

BASES CELULARES Y FISIOPATOLOGICAS DEL CHOQUE ENDOTOXICO POR BACTERIAS GRAM-NEGATIVAS

Norman Rojas Campos*

RESUMEN

La sepsis por bacterias Gramnegativas, un diagnóstico clínico relativamente raro hace solo unas décadas, es quizá el problema infeccioso más importante en los hospitales hoy en día. A pesar de los avances recientes en la comprensión de los mecanismos fisiopatológicos de la sepsis y las mejoras en la terapia antimicrobiana, la tasa de mortalidad por este cuadro lamentablemente sigue siendo muy alta, particularmente después del establecimiento del choque séptico.

La mayoría de los efectos biológicos y los consecuentes signos y síntomas de la sepsis, se inician con el contacto de la endotoxina bacteriana o lipopolisacárido (LPS) con células susceptibles. En esta revisión, se discuten conceptos acerca de la interacción primaria del LPS con receptores humorales y celulares en mamíferos, destacando los estudios recientes en la caracterización de las proteínas solubles de unión a LPS, así como en la cascada de eventos intracelulares que se desencadena como respuesta al contacto con LPS. Se discute acerca de la producción, inducida por LPS, de mediadores solubles por parte de macrófagos y otras células y la contribución potencial de estos factores en la patogénesis del choque

endotóxico.

Los conocimientos generados por estudios celulares y moleculares de la acción de las endotoxinas son vitales para dirigir adecuadamente la terapia del choque séptico. La identificación y caracterización de moléculas blanco del LPS a nivel celular tiene importantes implicaciones en el combate de este importante problema clínico. (Rev. Costarricense de Ciencias Médicas. 1996. 17-4:37-52)

Palabras clave: lipopolisacárido, choque séptico, citoquinas, bacterias Gramnegativas, receptores celulares

ABSTRACT

Gram negative sepsis, a relatively rare clinical diagnosis only a few decades ago, is perhaps the most important infectious disease in hospitals. Despite recent advances in the understanding of the pathophysiological mechanisms of sepsis and improved antimicrobial therapy, the mortality rate due to Gram negative sepsis remains regrettably high, particularly after the onset of shock.

The majority of biological effects, and consequently, signs and symptoms of sepsis, initiate with the contact of bacterial endotoxin or lipopolysaccharide (LPS) with responsive mammalian cells. In this review, current concepts about the primary interaction of LPS with humoral and mammalian cell receptors are discussed. Particular emphasis is given on

* Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales,
Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica.
Fax: 225-2374. Teléfono: 207-4275
Correo electrónico: normanr@cariari.ucr.ac.cr.

recent studies on the characterization of soluble LPS binding proteins, as well as findings in the cascade of events elicited by LPS. The LPS-induced production of soluble mediators from macrophages and other cell types, and the potential contribution of these mediators to endotoxin shock is also discussed.

The knowledge generated by cellular and molecular studies of endotoxin activities is vital for the proper focusing of therapy in patients with septic shock. The identification and characterization of membrane as well as intracellular targets of LPS have important implications for the therapy of this disease.

INTRODUCCION

El lipopolisacárido (LPS), componente importante de la membrana externa de las bacterias Gram-negativas, es liberado cuando las bacterias mueren y se lisan. El LPS liberado es reconocido como una potente toxina bacteriana, de donde derivó el término endotoxina, y se considera como un factor responsable de las manifestaciones tóxicas en infecciones severas por Gram-negativos y en inflamación generalizada (1). La mayor parte de la evidencia que apoya las respuestas fisiopatológicas mediadas por la endotoxina ha sido obtenida de estudios *in vivo* en animales experimentales, los cuales han mostrado marcadas similitudes con pacientes con sepsis por Gram-negativos, como fiebre, choque y coagulación intravascular diseminada (2).

La estructura química primaria del LPS ha sido bien establecida, y existe abundante información estructural de cada uno de sus dominios (12, 13, 14). El LPS está compuesto de un polisacárido O, un núcleo o "core" que a su vez está unido a un lípido inmerso

en la membrana externa de la bacteria, denominado lípido A. Aun cuando el lípido A es el responsable de la mayoría de los efectos de endotoxinas en animales o en cultivos celulares (3), otros componentes del LPS podrían contribuir también a la actividad biológica. Cabe destacar las actividades adyuvantes e inmunoreguladoras de la proteína asociada al LPS en *Brucella* sp. (4, 5), la activación de la vía alterna de complemento por el polisacárido de la endotoxina (6) o la existencia de receptores celulares para dominios de carbohidratos en la endotoxina y la activación funcional de estas células (7, 8).

La actividad biológica del LPS involucra una potente estimulación sobre un amplio espectro de moléculas efecto ras en el hospedero. Estos efectos incluyen la sobreproducción de citoquinas, tales como el factor de necrosis tumoral-alfa (TNF- α) y la interleucina-1 (IL-1), producidas fundamentalmente por macrófagos (9, 10). Por otro lado, la alta actividad inmunopotenciadora del LPS es capaz de inducir la resistencia inespecífica a infecciones virales y bacterianas y funciona como un potente adyuvante inmunológico en vacunas y toxoides (11).

En esta revisión se resumen experimentos recientes dirigidos a identificar receptores celulares para endotoxina, eventos celulares durante la activación por LPS, así como elementos fisiopatológicos del choque séptico por Gramnegativos.

RECEPTORES PARA LIPOPOLISACARIDO EN MAMIFEROS

Como ha sido demostrado con material sintetizado químicamente, el lípido

A es responsable de la mayoría de los efectos de la endotoxina en células animales (3, 15). El lípido A es necesario para inducir la activación de células de mamíferos; sin embargo, su accesibilidad a proteínas de membrana o células es difícil, dada su localización física dentro de la membrana externa de la bacteria. En el cuadro 1 se resumen algunos de los principales sistemas LPS-receptor descritos hasta la fecha.

Se ha sugerido que la interacción del lípido A con células animales podría darse mediante interacciones hidrofóbicas, o por medio de receptores. En el primer caso hay evidencias que indican que el lípido A puede unirse e insertarse en bicapas lipídicas, y provocar un aumento de la viscosidad de la membrana (16). Asimismo, en macrófagos se ha demostrado que existe una regulación de la activación dependiente de LPS, mediante la interacción con gangliósidos, aunque no está clara la función de los gangliósidos como facilitadores de la inserción del

LPS, como receptores específicos o como cofactores de la activación celular (17, 18).

El uso de sondas radiactivas preparadas con precursores de lípido A suministró reactivos más fáciles de dispersar en soluciones biológicas, adecuados para localizar e identificar posibles receptores celulares para LPS. Con estas sondas se encontró que los receptores acetilados de lipoproteínas de baja densidad (LDL) eran capaces de unir lípido A (19). Este tipo de receptores podría participar en la remoción de endotoxinas de la circulación y transportarlas a los lisosomas, donde pueden ser metabolizadas a sustancias menos activas. Otros receptores que podrían estar involucrados en el aclaramiento y degradación de endotoxina son los antígenos CD11/CD18 (conocidos también como $\beta 2$ integrinas o adhesinas leucocitarias). Estas moléculas unen LPS de la superficie de bacterias intactas o de eritrocitos recubiertos con LPS (20).

Cuadro 1
Principales interacciones del LPS con receptores eucariotas.

| Receptor ^a | Localización | Tipo de interacción | Referencias |
|-----------------------|-----------------|--|-------------|
| Lípidos de membrana | Membrana | Interacciones hidrofóbicas | 16 |
| Gangliósidos | Membrana | Interacciones hidrofóbicas, receptores específicos de LPS? | 17,18 |
| Receptores LDL | Membrana | Remoción de LPS circulante | 19 |
| CD11/CD18 | Membrana | Remoción de LPS circulante | 20 |
| p73 | Membrana | Receptor específico para LPS? | 21 - 28 |
| p38 | Membrana | Reconoce oligosacárido del LPS | 26, 42 |
| p40, p47, p95 | Membrana | Receptores específicos para LPS? | 42 |
| Albumina | Plasma | Proteína de unión al LPS | 6, 35 |
| Complemento | Plasma | Proteína de unión al LPS | 6, 35 |
| LDL, HDL | Plasma | Proteínas de unión al LPS | 6, 35 |
| LBP | Plasma | Proteína de unión al LPS | 29 - 33 |
| BPI | Gránulos de PMN | Proteína de unión al LPS | 32, 34 |
| CD14 | Membrana | Receptor de complejos LPS-LBP | 36 - 39 |

^a LDL, lipoproteínas de baja densidad; HDL, lipoproteínas de alta densidad; LBP, proteína de unión a lipopolisacárido; BPI, proteína bactericida que incrementa la permeabilidad; PMN, leucocitos polimorfonucleares.

A mediados de la década pasada, Wollenweber y Morrison utilizaron una sonda de LPS radioactiva, ^{125}I -ASD-LPS, para el análisis de esplenocitos de ratón en electroforesis bidimensional (21). Los ensayos revelaron la presencia de una proteína fijadora de LPS con una masa molecular de 73 kDa, que mostraba especificidad por el lípido A (22, 23, 24). La proteína (p73) fue detectada en líneas de macrófagos y células T y B de ratón, así como en monocitos, linfocitos, leucocitos polimorfonucleares y plaquetas humanos (25, 26). Estos datos sugieren la existencia de al menos un receptor específico para el LPS, aunque su papel fisiológico no se ha definido aún. Hay indicios de que la p73 podría interactuar con proteínas G, las cuales promueven la activación de importantes vías metabólicas en células eucariotas (27,28). Por otro lado, además de la p73, existen otras proteínas de membrana, de 38, 40, 47, y 95 kDa, que podrían funcionar como receptores específicos para LPS (42).

En 1986, Ulevitch y colaboradores aislaron una glicoproteína de 60 kDa de suero de conejo, denominada proteína de unión a lipopolisacárido ("Lipopolysaccharide-binding protein", LBP), la cual normalmente se encuentra en suero en una concentración de 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y se eleva a más de 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ durante una respuesta de fase aguda (29). La LBP posee especificidad por el LPS en la región de lípido A, tanto de cepas virulentas como de cepas avirulentas. Se han aislado proteínas similares a la LBP en otros mamíferos, incluyendo humanos, y la homología de las secuencias de ADN sugiere que las distintas especies comparten un mecanismo similar de reconocimiento de LPS (30, 31, 32). A su vez, la LBP es una proteína altamente relacionada con otra proteína que une LPS, la proteína

bactericida que aumenta la permeabilidad ("Bactericidal/permeability increasing protein", BPI), una glicoproteína de 50-60 kDa que ha sido purificada a partir de los gránulos de leucocitos polimorfonucleares (34). La proteína BPI exhibe actividad bactericida *in vitro* muy potente y es probable que se libere junto con otras proteínas en la vacuola fagocítica durante la fagocitosis. Además de estas dos proteínas, se ha encontrado que el LPS también se puede unir a otras proteínas séricas tales como albúmina, factores de complemento y lipoproteínas de alta y baja densidad (6, 35).

Las LBP podrían ser importantes en la movilización de las defensas del hospedero contra las infecciones por bacterias Gram-negativas, al promover la fagocitosis de partículas recubiertas de LPS e incrementar la sensibilidad de leucocitos al LPS (33). En estudios con cultivos celulares primarios y de líneas establecidas, se ha observado que los complejos LPS-LBP son hasta 1000 veces más activos que el LPS en la inducción de citoquinas tales como TNF o IL-1 (32). El receptor para los complejos LBP-LPS ha sido identificado como uno de los antígenos leucocitarios, el CD14 (36). El CD14 es una glicoproteína de 50-55 kDa originalmente descrita como un antígeno de diferenciación de monocitos y macrófagos. La proteína no contiene un dominio transmembrana, sino que está sujeta a la superficie celular por un ancla de glicosilfosfatidilinositol (GPI), un glicolípido de membrana (37, 38). La función del CD14 como receptor ha sido demostrada usando bacterias Gramnegativas, partículas recubiertas de LPS o preparaciones altamente purificadas de LPS. El CD14 se encuentra principalmente en monocitos y macrófagos (90%), pero también se ha

detectado en linfocitos B, granulocitos y otras células de mamíferos (38), así como en sobrenadantes de cultivos de monocitos y en plasma humano normal como CD14 soluble (39).

La existencia de varios tipos de interacciones entre el LPS y componentes humorales y celulares, así como la presencia de distintos receptores distribuidos en múltiples tejidos y órganos de mamíferos, son evidencia del pleiotropismo del LPS, y pueden explicar en parte el espectro de reacciones observadas *in vivo* durante la estimulación con esta molécula. Se está realizando una intensa investigación básica para identificar y caracterizar los receptores de LPS, con el fin de encontrar agentes bloqueadores de la unión que tengan utilidad terapéutica.

MECANISMOS DE ACTIVACION CELULAR POR LPS

Existen tres posibilidades actualmente bajo investigación mediante las cuales el LPS podría estimular a las células sensibles a desencadenar la reacción endotóxica. Primero, transducción directa mediada por CD14, la cual reconoce al complejo LPS-LBP: segundo, transducción indirecta, en la cual el CD14 participa como un aceptor capaz de transferir con alta eficiencia el LPS a otro receptor en la membrana, el cual transmite la señal al interior de la célula: y finalmente, el LPS podría activar ciertos receptores de membrana directamente, sin la ayuda de LBP ni de CD14 (1, 40, 41, 42).

En el primer caso, la interacción del complejo LBP-LPS con el receptor CD14 ha sido el sistema receptor-ligando más estudiado. La introducción (transfección) del gen de CD14 humano a líneas celulares murinas aumenta en gran

medida la respuesta al LPS en presencia de LBP. De la misma manera, líneas celulares que expresan constitutivamente altos niveles de CD14 pueden ser activadas por cantidades de LPS mucho menores (38, 43). Sin embargo, no está claro aún cómo la molécula de CD14, que no está inmersa en la membrana citoplasmática, es capaz de transmitir una señal que causa una activación celular tan profunda.

Las otras dos posibilidades alternativas incluyen la participación de CD14 como un aceptor de LPS incapaz de transmitir señales por sí mismo, pero permite que el LPS active un segundo receptor en la membrana, o bien, la existencia de otros receptores de membrana específicos para LPS. Existen evidencias de que la unión de LPS con CD14 aumenta la cantidad de receptores de adherencia en monocitos lo que promueve la agregación celular (44)

Independientemente de cuál sea el sistema receptor-ligando, es probable que las vías de transducción de señales iniciadas por el LPS sean comunes a otros sistemas de estimulación celular, capaces de amplificar las señales extracelulares en varios órdenes de magnitud. Estas vías incluyen la fosforilación de proteínas y el aumento en la concentración intracelular de iones Ca^{2+} (45).

Desde finales de la década pasada se han presentado informes de activación de macrófagos por LPS vía proteína quinasa C (PKC) y tirosina quinasas (TK) (46, 47). Sin embargo, las pruebas más contundentes de participación de estas vías de transducción han sido proporcionadas por los ensayos de inhibición de la activación por LPS de células mononucleares usando una gran variedad de inhibidores de PKC y TK (48, 49, 50, 51). Un estudio reciente encontró que el LPS inducía

alteraciones en la fosforilación de proteínas de monocitos en el residuo tirosina. Dentro de las proteínas involucradas estaban dos miembros de la familia de tirosina quinasas src, Hck y Lyn, cuyo papel está bajo investigación (52). En la mayoría de los casos la estimulación de las células animales por LPS es potenciada por la presencia de LBP y de CD14, lo cual reafirma su papel importante en la transducción de señales intracelulares. Los efectos de la activación de proteínas quinasas incluyen la regulación de importantes procesos celulares y en metabolismo, mediante la fosforilación de enzimas clave.

Un importante punto en discusión acerca del mecanismo de acción del LPS es el papel de los iones Ca^{2+} . Se ha demostrado que el LPS puede estimular el reciclaje de fosfatidil inositol (PI), y generar así inositol-1,4,5-trifosfato, el cual a su vez libera iones Ca^{2+} de las reservas intracelulares. Este mecanismo, entre otros, provocaría el incremento en la concentración intracelular de Ca^{2+} y la estimulación de proteína quinasas y fosfolipasas dependientes de un aumento en el Ca^{2+} intracelular (53, 54, 55, 56).

A pesar de que las evidencias presentadas en muchos casos no son concluyentes, es muy probable que los mecanismos de activación de células por parte del LPS estén mediados por fosforilación de proteínas y movilización de Ca^{2+} intracelular, lo cual generaría una gran variedad de respuestas celulares, que van desde la producción de moléculas inmunológicamente activas, como las citoquinas, hasta la proliferación de vanas poblaciones de células del sistema inmune. Estos fenómenos podrían ser los principales responsables del efecto inmunoestimulador observado después del

contacto con LPS tanto *in vivo* como *in vitro*. Los principales tipos de respuesta celular a endotoxina se detallan a continuación.

RESPUESTA CELULAR EN LA PATOGENESIS DEL CHOQUE SEPTICO

La estimulación de células de mamíferos con LPS y otros activadores conduce a la activación del factor de transcripción nuclear $NF-\kappa B$, el cual a su vez regula la expresión a nivel de transcripción de varios genes involucrados en la respuesta inflamatoria, tales como moléculas de adhesión celular (CAMs), interleucinas, sintetasa de óxido nítrico (NOS) y otros factores de transcripción, como AMP cíclico y proteína quinasa A (40, 57, 58).

El sistema monocito/macrófago juega un papel central en la respuesta al LPS al secretar citoquinas importantes, que incluyen $TNF-\alpha$, IL-1, IL-6, IL-8/factor quimiotáctico de neutrófilos y factor estimulante de colonias-granulocito/macrófago (GM-CSF). Los resultados de algunos estudios celulares y moleculares muestran un patrón sumamente complejo en la producción y secreción de estas moléculas durante cuadros sépticos (59, 60). Existen indicios que sugieren que la expresión de genes de interleucinas puede ser dividida en dos grupos básicos: un grupo temprano, dependiente de la presencia de LPS, que incluye las citoquinas IL-8, IL-1 β , IL-12 y $TNF-\alpha$, y un grupo tardío y menos dependiente de la presencia de LPS, que incluye IL-1 α , IL-6 y GM-CSF. Los datos sugieren que estas citoquinas son reguladas en forma dinámica y estricta en el macrófago no sólo a nivel genético, sino también a nivel de traducción, procesamiento y

secreción de proteínas. Dicho control colocaría una vez más al macrófago como un regulador central de la respuesta inflamatoria, marcando una diferencia entre la respuesta local y la respuesta sistémica a la estimulación con LPS. El cuadro 2 resume las principales actividades biológicas de las citoquinas producidas durante la respuesta al LPS.

La IL-8/factor quimiotáctico de neutrófilos tiene una función importante como quimioatrayente y activador de neutrófilos. El TNF- α y la IL-1 β han sido ampliamente caracterizados como moléculas intrínsecamente pirogénicas, que además inician la liberación de un número de mediadores locales del endotelio vascular así como de linfocitos (61, 62). La triada inflamatoria compuesta por IL-1, TNF y LPS son potentes estimuladores de las moléculas de adhesión/activación de células endoteliales tales como molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1),

molécula de adhesión leucocitoendotelial (ELAM-1) y molécula de adhesión vascular 1 (VCAM-1). Estas moléculas participan en la adhesión y migración de leucocitos durante procesos inflamatorios. Por su parte, la IL-12, descrita recientemente, posee una potente actividad estimuladora de proliferación de células T y NK, así como de secreción de citoquinas, particularmente interferón-gamma (IFNg) (62).

La secreción del segundo grupo de citoquinas (IL-1 α , IL-6 y GM-CSF) durante una infección bacteriana progresiva podría resultar en efectos locales pero también jugaría un papel clave en la respuesta sistémica a la infección. Esto incluye la producción de proteínas de fase aguda y la activación de la médula ósea (60). Con la presencia de estas citoquinas la respuesta séptica se establece definitivamente, y el proceso deja de ser localizado.

Cuadro 2

Las principales citoquinas y otros mediadores producidos durante la respuesta a endotoxinas.

| Factor ^a | Principal fuente | Efectos biológicos |
|---------------------|---|---|
| IL-1 α/β | macrófagos | inflamación |
| IL-4 | células T, basófilos | inhibición de citoquinas |
| IL-6 | células , macrófagos | inflamación, diferenciación de células B |
| IL-8 | células T, macrófagos | activación de polimorfonucleares |
| IL-10 | células T y B macrófagos | inhibición de citoquinas |
| IL-12 | macrófagos, células B | activación de células T y NK, producción de IFN- γ |
| IL-13 | células T | inhibición de citoquinas |
| IFN- γ | células T, células NK | activación de macrófagos |
| TNF- α | monocitos, macrófagos | citotoxicidad, fiebre, choque |
| TNF- β | células T | citotoxicidad, fiebre, choque |
| TGF- β | células T, macrófagos | inhibe migración de macrófagos, activación de macrófagos |
| GM-CSF | células T | diferenciación de granulocitos y monocitos |
| PGs | macrófagos | potente actividad supresora general |
| LTs | macrófagos | vasodilatación, vasoconstricción, quimiotaxis |
| PAF | leucocitos, plaquetas, células endoteliales | agregación plaquetaria, aumento de permeabilidad vascular, anafilaxia |
| NO | macrófagos, células endoteliales | aumento de capacidad microbicida de macrófagos |

^a IL, interleucina; IFN- γ , interferón-gamma; TNF, factor de necrosis tumoral; TGF-13, factor de crecimiento transformante-beta; MIF, factor inhibidor de la migración; GMCSF, factor estimulador de las colonias granulocito-macrófago; PGs, prostaglandinas; LTs, leucotrienos; PAF, factor activador de plaquetas; NO, óxido nítrico.

Además de inducir la liberación de citoquinas, los macrófagos producen grandes cantidades de metabolitos del ácido araquidónico en respuesta a LPS, IL-1 y TNF (63). Estos mediadores lipídicos del choque séptico incluyen prostaglandinas (PG), leucotrienos (LT), tromboxanos y factor activador de plaquetas (PAF), los cuales son responsables de los efectos vasculares tardíos (de 6 a 12 horas después de establecido el proceso séptico). El ácido araquidónico deriva del metabolismo de fosfolípidos de membrana por la acción de las enzimas fosfolipasa A₂ y C (64).

La prostaglandina E₂ (PGE₂) es un potente mediador inmunosupresor para células maduras y suprime una amplia variedad de funciones, como proliferación de linfocitos, citotoxicidad mediada por linfocitos T y células NK ("asesinas naturales"), locomoción leucocitaria e interacciones célula-célula (incluyendo agregación plaquetaria). Si bien es cierto que PGE₂ inhibe la liberación de otros mediadores inflamatorios e interleucinas, también aumenta las propiedades quimiotácticas y vasoactivas de otros mediadores locales. Como resultado de estas activida-

des complejas, es posible que las PG puedan regular el balance de eventos inflamatorios y no inflamatorios. Los leucotrienos están involucrados con efectos vasodilatadores y vasoconstrictores, así como quimiotaxis de muchos tipos celulares, incluyendo neutrófilos (62). El PAF es producido por una gran variedad de células, incluyendo neutrófilos, basófilos, fagocitos mononucleares, plaquetas y células endoteliales. Posee diversas actividades biológicas, tales como agregación y secreción plaquetaria, degranulación de neutrófilos, contracción de músculo liso, aumento en la permeabilidad vascular, hipotensión y muerte. El PAF representa pues uno de los más poderosos mediadores descritos que juegan un papel clave en el choque anafiláctico y podrían ser importantes en el choque endotóxico (2).

El interferón gamma (IFN- γ) es una citoquina activadora de macrófagos producida principalmente por linfocitos T y por otros leucocitos ante diferentes estímulos, entre ellos, el LPS (2). Esta citoquina estimula una cantidad impresionante de respuestas del hospedero, que incluyen aumento del metabolismo oxidativo de macrófagos y estimulación de la actividad fagocítica de macrófagos al inducir la expresión de receptores Fc (62).

Otros productos derivados de la interacción con LPS son los intermediarios reactivos de nitrógeno, siendo el óxido nítrico (NO) el más importante. El NO se produce en macrófagos activados por la conversión de L-arginina y O_2 molecular a L-citrulina y NO. Este proceso es catalizado por la enzima sintetasa de óxido nítrico (NOS), la cual puede estar presente en macrófagos activados así como en hepatocitos, fibroblastos, y células endoteliales, como una isoforma inducible que

aumenta sus niveles intracelulares después de la activación con LPS o citoquinas inducidas por LPS (65). Dentro de las citoquinas estimuladoras de NOS están IL-1, IFN- γ , TNF- α , y factor inhibidor de la migración leucocitaria (MIF), mientras que las inhibitorias incluyen IL-4, IL-10, IL-13 y factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) (66). Los intermediarios reactivos de nitrógeno aumentan la eficacia de los mecanismos microbicidas de los macrófagos contra bacterias intra y extracelulares.

La complejidad de las respuestas biológicas a la endotoxina bacteriana está reflejada en el amplio espectro de mediadores producidos por el contacto con LPS y la subsecuente transducción de señales y activación de genes de respuesta local y sistémica. La activación simultánea de sistemas complejos como la coagulación y el complemento, así como de otras sustancias vasoactivas endógenas (endorfinas, catecolaminas y corticoides adrenales, por ejemplo) conduce a las manifestaciones severas del choque séptico, a saber, fiebre o hipotermia, hipotensión, hipoperfusión a órganos vitales y coagulación intravascular diseminada.

IMPLICACIONES PARA LA TERAPIA DEL CHOQUE SEPTICO

El tratamiento clásico de los pacientes sépticos involucra principalmente la terapia agresiva con antibióticos sistémicos, el manejo adecuado de fluidos y electrolitos, y el controversial uso de corticosteroides (67).

La inmunoterapia en el tratamiento de infecciones, iniciada hace más de 100 años pero descontinuada después

del inicio de la era antibiótica, ha resurgido tras los problemas en el impacto tan variable que muestra la terapia antibiótica en la disminución de la mortalidad causada por el choque séptico. Las cadenas de polisacárido O del LPS son altamente inmunogénicas, pero los anticuerpos producidos con fines terapéuticos son específicos para un serotipo particular y su utilidad clínica es limitada. Una alternativa ha sido la producción de anticuerpos específicos para el núcleo y lípido A, con el objetivo de lograr protección cruzada contra el componente tóxico presente en todas las bacterias Gram-negativas (68).

El antisuero humano contra la cepa mutante J5 de *E. coli* O:111:B4 se ha usado en ensayos clínicos con pacientes sépticos y ha reducido hasta en un 50% la mortalidad (61). En los últimos años, dos anticuerpos monoclonales anti-lípido A han recibido particular atención. El primero de ellos, E5, es un anticuerpo monoclonal de ratón dirigido contra lípido A, el cual ha mostrado una eficiencia relativamente buena para prolongar la sobrevivencia de pacientes con choque séptico. El segundo grupo de ensayos clínicos se ha realizado con el anticuerpo monoclonal humano, HA1A, el cual ha reducido la mortalidad hasta en un 42% de los pacientes sépticos tratados (68). Los resultados globales indican que este tipo de inmunoterapia es segura y mejora la sobrevivencia en pacientes con sepsis por Gram-negativos. Sin embargo, todavía existen dudas sobre su efectividad, lo que hace necesario más investigación clínica en este campo.

Debido a la gran cantidad de factores celulares y humorales involucrados en la sepsis y choque séptico, es evidente que el bloqueo de un solo mediador, aunque tenga algún efecto beneficioso, probablemente no será suficiente para

alterar la morbilidad y mortalidad de este cuadro clínico. Por ejemplo, la inhibición directa de LPS con anticuerpos podría no ser suficiente para eliminar los efectos endotóxicos de otros componentes con actividad de endotoxina, por ejemplo, fragmentos de peptidoglicán, proteínas y lípidos complejos de membrana externa.

La dilucidación de los eventos fisiopatológicos en los que participan citoquinas clave, como TNF e IL-1, ha promovido el desarrollo de estrategias para contrarrestar la producción o liberación excesiva de estos mediadores, y por consiguiente, para prevenir y tratar el choque séptico. Algunas consideraciones en el diseño de estas estrategias terapéuticas han sido la rápida desaparición de estas citoquinas en la circulación, las variaciones individuales en los niveles sanguíneos, los cuales no siempre correlacionan con la severidad del cuadro clínico, y la extrema importancia de estas citoquinas como mediadores de la resistencia natural contra una gran variedad de microorganismos. Dos estudios clínicos sobre el bloqueo de citoquinas están siendo realizados, uno con anticuerpos monoclonales contra TNF y el segundo con el antagonista del receptor de IL-1 (IL-1ra). De acuerdo con algunos autores, los estudios sugieren que, si bien la terapia podría ser útil en los pacientes más severamente afectados, es potencialmente perjudicial para pacientes con cuadros leves a moderados, debido principalmente a la disminución en las concentraciones fisiológicas de estas citoquinas (68).

Una gran variedad de mediadores celulares y humorales está siendo evaluada a nivel experimental por su papel en la patogénesis del choque séptico y su posible uso en terapéutica. Estos incluyen otras citoquinas (IL-8, IL

10), proteínas de fase aguda, factores de complemento y de coagulación y moléculas de adhesión. Recientemente, la IL-10 ha surgido como un candidato para el tratamiento del choque séptico, debido a su potente actividad supresora de la producción de IL-1, IL-6 y TNF (69).

CONCLUSION

La sepsis por Gram-negativos sigue siendo una causa significativa de morbilidad y mortalidad a pesar de la continua aparición de nuevos antibióticos. Esto ilustra la complejidad de los mecanismos patogénicos que participan en la respuesta inflamatoria sistémica, muchos de los cuales aún no se han dilucidado. Toda información novedosa acerca de estos mecanismos ayudará a identificar los grupos de pacientes que se podrían beneficiar de la inmunoterapia con anticuerpos antiendotoxina o citoquinas, en conjunto con el tratamiento clásico de este cuadro clínico.

Los estudios de la actividad de las endotoxinas en modelos animales y sistemas celulares definidos son de gran ayuda en el entendimiento de los mecanismos por los cuales las bacterias Gram-negativas causan enfermedad. En los próximos años, con la interacción creciente de investigaciones básicas y clínicas, se generarán conocimientos que podrán ser traducidos en nuevas y más eficientes estrategias terapéuticas, lo cual contribuirá a la reducción de la mortalidad por sepsis.

REFERENCIAS

1. Rietschel ET, Brade H. Bacterial Endotoxins. *Sci. Am.* 1992; 267:26-33.
2. Morrison DC, Ryan JL. Endotoxins and disease mechanisms. *Ann. Rev. Med.* 1987; 38:417-432.
3. Rietschel ET, Kirikae T, Schade FU, Mamat U, Schmidt G, Loppnow H, Ulmer AJ, Zähringer U, Seydel U, Di Padova F, Schreier M, Brade H. Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure and function. *FASEB J.* 1994; 8:217-225.
4. Moreno E, Kurtz RS, Berman DT. Induction of immune and adjuvant immunoglobulin G responses in mice by *Brucella* lipopolysaccharide. *Infect. Immun.* 1984; 46:74-80.
5. Rojas N, Freer E, Weintraub A, Ramírez M, Lind S, Moreno E. Immunochemical identification of *Brucella abortus* lipopolysaccharide epitopes. *Clin. Diag. Lab. Immunol.* 1994; 1:206-213.
6. Tesh VL, Vukajlovich SW, Morrison DC. Endotoxin interactions with serum proteins: relationship to biological activity. En: *Bacterial endotoxins: Pathophysiological effects, clinical significance, and pharmacological control.* Alan R. Liss, Inc. 1988; p.47-62.
7. Lebbar S, Cavaillon JM, Caroff M. Molecular requirements for interleukin 1 induction by lipopolysaccharide-stimulated human monocytes: involvement of the heptosyl - 2 - keto - 3 - deoxyoctulosonate region. *Eur. J. Immunol.* 1986; 16:87-91.

8. Haeffner-Cavaillon N, Cavaillon JM, Szabo L. Cellular receptors for endotoxin. En: *Handbook of endotoxin, cellular biology of endotoxin*. LJ Berry (Ed.) Amsterdam: Elsevier North Holland. 1985; 3:1-24.
9. DiPiro JT. Pathophysiology and treatment of gram-negative sepsis. *Am. J. Hosp. Pharmacy* 1990; 47(Suppl. 3):S6-S10.
10. Davis B. Bacterial Architecture. En: *Microbiology*, 4th ed. Davis B Dulbecco R Eisen H. Ginsberg H. (Eds.). Philadelphia: JB Lippincott Co. 1990; p. 21- 50.
11. Alving CR. Lipopolysaccharide, lipid A, and liposomes containing lipid A as immunologic adjuvants. *Immunobiology*. 1993; 187:430-446.
12. Raetz CRH. Biochemistry of endotoxins. *Ann. Rev. Biochem.* 1990; 59:129-170.
13. Rojas N. El lipopolisacárido bacteriano: una potente endotoxina con múltiples actividades biológicas. Recientes avances en estructura, genética y bioquímica. *Rev. Cost. Cienc. Med.* 1995; 16:71-84.
14. Kastowski M, Gutberlet T, Bradaczek H. Molecular modeling of the three-dimensional structure and conformational flexibility of bacterial lipopolysaccharide. *J. Bacteriol.* 1992; 174:4798-4806.
15. Galanos C, Lüderitz O, Rietschel ET, Westphal O, Brade H, Brade L, Freudenberg M, Schade U, Imoto M, Yoshimura H, Kusumoto S, Shiba T. Synthetic and natural *Escherichia coli* free lipid A express identical endotoxic activities. *Eur. J. Biochem.* 1985; 148:1- 5.
16. Larsen NE, Enelow RI, Simons ER, Sullivan R. Effect of bacterial endotoxin on the transmembrane potential and plasma membrane fluidity of human monocytes. *Biochim. Biophys. Acta.* 1985; 815:1-8.
17. Cavaillon JM, Fitting C, Hauttecoeur B, Haeffner-Cavaillon N. Inhibition by gangliosides of the specific binding of lipopolysaccharide (LPS) to human monocytes prevents LPS-induced interleukin-1 production. *Cell. Immunol.* 1987; 106:293-303.
18. Coleman DL, Morrison DC, Ryan JL. Gangliosides block the inhibition of macrophage Fc-dependent phagocytosis by lipopolysaccharide. *Cell. Immunol* 1986; 100:288-299.
19. Hampton RY, Golenbock DT, Penman M, Krieger M, Raetz CRH. Recognition and plasma clearance of endotoxin by scavenger receptors. *Nature.* 1991; 352:342.
20. Wright SD, Jong T. Adhesion-promoting receptor on human macrophages recognize *Escherichia coli* by binding to lipopolysaccharide. *J. Exp. Med.* 1986; 164:1876.
21. Wollenweber HW, Morrison DC. Synthesis and biochemical characterization of a photoactivatable, iodinated, cleavable bacterial lipopolysaccharide derivative. *J. Biol. Chem.* 1985; 260:15068-15074.
22. Lei M-G, Morrison DC. Specific endotoxic lipopolysaccharide-binding proteins on murine splenocytes. I. Detec-

tion of lipopolysaccharide-binding sites on splenocytes and splenocyte subpopulations. *J. Immunol.* 1988; 141:996-1005.

23. Lei M-G, Morrison DC. Specific endotoxic lipopolysaccharide-binding proteins on murine splenocytes. II. Membrane localization and binding characteristics. *J. Immunol.* 1988; 141:1006-1011.

24. Lei M-G, Stimpson S, Morrison DC. Specific endotoxic lipopolysaccharide-binding proteins on murine splenocytes. III. Binding specificity and characterization. *J. Immunol.* 1991; 147:1925-1932.

25. Roeder DJ, Lei M-G, Morrison DC. Endotoxic-lipopolysaccharide-specific binding proteins on lymphoid cells of various animal species: association with endotoxin susceptibility. *Infect. Immun.* 1989; 57:1054-1058.

26. Halling JL, Hamill DR, Lei M-G, Morrison DC. Identification and characterization of LPS binding proteins on human peripheral blood cell subpopulations. *Infect. Immun.* 1992. 60:845-852.

27. Lei M-G, Morrison DC. Lipopolysaccharide interaction with S2 subunit of pertussis toxin. *J. Biol. Chem.* 1993; 268:1488-1493.

28. Lei M-G, Morrison DC. Evidence that lipopolysaccharide and pertussis toxin bind to different domains on the same p73 receptor on murine splenocytes. *Infect. Immun.* 1993; 61:1359-1364.

29. Tobias PS, Soldau K, Ulevitch RJ. Isolation of a lipopolysaccharide-binding acute phase reactant from rabbit serum.

J. Exp. Med. 1986; 164:777-793.

30. Tobias PS, Mathison JC, Ulevitch RJ. A family of lipopolysaccharide binding proteins involved in responses to gram-negative sepsis. *J. Biol. Chem.* 1988; 263:13479-13481.

31. Gallay P, Carrel S, Glauser MP, Barras C, Ulevitch RJ, Tobias PS, Baumgartner J-D, Heumann D. Purification and characterization of murine lipopolysaccharide-binding protein. *Infect. Immun.* 1993; 61:378-383.

32. Schumann RR, Leong SR, Flaggs GW, Gray PW, Wright SD, Mathison JC, Tobias PS, Ulevitch RJ. Structure and function of lipopolysaccharide binding protein. *Science.* 1990; 249:1429-1431.

33. Mathison JC, Tobias PS, Wolfson E, Ulevitch RJ. Plasma lipopolysaccharide (LPS)-binding protein: a key component in macrophage recognition of Gramnegative LPS. *J. Immunol.* 1992; 149:200-206.

34. Ooi CE, Weiss J, Elsbach P, Frangione B, Mannion B. A 25-kDa NH₂-terminal fragment carries all the antibacterial activities of the human neutrophil 60-kDa bactericidal/permeability increasing protein. *J. Biol. Chem.* 1987; 262:14891-14894.

35. Aviram M, Rosenblat M. Macrophage-mediated oxidation of extracellular low density lipoprotein requires an initial binding of the lipoprotein to its receptor. *J. Lipid Res.* 1994; 35:385-98.

36. Wright SD, Tobias PS, Ulevitch RJ, Ramos RA. Lipopolysaccharide (LPS) binding protein opsonizes LPS-bearing

particles for recognition of a novel receptor on macrophages. *J. Exp. Med.* 1989; 70:1231 - 1241.

37. Wright SD, Ramos RA, Tobias PS, Ulevitch RJ, Mathison JC. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science* 1990; 249:1431 -1433.

38. Ziegler-Heitbrock HWL, Ulevitch RJ. CD14: cell surface receptor and differentiation marker. *Immunol Today* 1993; 14:121 -125.

39. Bazil V, Baudys M, Hilgert I, Stefanova I, Low MG, Zbrozek J, Horejsi V. Structural relationship between the soluble and membrane-bound forms of human monocyte surface glycoprotein CD14. *Mol. Immunol.* 1989; 26:657-662.

40. Raetz CRH, Ulevitch RJ, Wright SD, Sibley CH, Ding A, Nathan CF. Gram-negative endotoxin: an extraordinary lipid with profound effects on eukaryotic signal transduction. *FASEB J.* 1991; 5:2652-2660.

41. Rietschel ET, Seydel U, Zähringer U, Schade UF, Brade L, Loppnow H, Feist W, Wang M-H, Ulmer AJ, Flad HD, Brandenburg K, Kirikae T, Grimmecke D, Holst O, Brade H. Bacterial endotoxin: molecular relationships between structure and activity. *Infect. Dis. Clin. North Am.* 1991; 5:753-779.

42. Morrison DC. Endotoxin receptors on mammalian cells. *Immunobiol.* 1993; 187:212-226.

43. Lee J-D, Kato K, Tobias PS, Kirkland TN, Ulevitch RJ. Transfection of CD14 into 70Z/3 dramatically enhances the

sensitivity to complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *J. Exp. Med.* 1992; 175:1697-1705.

44. Launer RP, Geha RS, Vercelli D. Engagement of the monocyte surface antigen CD14 induces lymphocyte function-associated antigen-1/intercellular adhesion molecule-1-dependent homotypic adhesion. *J. Immunol.* 1990; 145:1390-1394

45. Ulevitch RJ, Tobias PS. Recognition of endotoxin by cells leading to transmembrane signaling. *Curr. Opin. Immunol.* 1994; 6:125-130.

46. Rosen A, Nairn AC, Greengard P, Cohn ZA, Aderem A. Bacterial lipopolysaccharide regulates the phosphorylation of the 68 K protein kinase C substrate in macrophages. *J. Biol. Chem.* 1989; 264:9118-9121.

47. Weinstein SL, Gold MR, DeFranco AL. Bacterial lipopolysaccharide stimulates protein tyrosine phosphorylation in macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1991; 88:4148-4152.

48. Dearden-Badet MT, Revillard JP. Requirement for tyrosine phosphorylation in lipopolysaccharide-induced murine B-cell proliferation. *Immunology* 1993; 80:658-660.

49. Novogrodsky A, Vanichkin A, Patya M, Gazit A, Oshero N, Levitzky A. Prevention of lipopolysaccharide-induced lethal toxicity by tyrosine kinase inhibitors. *Science.* 1994; 264:1319-1322.

50. Tschaikowsky K. Protein kinase C inhibitors suppress LPS-induced TNF production in alveolar macrophages and

in whole blood: the role of encapsulation into liposomes. *Biochim. Biophys. Acta.* 1994; 1222: 113-121.

51. Ternisien C, Ramani M, Ollivier V, Khechai F, Vu T, Hakim J, deProst D. Endotoxin-induced tissue factor in human monocytes is dependent upon protein kinase C activation. *Thromb. Haemost.* 1993; 70:800-806.

52. Beaty CD, Franklin TL, Uehara Y, Wilson CB. Lipopolysaccharide-induced cytokine production in human monocytes: role of tyrosine phosphorylation in transmembrane signal transduction. *Eur. J. Immunol.* 1994; 24:1278-1284.

53. Prpic V, Weiel JE, Somers SD, DiGuseppi J, Gonias SL, Pizzo SV, Hamilton TA, Herman B, Adams DO. Effects of bacterial lipopolysaccharide on the hydrolysis of phosphatidylinositol-4,5-biphosphate in murine peritoneal macrophages. *J. Immunol.* 1987; 139:526.

54. Letari O, Nicosia S, Chiavaroli C, Vacher P, Schlegel W. Activation by bacterial lipopolysaccharide causes changes in the cytosolic free calcium concentration in single peritoneal macrophages. *J. Immunol.* 1991; 147:980-983.

55. Natarajan V, Iwamoto GK. Lipopolysaccharide-mediated signal transduction through phospholipase D activation in monocytic cell lines. *Biochim. Biophys. Acta.* 1994; 1213:14-20.

56. Doerfler ME, Weiss J, Clark JD, Elsbach P. Bacterial lipopolysaccharide primes human neutrophils for enhanced release of arachidonic acid and causes phosphorylation of an 85-kD cytosolic

Phospholipase A₂. *J. Clin. Invest* 1994; 93:1583-1591.

57. Ziegler-Heitbrock HW, Wedel A, Schraut W, Strobel M, Wendelgass P, Sternsdorf T, Bauerle PA, Haas JG, Riethmuller G. Tolerance to lipopolysaccharide involves mobilization of nuclear factor kappa B with predominance of p50 homodimers. *J. Biol. Chem.* 1994; 269:17001-17004.

58. Cheng Q, Cant CA, Moll T, Hofer-Warbinek R, Wagner E, Birnstiel ML, Bach FH, de Martin R. NF- κ B subunitspecific regulation of the I- κ B promoter. *J. Biol. Chem.* 1994; 269:13551-13557.

59. Ertel W, Morrison MH, Wang P, BaZF, Ayala A, Chaudry I. H. The complex pattern of cytokines in sepsis. *Ann. Surg.* 1991; 214:141-147.

60. Zhong WW, Burke PA, Hand AT, Walsh MJ, Hughes LA, Forse RA. Regulation of cytokine mRNA expression in lipopolysaccharide-stimulated human macrophages. *Arch. Surg.* 1993; 128:158-164.

61. Bone RC. Gram-negative sepsis: a dilemma of modern medicine. *Clin. Microbiol. Rev.* 1993; 6:57-68.

62. Austyn JM, Wood KJ. Inflammatory mediators and soluble effector mechanisms. En: *Principles of Cellular and Molecular Immunology*. JM Austyn, KJ Wood (eds.) Oxford: Oxford University Press. 1993; p. 501 - 579

63. Haranaka K, Satomi N, Sakurai A, Imura F, Haranaka R. Influence of TNF and/or LPS on the arachidonic cascade. En: *Tumor necrosis factor: structure mechanism of action role in disease and*

therapy. B Bonavida y G Granger (eds.). Basel: S Karger. 1990; p. 203-212.

64. Pruzanski W, Vadas P. Phospholipase A2 - a mediator between proximal and distal effectors in inflammation. *Immunol. Today* 1991; 12:143-146.

65. Weisz A, Oguchi S, Cicatiello L, Esumi H. Dual mechanism for the control of inducible-type NO synthase gene expression in macrophages during activation by interferon-gamma and bacterial lipopolysaccharide. Transcriptional and post-transcriptional regulation. *J. Biol. Chem.* 1994; 269:8324-8333.

66. Liew FY. The role of nitric oxide in parasitic diseases. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 1993; 87:637-642.

67. Young LS. Gram-negative sepsis. En: *Principles and practice of infectious diseases*, 3rd. ed. GL Mandell, RG Douglas, JE Bennett (eds.). New York; Churchill Livingstone. 1990; p. 611-636

68. Glauser MP, Heumann D, Baumgartner JD, Cohen J. Pathogenesis and potential strategies for prevention and treatment of septic shock: an update. *Clin. Infect. Dis.* 1994; 18(Suppl 2):S205-S216.

69. Howard M, Muchamuel T, Andrade S, Menon S. Interleukin 10 protects mice from lethal endotoxemia. *J. Exp. Med.* 1993; 167:471-475.