Stuehr, D. 1988 Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages J Immunol 141:2407-2412
6. Drapier, J.; Hibbs, J. 1988 Differentiation of murine macrophages to express nonspecific cytotoxicity for tumor cells results in L Arginine dependent inhibition of mitochondrial Iron-Sulfur enzymes in the macrophage effector cells J Immunol 140:2829-2839
7. Green, S.; Crawford, R.; Monte, H.; Nacy, C. 1990 Leishmania major amastigotes initiate the L-Arginine dependent killing mechanism in IFN γ stimulated macrophage by induction of tumor necrosis factor α J Immunol 145:4290-4297
8. ———.; Nacy, C.; Meltzer, M. 1991 Cytokine induced synthesis of nitrogen oxides in macrophages A protective host response to Leishmania and other intracellular pathogens J of Leukocyte Biol 50:93-103
9. Hibbs, J.; Taintor, R.; Vavrin, Z. 1987 Macrophage cytotoxicity Role for L-Arginine deiminase and iminonitrogen oxidation to nitrite Science 235:473-476
10. ———.; Vavrin, Z.; Taintor, R. 1987 L-Arginine is required for expression of the activated macrophage effector mechanism causing selective metabolic inhibition in target cells J Immunol 138:550-565
11. Iyengar, R.; Stuehr, D.; Marletta, M. 1987 Macrophage synthesis of nitrite, nitrate and N-nitrosamines precursors and role of the respiratory burst Proc Natl Acad Sci USA 84:6369-6373
12. Lancaster, J.; Hibbs, J. 1980 Demonstration of iron nitrosyl complex formation by cytotoxic activated macrophages Proc Natl Acad Sci USA 87:1223-1227
13. Liew, F.; Cox, F. 1991 Nonspecific defense mechanism the role of nitric oxide J Immunol 70:17-21
14. ———.; Millot, S.; Parkinson, C.; Palmer, R.; Moncada, S. 1990 Macrophage killing of Leishmania parasite in vivo is mediated by nitric oxide from L-Arginine Nature 33 664-666
15. Miwa, M.; Stoehr, M.; Marletta, J.; Wishnok, S.; Tannenbaum, S., 1987 Nitrosation of amines by stimulated macrophages Carcinogenesis 8 955-958
16. Murray, H.; Byrne, G.; Rothermel, C.; Cartell, D. 1983 Lymphokine enhances oxygen independent activity against intracellular pathogens J Exp Med 158: 234-239
17. Palmer, R.; Ashton, D., Moncada, S 1990 Vascular endothelial cells synthesis nitric oxide from L-Arginine J Immunol 144:4794-4797
18. Sibley, L.; Krahenbohl, J.; Wedner, E. 1985 Lymphokine activation of J77468 cells and mouse peritoneal macrophages challenged with *Toxoplasma gondii* Infect Immunol 49: 760-765
19. Stuehr, D.; Marletta, M. 1988 Induction of nitrite/nitrate synthesis in murine macrophages by BCG infection lymphokines or interferon- γ J Immunol 139 518-535
20. Sung, Y, Hotchkiss, J ; Austic, R.; Dietert, R. 1991 L Arginine dependent production of a reactive nitrogen intermediate by macrophages of a uncotetic species J of Leukocyte Biol 50:49-56
21. Tamir, H., Ratner, S. 1983 A study os ornithine citruline and arginine synthesis in growing chicks Arch Biochem Biophys 102 259-263



Calidad editorial y audiovisual agropecuaria

INSTRUCCIONES PARA LOS AUTORES

La Revista ICA contiene dos secciones una Agrícola y una Pecuaria, las cuales incluyen artículos científicos, basados en resultados de investigación, y técnicos de diferente naturaleza, que no presentan una prueba de hipótesis como por ejemplo, descripción de métodos o revisiones de literatura

ARTÍCULOS CIENTÍFICOS

Los originales deben ser enviados al Secretario del Consejo Editorial de la Revista, escritos a máquina o en computador, impresos en letra de alta calidad (NLQ) a doble espacio y con un máximo de 25 páginas tamaño carta, con márgenes de tres centímetros

La primera página incluye

Título No debe exceder de 15 palabras, si ello no es posible se deberá incluir un subtítulo

Autores Incluye el nombre, inicial del segundo nombre si lo tiene primer apellido e inicial del segundo. A continuación irán las iniciales de los títulos académicos, los autores van en orden de acuerdo con la importancia de su contribución a la investigación y no en orden alfabético o de rango. En pie de página se indicará el nombre y la dirección de la institución en la cual se condujo la investigación

Resumen Debe ser conciso e informará sobre la justificación, objetivos, metodología y resultados precisos de la investigación. Además indicará los límites de la validez y las implicaciones de los resultados. Esta parte no debe exceder de 250 palabras, en un solo párrafo

Abstract Debe ser una traducción fiel al idioma inglés del resumen

Palabras Claves Adicionales Como parte final del resumen y del abstract se colocará una lista de "Palabras Claves Adicionales", la cual tiene por objeto facilitar el uso de los sistemas modernos de catalogación y búsqueda de información por computador

Estructura Cada artículo debe constar fundamentalmente de los siguientes capítulos: Introducción (sin título) no debe exceder de 350 palabras, Revisión de Literatura, Materiales y Métodos, Resultados y Discusión, Conclusiones y Referencias Bibliográficas. No se deberán usar otros títulos excepto cuando las secciones son demasiado extensas en cuyo caso se podrá hacer uso de subtítulos.

Las notas de pie de página sólo se utilizarán para las tablas. Estas se deben presentar en páginas separadas e identificadas con números arábigos, continuos, el título irá en la parte superior de la misma. Notas dentro del texto deben ir entre paréntesis y en el lugar apropiado.

Ilustraciones Deben presentarse en páginas separadas e identificadas con números arábigos con su correspondiente leyenda. Se aceptarán figuras diseñadas en computador cuando éstas sean impresas con características de alta calidad. Ilustraciones a color deben venir en transparencias, en blanco y negro se reciben en papel brillante de 9 x 12 centímetros. Cada ilustración debe traer su correspondiente crédito.

Referencias Bibliográficas Deben ir ordenadas alfabéticamente. Una referencia completa de una publicación periódica tiene los siguientes elementos: autor, año, título del artículo, nombre de la revista (en negrilla), volumen (subrayado), número (entre paréntesis) y páginas. Ejemplo: Terpstra C (1991) Hog cholera. An update of present knowledge. *Br. Vet. J.* 147 (1) 397-405.

Citas de Bibliografía Solamente se incluyen referencias publicadas, citando el apellido del autor y el año de la publicación entre paréntesis cuando se trate de un autor. Ejemplo: Hernández (1984). Cuando se trate de dos autores el apellido de cada uno unidos por la conjunción "y" más el año de la publicación entre paréntesis. Ejemplo: Pérez y Díaz (1992). Para tres o más autores se cita el apellido del primero seguido de las palabras "et al" subrayadas y el año entre paréntesis. Ejemplo: Pérez et al (1990).

Estilo Es necesario que sea impersonal con abreviaciones de uso común y usando el sistema métrico decimal o el internacional.

ARTÍCULOS TÉCNICOS

En esta sección se incluyen fundamentalmente trabajos que en forma directa no presentan pruebas de hipótesis. Deben seguir las normas apropiadas para artículos científicos pero con las modificaciones apropiadas a la naturaleza del trabajo.

Estructura Debe tener: Título, resumen, abstract, autor, introducción (no titulada), cuerpo del artículo y referencias bibliográficas. También debe presentar las Palabras Claves Adicionales.

SECCIÓN AGRÍCOLA

ARTÍCULOS CIENTÍFICOS

	Página
- Requerimientos, manejo de agua y fertilización nitrogenada en la variedad de arroz Oryzica - 3. <i>Carlos A. Gallardo B.</i>	193
- Control químico de enfermedades foliares para la producción de semilla de repollo. (<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>) en el Oriente Antioqueño. <i>Luz E. Agudelo C., María T. Lopera Z., Jorge E. Jaramillo N.; Mario Lobo A.</i>	205
- Características morfológicas de 25 variedades criollas y mejoradas de trigo. <i>Edgar G. Gómez L.; Guillermo Bolaños E.; Rodrigo Brito M.</i>	215
- Selección simultánea de genotipos de algodón (<i>Gossypium hirsutum</i> L.) por altos rendimientos y estabilidad. <i>Miguel Espitia C.; Hermes Araméndiz T.; Angel Mendoza O.</i>	227
- Peletización de semillas de soya y su interacción con el uso de inoculantes y de nitrógeno. <i>Hugo E. Castro F.</i>	235

ARTÍCULOS TÉCNICOS

- Comparación de tres métodos cuantitativos para evaluar el desarrollo y control de epidemias en plantas. <i>Julio R. Galindo P.</i>	243
---	-----

SECCIÓN PECUARIA

ARTÍCULOS CIENTÍFICOS

- Características nutritivas de praderas nativas manejadas con quema en los Llanos Orientales de Colombia. <i>Matilde Cipagauta H.</i>	253
- Arsenicotxicosis en bovinos por aditivo no nutricional en sal. <i>Jorge E. Torres; Martha Carpintero de Jimeno, Cecilia Trujillo de T.</i>	265
- Producción de lana en cinco razas ovinas a diferentes edades. <i>Rodrigo Pastrana B.</i>	279

ARTÍCULOS TÉCNICOS

- Reactivos intermediarios del nitrógeno: un mecanismo de defensa contra la infección. <i>Ruth M. Valbuena S.</i>	287
--	-----