

RADICALES LIBRES E INFLAMACIÓN

(Free radicals and inflammation)

Maribel Bravo y Aura López-Ortega

Universidad Centrocidental Lisandro Alvarado, Decanato de Ciencias Veterinarias, Unidad de Investigación en Ciencias Funcionales Dr. H. Moussatché, Apartado Postal 267, Barquisimeto, Venezuela.

Palabras claves: Inflamación, radicales libres, histamina

RESUMEN

En el presente trabajo se realizó un recorrido de los aspectos mas relevantes relacionados con el proceso de generación de radicales libres en las células responsables de la liberación de mediadores químicos en los procesos inflamatorios. De esta manera se trata de explicar uno de los mecanismos importantes que suceden de manera simultánea a la liberación de mediadores químicos de la inflamación y su posible papel en el daño al tejido.

ABSTRACT

The present work is a overview of the most relevant aspect related to the generating process of free radicals in inflammatory cells involved in chemical mediators liberation. In this way, explanations about this important mechanism simultaneous to release of inflammatory chemical mediators and their possible tissue damage were described.

INFLAMACION

El organismo cuenta con este mecanismo de defensa mediante el cual localiza, destruye y elimina un agente nocivo. Se la puede catalogar como una reacción esterotipada frente a agentes agresores de muy variada naturaleza como:

- a) físico-química: tóxicos, radiaciones
- b) biológica: bacterias, virus, parásitos, toxinas
- c) mecánica: traumatismos, hipertensión

La reacción inflamatoria suministra un medio a través del cual los factores defensivos como: inmunoglobulinas, complemento y células fagocitarias, pueden tener acceso directo a los lugares de invasión microbiana o de lesión tisular (Tizard, 1995). Se inicia el proceso con el aumento del flujo sanguíneo, durante varias horas, hacia la zona afectada. A nivel capilar hay: vasodilatación (hiperemia), aumento de la presión con elevación de la permeabilidad (edema) y filtración (plasmaféresis) con posterior estasis por pérdida del plasma, lo que induce un aumento de la viscosidad sanguínea. Esto genera una marginación de los leucocitos (neutrófilos, eosinófilos y monocitos) facilitando la diapedésis, sin embargo, antes de la migración hacia los tejidos, los leucocitos deben adherirse a las células del endotelio con la intervención de diferentes factores interleucina 1 (IL-1), factor de necrosis tumoral α y β (TNF- α , TNF- β), interferón gamma (ITN- γ). Las plaquetas se adhieren al endotelio vascular y liberan factores vasoactivos entre ellos la histamina. Debido a la hemoconcentración los glóbulos rojos se aglutinan formando un trombo, facilitado esto, por la actividad procoagulante y de trombosis que presentan algunos de los factores mencionados.

En la lesión la liberación de mediadores, debido a la activación de monocitos y leucocitos polimorfonucleares, estaría involucrada en el daño tisular. En estas células inflamatorias se producen radicales libres, particularmente las especies reactivas del:

- a) oxígeno (ROS) como el anión superóxido (O_2^-) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2)
- b) del nitrógeno (RONS) como el óxido nítrico (NO).
- c) en presencia de mieloperoxidasa, el hipoclorito (HOCl). Ellas han sido implicadas en el daño tisular observado en la enfermedad inflamatoria del intestino y en otras condiciones, tales como la isquemia / reperfusión durante el trasplante de órganos y en el síndrome de distrés respiratorio (Buffinton, 1995).

RADICALES LIBRES

Un radical libre es una especie capaz de existir independientemente y que contiene uno o más electrones no apareados. Los radicales pueden formarse por la pérdida o por la ganancia de un electrón único desde un compuesto no radical. Esto es facilitado por el rompimiento de un enlace covalente y cada uno de los electrones del par es compartido con cada átomo, este proceso es conocido como fisión homolítica (Márquez, 1998).

1.-Especies reactivas del oxígeno

Entre ellas se encuentran: el oxígeno (O_2) en estado estable (ground state), el cual posee dos electrones impares cada uno localizado en un diferente orbital π pero con spin paralelo. El O_2 es un buen agente oxidante: los hidrogeniones que atrae ocupan los spin vacantes en el orbital π , los cuales se colocan en forma antiparalela. Al captar energía, el O_2 puede producir formas más reactivas conocidas como oxígeno singlete ($\Delta g O_2$) que presenta los dos electrones apareados en un mismo orbital π , perdiendo su calidad de radical pero al removerse el spin de restricción, su habilidad oxidante aparece muy aumentada. Si un simple electrón se adiciona a la molécula ground state del oxígeno en el orbital π , se produce el radical superóxido (O_2^-) el cual posee sólo un electrón impar. En los sistemas biológicos, el producto de reducción del oxígeno con el transporte de dos electrones da como resultado el peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Este es un agente oxidante, el cual se descompone fácilmente por fisión homolítica resultando el radical hidroxilo, OH^- (Halliwell y Gutteridge, 1989).

2.-Especies reactivas del nitrógeno

El óxido nítrico (NO) es el representante mas relevante de estas especies. Su papel de mensajero molecular está ampliamente reconocida como también su mediación en una diversidad de funciones incluyendo vasodilatación, neurotransmisión, etc. y su actividad antimicrobiana y antitumoral. Diferentes células tales como: macrófagos, endoteliales, neuronas, musculares lisas y cardíacas, etc., lo sintetizan a partir de la L-arginina (Palmer, Ashton y Moncada, 1988).

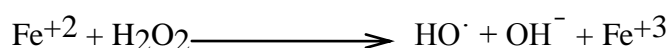
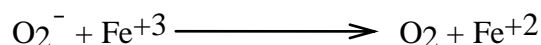
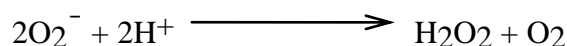
El conocimiento de la intervención del óxido nítrico como mediador en diferentes sistemas fisiológicos, tuvo su punto de partida cuando el investigador de origen ecuatoriano Salvador Moncada junto a su grupo de trabajo en Wellcome Research Laboratories (Inglaterra) describen en 1986 la formación de NO a través de la vía de la L-arginina (Moncada, 1993) detectando la presencia de éste por medio de bioensayo, quimoluminiscencia o por espectrometría de masa. En células endoteliales sólo la L-arginina es capaz de aumentar la formación de NO inducida por la bradicinina y por el ionóforo de Ca denominado A23187. La síntesis se realiza exclusivamente a expensas de los átomos de N del grupo guanidino de la L-arginina. Mucho se ha avanzado en este campo llegándose a obtener la clonación y expresión de la enzima (NOS) que cataliza la síntesis del NO en diferentes células, entre otras hepatocitos humanos (Geller y col., 1993)

DAÑO OXIDATIVO DE LOS TEJIDOS

La exposición de los tejidos a oxidantes *in vitro* causa incremento en la permeabilidad de la mucosa, citotoxicidad, pérdida de la actividad de la gliceraldehído deshidrogenasa, alteración de la función secretora en las células epiteliales del colon y en el transporte activo del sodio. En modelos animales de inflamación del colon, se obtuvo beneficio terapéutico al administrar dosis altas de vitamina E por vía oral o del nuevo componente antioxidante MDL 73404. Esto apoya la idea de que el deterioro de las defensas antioxidantes de la mucosa, contribuye a la patogénesis del daño celular (Buffinton, 1995).

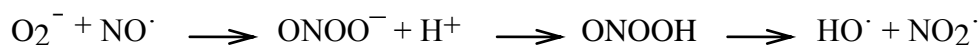
La lesión de la pared vascular secundaria a la inflamación, a la isquemia/reperfusión, al metabolismo xenobiótico, etc., dá como resultado una pérdida de la función de barrera del endotelio, alteración de la adhesión plaquetaria y una anormal vaso regulación. La capacidad de la superóxido dismutasa (SOD), enzima responsable de la degradación del radical superóxido, de disminuir el daño endotelial indicaría la participación de las formas reactivas de oxígeno en estos procesos patológicos.

Además del efecto tóxico *per se* del O_2^- , su acción *in vivo* estaría aparentemente mediada por la generación de otro radical aún mas reactivo, el hidroxilo (HO^\cdot), a través de la reacción Haber-Weiss que es catalizada por el hierro:



La utilización de esta vía para la formación del radical hidroxilo requiere la participación del peróxido de hidrógeno y del hierro cuya concentración en la célula puede disminuir por la presencia de sistemas quelantes del hierro o antioxidantes como el ascorbato, limitando la formación *in vivo* del radical hidroxilo a partir del superóxido.

Beckman y col. (1990) proponen que el óxido nítrico (NO^\cdot) que contiene un electrón desapareado reaccionaría rápidamente con el radical superóxido originando el peroxi-nitrito ($ONOO^-$) que en medio ácido derivaría especies citotóxicas, de acuerdo a la siguiente secuencia:



La interacción del óxido nítrico con el radical superóxido tiene lugar en las células vasculares y en los leucocitos, lo que trae como consecuencia la disminución de

las propiedades de relajación vascular y de anti-agregación plaquetaria. También en los macrófagos activados hay formación del peroxi-nitrito, sin embargo, la acción del ONOO^- en los sistemas biológicos es dependiente en forma crítica de las características ambientales del territorio tisular sobre el cual está actuando (Moro y col., 1994) y aún en ciertas condiciones se puede transformar en un factor que protege contra algunos tipos de estrés oxidativo (Sergent y col., 1997).

Los radicales libres derivados del oxígeno, en particular el superóxido (O_2^-), están involucrados en la patogénesis del daño isquémico celular. Su acción es habitualmente inhibida por compuestos antioxidantes como también por la adenosina que presenta un efecto citoprotector a la isquemia, mediante un mecanismo relacionado con la activación de enzimas antioxidantes (SOD, catalasa, etc.). Además, el radical superóxido es capaz de inactivar al factor endógeno de vasodilatación, producido por el endotelio vascular, que probablemente es idéntico al óxido nítrico (NO), cuyo amplio espectro de acciones vá desde la trasducción de señales celulares hasta la regulación de la resistencia vascular. Se ha determinado que la inducción de la síntesis de NO en los macrófagos suprime la oxidación mediada por células, de la LDL (López-Ortega, 1995).

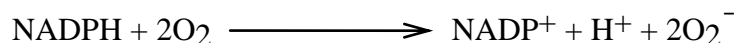
La respuesta de la piel a la inflamación está controlada por mediadores que se originan en los keratinocitos y corresponden fundamentalmente a las citocinas (TNF- α , IL-1, IL-6, etc.) y quimiocinas (IL-8, proteína quimiotáctica de monocitos (MPC-1), proteína inflamatoria de macrófagos (MIP), etc.) que son responsables de la atracción local de las células migratorias, activación de las células fagocitarias, adherencia al endotelio vascular de los leucocitos, aumento de la permeabilidad vascular y migración de los fagocitos desde los vasos, etc. Se ha demostrado que agentes, como la antralina, inductores de las citocinas inflamatorias en keratinocitos humanos, basan su acción en la producción de formas reactivas del oxígeno donde el radical OH^- y RO^- (alcoholi) serían los responsables de la expresión genética del TNF- α y de la IL-8, siendo la SOD un factor que previene efectivamente esta expresión en los keratinocitos (Lange y col., 1998).

La acción de la superóxido dismutasa es, entre otros, un factor protector al daño oxidativo de los tejidos. Esta enzima se encuentra en diferentes formas: como MnSOD en la matriz mitocondrial y como Cu, ZnSOD en el citosol. Mas recientemente se ha aislado la superóxido dismutasa extracelular (EC-SOD) presente en los fluídos de este origen y se la ha obtenido en pulmón de rata, donde es producida por células de la pared arterial y por macrófagos alveolares. La expresión de la EC-SOD estaría regulada por el estrés inflamatorio y actúa como un factor protector de la superficie celular de macrófagos y neutrófilos, entre otros (Loenders y col., 1998).

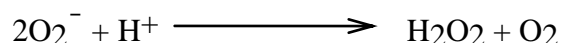
FAGOCITOSIS

La mayoría de los estudios de la bioquímica de la fagocitosis se refieren a neutrófilos y macrófagos, especialmente de origen alveolar humano. Al instalarse el proceso fagocitario estos dos tipos de células muestran un aumento notable del consumo de oxígeno, que no es inhibido por el cianuro. A esta acelerada captación de O₂ se la designa como "estallido respiratorio" aunque no está relacionado con el transporte mitocondrial de electrones y se produce por la activación de un complejo enzimático (NADPH-oxidasa) unido a la membrana plasmática, que oxida al NADPH proveniente de la vía de las pentosas fosfato en el citosol.

Los electrones producidos son utilizados para reducir al oxígeno que se transforma en anión superóxido (Halliwell y Gutteridge, 1989):



En la vacuola fagocitaria el pH comienza a disminuir y esto da la posibilidad que el radical superóxido se transforme en peróxido de hidrógeno. Tanto el O₂⁻ como el H₂O₂ tienen marcada capacidad bactericida, este es un ejemplo en que la generación de formas reactivas del oxígeno resulta beneficiosa para la célula:



En el neutrófilo ocurre el estallido respiratorio como parte del proceso de destrucción de material extraño. Al unirse a una partícula a los neutrófilos se incrementa el consumo de oxígeno alrededor de 100 veces. La actividad de estas células leucocitarias genera oxidantes en el sitio de adhesión, alcanzando dentro de los neutrófilos polimorfonucleares (PMN) concentraciones entre 0,1 a 1 M. Recientes reportes indican que la formación de radicales libres en los neutrófilos se muestra activada por el ITN-γ pero es inhibida por la IL-10 (Chaves y col., 1996).

Los eosinófilos son células fagocíticas, en sus gránulos contienen grandes cantidades de peroxidasa que es químicamente distinta de la que aparece en los neutrófilos y preferentemente utiliza iones bromuro en lugar de iones cloruro para producir el radical libre OBr⁻, esta peroxidasa eosinofílica es más eficaz que la neutrófilica para eliminar ciertos micro-organismos. También en la actividad fagocítica de los macrófagos intervienen los radicales libres, se ha determinado que en alvéolos humanos la presencia de partículas aéreas contaminadas induce la formación de oxidantes en los macrófagos de este territorio tisular (Becker y col., 1996).

LIBERACION DE HISTAMINA

El papel de la histamina como neurotransmisor y sus receptores específicos en el cerebro ha sido confirmado por estudios químicos, histoquímicos y electrofisiológicos. El pool neuronal de histamina comprende neuronas, células gliales y mastocitos. En sinaptosomas de cerebro de ratas se ha observado que la lipopeoxidación dependiente del hierro disminuye el pool neuronal de histamina lo cual afectaría la función del sistema nervioso central (Rafalowska, 1991).

Se ha demostrado experimentalmente que los radicales libres del oxígeno generados por el sistema xantino oxidasa / hipoxantina inducen la liberación de histamina desde células cebadas aisladas y desde células sanguíneas (Poch y col., 1996). Así mismo, las especies reactivas del oxígeno formadas en el estallido respiratorio de eosinófilos y neutrófilos, inician la secreción de histamina desde los mastocitos. En los tejidos, los basófilos provocan inflamación, ya que sus gránulos contienen aminas vasoactivas, como la histamina y serotonina. También los ácidos grasos poli-insaturados como el araquidónico y el linoléico producen liberación de histamina desde las células cebadas de serosa de rata, aisladas y purificadas, en presencia de sistemas oxidantes tales como el inducido por el fenobarbital en los microsomas hepáticos de rata, prostaglandinaH-sintetasa (PHS) o lipoxigenasa de la soya.

Masini y col. (1990) demuestran que esta liberación de histamina tiene un curso lento y está asociado con un incremento significativo del malondialdehído (MDA) y la generación de dienos conjugados, sugiriendo una relación entre la liberación de histamina y la peroxidación lipídica. La secreción de histamina fué inhibida con la intervención de antiradicales libres tales como el D-manitol, glutatión reducido y α -tocoferol. Algunos inhibidores de la ciclooxigenasa y lipoxigenasa, la cimetidina y derivados de la carnitina, actúan en forma diferente en la inhibición de la liberación de histamina. Además la disminución de la liberación de este mediador difiere completamente en las células cebadas con respecto a la observada en los monocitos (Bolsmann y col., 1996).

El daño de la mucosa del intestino va acompañado en ciertos casos con la transformación de la xantino deshidrogenasa (XD) a xantino oxidasa (XO), ésta promueve la reacción entre la hipoxantina y el O_2 , dando como uno de sus productos el anión superóxido que a su vez origina otras especies muy reactivas del O_2 . La histamina ha demostrado la propiedad de elevar la XO y trabajos recientes relacionan esto con la infección con *Helicobacter pylori*, estrechamente asociada con la úlcera crónica duodenal (Ben-Hamida y col., 1998). Como también se ha determinado que en la úlcera gástrica están involucrados los radicales libres y la histamina, agravando esto el cigarrillo que tiene la capacidad de elevar la actividad de la XO (Chow y col., 1998).

La histamina tiene un importante papel en la fisiopatología del daño hepático, la concentración sanguínea de ella se encuentra elevada en la hepatitis activa crónica, sin embargo no está claro el origen celular de la histamina hepática. Los macrófagos del ratón sintetizan este mediador a través de la vía de la histidina decarboxilasa (HDC) y en

el hígado hay células semejante a los macrófagos, incluyendo las de Kupffer. Un reciente reporte de Suzuki y Nakano (1998) establece que un hepato-tóxico: el tetracloruro de carbono (CCl₄) produce en ratones, una elevación de la actividad de la HDC con aumento de la producción hepática de histamina, por células semejantes a los macrófagos.

Algunos estudios indican que las plaquetas en reposo y las activadas inducen la liberación de histamina desde los mastocitos por generación de radicales libres. La liberación de este mediador a partir de mastocitos de serosa de rata, inducida por incubación con plaquetas humanas en reposo o por exposición de éstos a sobrenadantes obtenidos de plaquetas activadas, está acompañada por la generación de productos de peroxidación lipídica de la membrana y se reduce en forma significativa por la intervención de anti-radicales libres. Esto sugiere la participación de los radicales libres en la actividad del factor liberador de histamina derivado de plaquetas (PDHRF), basándose en que las condiciones que generan remoción de radicales libres derivados de oxígeno, como es la intervención de la superóxido dismutasa y de la catalasa, inhiben fuertemente la liberación de histamina por la activación de plaquetas (Mannaioni, 1991).

BIBLIOGRAFIA

1. **Becker, S., Soukup, J., Gilmour, M. and Devlin, R.** (1996). Stimulation of Human and Rat Alveolar Macrophages by Urban Air Particulates: Effects on Oxidant Radicals Generation and Cytokine Production. *Toxicol. Applied Pharmacol.*, 141: 637-648
2. **Beckman, J., Beckman, T., Chen, J., Marshall, P. and Freeman, B.** (1990). Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: Implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 87:1620-1624
3. **Ben-Hamida, A., Man, W., McNeil, N. and Spencer, J.** (1998). Histamine, xanthine oxidase generated oxygen-derived free radicals and *Helicobacter pylori* in gastroduodenal inflammation and ulceration. *Inflamm. Res.*, 47: 193-199
4. **Bolsmann, K., Braam, U., Eichelberg, D., Greven, T., Jungbluth, C., Schmutzler, W. and Zwadlo-Klarwasser, G.** (1996). Histamine release from mast cells and monocytes: The effects of azelastine, reproterol and vitamin A-analogues. *Inflamm. Res.*, 45 (1): S5-S6
5. **Buffinton, G. and Doe, W.** (1995). Depleted mucosal antioxidant defences in inflammatory bowel disease. *Free Radic. Biol. Med.*, 19 (6): 911-918
6. **Chaves, M., Silvestrini, A., Silva-Teixeira, D. and Nogueira-Machado, J.** (1996). Effect in vitro of gamma interferon and interleukin-10 on generation of oxidizing species by human granulocytes. *Inflamm. Res.*, 45: 313-315
7. **Chow, J., Ma, L. and Cho, Ch.** (1998). Involvement of free radicals and histamine in the potentiating action of cigarette smoke exposure on ethanol-induced gastric mucosal damage in rats. *Free Radic. Biol. Med.*, 24: 1285-1293
8. **Geller, D., Lowenstein, Ch., Shapiro, R., Nussler, A., Disilvio, M., Wang, S., Nakayama, D., Simmons, R., Snyder, S. and Billiar, T.** (1993). Molecular cloning and expression of inducible nitric oxide synthase from human hepatocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 90: 3491-3495
9. **Halliwell, B. and Gutteridge, J.** (1989). *Free Radical in Biology and Medicine*, Ed 2a, Oxford, Clarendon Press, p 12-14 y 377-381
10. **Lange, R., Hayden, P., Chignell, C. and Luster, M.** (1998). Anthralin stimulates keratinocyte-derived proinflammatory cytokines via generation of reactive oxygen species. *Inflamm. Res.*, 47:174-181
11. **Loenders, B., Van Mechelen, E., Nicolai, S., Buysens, N., Van Osselaer, N., Jorens, P., Willems, J., Herman, A. and Slegers, H.** (1998). Localization of extracellular superoxide dismutase in rat lung: neutrophils and macrophages as carriers of the enzyme. *Free Radic. Biol. Med.*, 24: 1097-1106
12. **López-Ortega, A.** (1995). Acción de diferentes antioxidantes sobre la modificación de la LDL humana causada por células endoteliales y por el ión cúprico. Trabajo de Ascenso Prof. Titular, Universidad Centroccidental L.A., Barquisimeto, Venezuela, p 52

13. **Mannaioni, P., Pistelli, A., Gambassi, F., Di Bello, M., Raspanti, S. and Masini, E.** (1991). A place for free radicals in platelet-derived histamine releasing factor (PDHRF) and evidence that histaminergic receptors modulated platelet aggregation. *Agents Actions*, 33: 57-60
14. **Márquez, I. C.** (1998) Determinación de los parámetros de peroxidación lipídica en células luteales de hembras bovinas lecheras. Trabajo de Grado Magister Scientiarum en Producción de Leche. Decanato de Ciencias Veterinarias. Universidad Centroccidental "Lisandro Alvarado", Barquisimeto, Venezuela.
15. **Masini, E., Palmerani, B., Gambassi, F., Pistelli, E., Occupati, B., Ciuffi, M., Bani, T. and Mannaioni, P.** (1990). Histamine release from rat mast cells induced by metabolic activation of polyunsaturated fatty acids into free radicals. *Biochem. Pharmacol.*, 39 (5): 879-889
16. **Moncada, S.** (1995). El descubrimiento de la vía L-arginina: óxido nítrico. En López, P: La vía L-arginina-óxido nítrico: De su descubrimiento a sus aplicaciones clínicas, Ed. 1a, Ecuador, Ediciones Científicas
17. **Moro, M., Darley, V., Goodwin, D., Read, N., Zamora, R., Feelisch, M., Radomski, M. and Moncada, S.** (1994). Paradoxical fate and biological action of peroxynitrite on human platelets. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 91: 6702-6706
18. **Palmer, R., Ashton, D. and Moncada, S.** (1988). Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature*, 333: 664-666
19. **Poch, B., Gansauge, F., Gansauge, S., Anger, T., Nilsson, U., Schoenberg, M. and Beger, H.** (1996). Release of histamine in whole blood by oxygen radicals: Division between specific and unspecific processes. *Inflamm. Res.*, 45: 428-433
20. **Rafalowska, U. and Walaitys, E.** (1991). Peroxidation-induced changes of histamine metabolism and transport of its precursor histidine in rat brain synaptosomes. *Free Radic. Biol. Med.*, 10: 23-28
21. **Susuki, M. and Nakano, K.** (1998). Histamine synthesis by liver macrophages and its role in regeneration of the injured liver. *Inflamm. res.*, 47 (1): S44-S45