

EL LIPOPOLISACARIDO BACTERIANO: UNA POTENTE ENDOTOXINA CON MULTIPLES ACTIVIDADES BIOLOGICAS

RECIENTES AVANCES EN ESTRUCTURA,
GENÉTICA Y BIOQUIMICA

Norman Rojas Campos*

RESUMEN

Los lipopolisacáridos (LPS) constituyen el antígeno O y la endotoxina de las bacterias Gram-negativas. Están localizados en la membrana externa de la envoltura celular bacteriana y juegan un papel muy importante en la patogénesis de las infecciones bacterianas, así como en la interacción con el hospedero y su sistema de defensa. Básicamente el LPS se compone de una porción lipídica muy conservada entre las especies, denominada lípido A, inmersa en la cara externa de la membrana externa de la bacteria, y una porción hidrofílica compuesta por azúcares que presenta una gran variabilidad estructural. El lípido A es responsable de las propiedades patofisiológicas de las endotoxinas. El polisacárido O, que es la porción mas externa, le confiere a la bacteria su especificidad serológica. El oligosacárido nuclear o core une el polisacárido O al lípido A. En general, los genes responsables de la síntesis del LPS están organizados ya sea en grupos de genes contiguos como en la síntesis del núcleo y el polisacárido O, o bien, dispersos alrededor del

cromosoma bacteriano como en el caso del lípido A. La mayoría de los pasos de la vía biosintética del LPS han sido elucidados al menos en las enterobacterias. Tanto las interacciones moleculares de enzimas y sustratos durante la síntesis como el transporte del LPS hasta la membrana externa bacteriana son aspectos de constante investigación hoy en día, debido a las implicaciones en la biología de estos microorganismos y en el potencial uso farmacológico de análogos o antagonistas de LPS en la terapéutica del choque endotóxico. Esta revisión pretende actualizar los aspectos relevantes de la estructura, bioquímica y genética de esta importante molécula bacteriana. (*Rev. Cost. Cienc. Méd.* 1995; 16-3: 71-84)

INTRODUCCION

Los lipopolisacáridos (endotoxinas, LPS) de las bacterias Gram-negativas son los principales constituyentes de la membrana externa de estos microorganismos. Estas moléculas han sido aisladas de una gran variedad de bacterias Gram-negativas y algunas cianobacterias, y sus características estructurales y biológicas están siendo extensamente estudiadas. Sin embargo, la mayoría del conocimiento actual acerca de la biosíntesis y relaciones estructura-función de los lipopolisacáridos ha sido obtenido principalmente de estudios con

* Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica.
Fax: 225-2374. Tel.: 207-4275
Correo electrónico normanr@cariari.ucr.ac.cr

Salmonella typhimurium y *Escherichia coli*. La gran relevancia de estas moléculas en las infecciones bacterianas, particularmente en el choque séptico, actualmente constituye un objetivo importante desde el punto de vista farmacológico y terapéutico.

El estudio de la estructura de este polisacárido complejo tuvo mucho auge desde la década de los años 50, llevando a la elucidación de la estructura del LPS de *S. typhimurim* en los años 70. Una gran cantidad de cepas mutantes han contribuido a estas investigaciones como piezas de un complicado rompecabezas, las cuales han suministrado estructuras intermediarias en la biosíntesis cuyas propiedades bioquímicas e inmunoquímicas han podido ser utilizadas para deducir estas vías metabólicas. Asimismo, los estudios genéticos que han acompañado a la caracterización bioquímica de los mutantes han generado una enorme cantidad de información acerca de los genes involucrados (1). En esta revisión se pretende actualizar los aspectos básicos de la arquitectura y bioquímica de los lipopolisacáridos con el propósito de comprender su relación con los efectos biológicos de estas moléculas en animales y seres humanos.

ARQUITECTURA GENERAL DE LOS LIPOPOLISACARIDOS

A pesar de que existe una inmensa diversidad estructural en los lipopolisacáridos de bacterias Gramnegativas, hay elementos arquitectónicos que son compartidos por las distintas especies bacterianas. El lipopolisacárido típico de *S. Typhimurium* consiste en un

heteropolisacárido fosforilado que está covalentemente unido a un lípido de la membrana externa que contiene glucosamina, el lípido A. La porción de polisacárido que protruye de la membrana externa ha sido dividida en dos regiones principales: una región interna o central (núcleo o core) y una porción externa denominada cadena O (antígeno O ó polisacárido O). La región del núcleo ha sido a su vez subdividida en una región interna y una región externa. La cadena O constituye la porción inmunodominante de la molécula, y los determinantes estructurales de esta región proveen la base de la clasificación serológica de la familia Enterobacteriaceae (2). La Fig. 1 muestra la representación esquemática de una molécula de LPS de *S. typhimurium*.

El LPS es a menudo llamado endotoxina. Este término fue introducido en el siglo XIX para describir el componente bacteriano responsable de los fenómenos patofisiológicos asociados con las infecciones por Gramnegativos (3, 4). El lípido A posee la actividad endotóxica del LPS, como ha sido demostrado usando lípido A obtenido sintéticamente (5). Dentro de las actividades biológicas mas relevantes están la potente activación de macrófagos y la producción de gran cantidad de citoquinas y otros mediadores con múltiples efectos en diferentes órganos (3).

Las cepas tipo silvestre de las especies de *Salmonella*, *E. coli* y otras bacterias Gramnegativas capaces de sintetizar moléculas de lipopolisacárido completas se denominan cepas lisas, por su morfología colonial. Estos organismos reaccionan con anticuerpos específicos contra sus cadenas O, y usualmente

forman colonias de apariencia lisa cuando crecen en medios sólidos. En contraste, las cepas incapaces de sintetizar polisacárido O son llamadas "rugosas", dado que en la mayoría de los casos exhiben una morfología colonial rugosa. Los mutantes rugosos (R) de enterobacterias se originan por mutaciones que afectan cualesquiera de los diferentes pasos en la biosíntesis de la cadena O o del núcleo (6).

La estructura mínima de lipopolisacárido necesaria para el crecimiento de *E. coli* y otras bacterias Gram-negativas consiste de lípido A y dos unidades de ácido 3-desoxi manooctulosónico (Kdo). Este motivo es sumamente conservado entre los distintos grupos bacterianos, y todas las porciones de la molécula distales a los residuos de Kdo no son estrictamente esenciales para el crecimiento y función celulares. Asimismo, la estructura mínima de LPS es activa como endotoxina (7). No obstante, las cepas mutantes que contienen la estructura mínima de LPS son hipersensibles a antibióticos hidrofóbicos, detergentes y algunos colorantes (8), de lo cual se sugiere que el poseer la estructura completa de LPS le da ventajas evolutivas a la bacteria al ser más resistente a las condiciones ambientales.

BIOQUIMICA DE LOS LIPOPOLISACARIDOS

1. ESTRUCTURA

Lípido A. La estructura química detallada del lípido A de enterobacterias y algunas especies no enterobacterianas ha sido elucidada recientemente (6). En la fig. 1 se muestra la estructura del lípido A de

S. typhimurium. El lípido A de *E. coli* y *S. typhimurium* está constituido por un disacárido de glucosamina unido por un enlace β 1-6, esterificado en cuatro posiciones con ácidos grasos y sustituido por dos grupos fosfato en los extremos 1 y 4'. El lípido A tiene un peso molecular aproximado de 1700, y se encuentran cerca de 2×10^6 de residuos en la membrana externa de *E. coli* (6). La unión del lípido A al primer residuo de Kdo en el LPS esta dada por un enlace ax2-6' (9).

El esqueleto de diglucosamina está acilado en las posiciones 2 y 2' con ácidos grasos 3-hidroxiados (3-OH-14:0 o ácido 3-hidroxi mirístico) mediante un enlace tipo amida. En las posiciones 3 y 3' la acilación es tipo éster con el mismo tipo de ácidos grasos. En *E. coli*, los grupos hidroxilo de los ácidos grasos de las posiciones 2 y 2' están a su vez esterificados con ácido láurico (12:0) y mirístico (6). La estructura tridimensional del lípido A no ha sido completamente esclarecida, pero las evidencias sugieren un arreglo en dominios polares y no polares bien definido, compatible con la inserción en la membrana. Bajo ciertas condiciones, el lípido A asume una conformación hexagonal, altamente densa y ordenada, en la cual el disacárido de GlcN protruye en un ángulo aproximado de 45° con respecto a la superficie de la membrana (10). Dicha conformación se conserva en el LPS de tipo rugoso, especialmente cuando hay presencia de cationes divalentes (Mg^{++} y Ca^{++}). Es muy probable que en las membranas biológicas existan interacciones particulares entre moléculas de lípido A, así como entre lípido A y proteínas, las cuales jugarían un papel importante

en el ensamblaje de la membrana externa. Lipopolisacáridos no tóxicos o de baja toxicidad están ampliamente distribuidos entre las bacterias distantes filogenéticamente de las entero-bacterias, como lo son bacterias fototróficas (*Rhodospseudomonas* sp.), bacterias nodulantes (*Bradyrhizobium* sp.), bacterias del suelo (*Thiobacillus* sp.), y algunos patógenos importantes (*Brucella* sp.). Todas estas especies muestran diferencias estructurales en su lípido A, comparados con el lípido A de enterobacterias, las cuales están localizadas en el esqueleto de azúcar o en el espectro de ácidos grasos (11). Dentro de las principales diferencias estructurales se encuentran la ausencia del grupo fosfato unido al esqueleto de diglucosamina y sustitución por 4 aminoarabinosa (12); la presencia de 2,3-diaminoglucosa (GlcN3N) como en *Rhodospseudomonas viridis*, o bien, el llamado lípido A "mixto", que contiene glucosamina y 2,3-diaminoglucosa (10); y, finalmente, presencia de una amplia gama de ácidos grasos de diferente longitud (13).

Núcleo o Core. El oligosacárido nuclear puede ser subdividido en un subdominio interno y uno externo. Los componentes del núcleo interno en *Salmonella* y *E. coli* incluyen ciertos azúcares únicos que son característicos del LPS, tales como el ácido 3-desoxi-D-manoctulosónico (Kdo) y L-glicero-D-manoheptosa (Hep) (6).

El núcleo externo esta compuesto por hexosas, principalmente glucosa, galactosa y N-acetilglucosamina. La diversidad estructural de la región externa esta prácticamente limitada a los lipopolisacáridos de enterobacterias,

en las cuales se encuentran de uno (*Salmonella*) a cinco (*E. coli*) tipos diferentes de núcleo (14). En especies no entéricas, el núcleo externo puede estar también presente, pero a menudo esta completamente ausente (15).

La región nuclear interna presenta una variabilidad mucho menor, al menos en enterobacterias. La mayoría de estas bacterias contienen dos residuos de Kdo y dos unidades de heptosa, y la presencia de sustituyentes tales como pirofosforiletanolamina le confiere heterogeneidad al núcleo interno. En *H. influenzae*, el Kdo mas interno puede estar fosforilado, mientras que en *Acinetobacter calcoaceticus*, un isómero del ácido octulosónico parecido al Kdo está unido al lípido A (7).

Al menos un residuo de Kdo, o un derivado, está presente en todos los lipopolisacáridos conocidos, lo cual indica un papel esencial de este azúcar en la supervivencia y crecimiento de bacterias, particularmente a nivel del ensamblaje de la membrana externa (7).

Cadena 0. Los estudios realizados en lipopolisacáridos de enterobacterias han suministrado una serie de características que sirven para diferenciar la cadena 0 de otras partes de la molécula. En este grupo bacteriano las cadenas específicas unidas al núcleo consisten en una secuencia repetida de unidades de trisacárido o pentasacárido lineal, o bien pueden ser polímeros de oligosacáridos ramificados de cuatro a seis azúcares. La longitud de las cadenas 0 difiere aun en un mismo organismo, en un ámbito que varía desde 0 hasta 40 unidades repetitivas (16). Los monosacáridos que componen las unidades repetitivas son azúcares

neutros y acídicos, amino azúcares, y raras veces azúcares inusuales, tales como 6-desoxihexosas ó 3,6-didesoxihexosas. De acuerdo con cálculos en modelos moleculares, la orientación espacial del polisacárido O no asume una conformación ordenada y lineal, sino mas bien enrollada (16), o doblada en un ángulo variable (17). En bacterias no entéricas, como por ejemplo bacterias fotosintéticas, bacterias del suelo, o en patógenos tales como *Neisseria*, *Pasteurella*, *Campylobacter*, *Bordetella* y *Bacteroides*, el polisacárido O esta totalmente ausente (14). En *Brucella* la cadena O es un homopolímero de un solo amino azúcar llamado perosamina (18).

A pesar de que la gran diversidad inmunológica presente en el polisacárido O sugiere grandes diferencias estructurales, pequeños cambios pueden ser detectados serológicamente. Así pues, aun cuando la estructura química de la unidad repetitiva de *Salmonella typhimurium* (grupo B) es muy similar a la de *S. typhi* (grupo D), son inmunológicamente diferentes (6). En otros géneros y familias bacterianos, la presencia de azúcares metilados, acetilados o con otros grupos sustituyentes y amino azúcares juegan el papel de estructuras "inmunodominantes" (12). Ejemplos de componentes estructurales del polisacárido O en varias especies bacterianas se muestran en el Cuadro 1.

La diversidad estructural de la cadena O puede ser aumentada por el proceso de conversión por bacteriófagos. Este proceso involucra la lisogenización de una cepa hospedera por un bacteriófago temperado capaz de dirigir alteraciones

estructurales específicas en las unidades repetitivas (6). Algunos autores sugieren que la diversidad en estructura y composición de la cadena O pudo haberse desarrollado durante la evolución, al menos en especies endosimbióticas, con el fin de escapar al sistema inmune del hospedero mediante la presentación de nuevas especificidades en la superficie celular y así esconder las unidades mas profundas, esto es, lípido A-núcleo interno, los cuales son esenciales para el crecimiento y multiplicación bacterianos. De esta manera, la cadena O protegería a las bacterias contra la fagocitosis y contra la acción bactericida del suero (14).

2. BIOSÍNTESIS

Lípido A El primer paso de la biosíntesis del lipopolisacárido en *E. coli* es la acilación de una molécula de N-acetilglucosamina activada con difosfato de uridina (UDP-GlcNAc) con una molécula de ácido β -hidroximirístico (14 carbonos). Tanto el UDP-GlcNAc como el complejo β -hidroximiristoil-proteína acarreadora de acilo se encuentran en bifurcaciones metabólicas clave para la bacteria, como lo son, además de la biosíntesis del lípido A y el núcleo interno, la síntesis de peptidoglicán y de glicerofosfolípidos, respectivamente (7, 19). La posterior acilación del monosacárido da como resultado una molécula precursora llamada lípido X, mono-sacárido fosforilado y acilado en las posiciones 2 y 3 con ácido β -hidroximirístico. La reacción del lípido X con un derivado activado del lípido X (UDP-2,3 diacil-GlcN) produce un precursor disacárido con cuatro grupos acilo, el lípido IV_A (20). El lípido IV_A es

sustituido con dos unidades de Kdo para formar Kdo₂-IV_A. Finalmente, el Kdo₂IV_A es acilado completamente en forma de grupos aciloxiacil en los ácidos grasos de las posiciones 2¹ y 3¹ del disacárido, transformándose en la endotoxina Re, la especie rugosa más profunda en *E. coli* (7).

La mayoría de las enzimas del ensamblaje del núcleo-lípido A son muy probablemente proteínas periféricas de la membrana. Estas proteínas estarían directamente asociadas con la membrana interna durante la catálisis, dado que los intermediarios clave (lípidos X o lípidos IV_A) están unidos a la membrana citoplasmática. Asimismo, las enzimas deben funcionar en la superficie interna de la membrana, ya que todos los precursores están en el citoplasma (19).

Núcleo o core. Debido a que el aislamiento de mutantes viables con defectos en la región del Kdo ha sido infructuoso, los mecanismos de biosíntesis de esta región están aun incompletos. Precisamente por esta razón es que a la región del Kdo se le asigna un papel esencial en el crecimiento y función normales de la bacteria (6,14).

La síntesis de Kdo se inicia con la condensación de arabinosa-5-fosfato con fosfoenolpiruvato (21). Luego, el Kdo recién sintetizado es activado a Kdo-CMP (monofosfato de citidina), un nucleótido-azúcar que sirve como precursor para el LPS (22). Un sistema enzimático transfiere sucesivamente dos unidades de Kdo al lípido A, formándose así la estructura mínima de LPS, llamada Kdo-lípido IV_A (23). Los residuos de heptosa que son

añadidos al LPS naciente se derivan probablemente de sedoheptulosa-7-fosfato, y son activados como isómeros de configuración L-glicero-D mano (24). Otra serie de enzimas son responsables de la adición de sustituyentes polares, tales como fosfatos y etanolamina (25, 26).

Cada una de las hexosas del núcleo externo es añadida una a una en forma independiente. La síntesis de esta región involucra una serie de glicosiltransferasas unidas a la membrana, las cuales catalizan la transferencia secuencial de azúcares provenientes de donadores nucleótido-azúcar al extremo no reductor (distal) de la cadena de polisacárido creciente (27, 28). Derivados de UDP (difosfato de uridina) funcionan como donadores de azúcares activados.

Cadena O. La cadena O es sintetizada independientemente del lípido A y el núcleo. El polisacárido O es ensamblado como un polímero unido a un lípido de membrana y transferido posteriormente a la glucosa terminal no reductora del núcleo completo. La formación cíclica de las unidades requiere dos moléculas de bactoprenol pirofosfato, un poliisopreno de 55 carbonos que es también esencial para la síntesis del peptidoglicán (6).

El proceso biosintético de la cadena O en *S. typhimurium* puede ser dividido en tres fases. La primera fase comprende la síntesis de una sola unidad repetitiva (tetrasacárido) unido covalentemente al bactoprenol, que funciona como lípido acarreador. Durante la segunda fase las unidades repetitivas individuales son polimerizadas hasta formar la cadena O completa todavía unida al bactoprenol.

Finalmente, el último paso consiste en la transferencia del polímero recién sintetizado desde el lípido acarreador hacia el núcleo completo. Todos estos pasos son realizados por una serie de enzimas asociadas a la cara citoplasmática de la membrana.

Una característica importante de la polimerización de la cadena O es que cada tetrasacárido recién sintetizado es incorporado en el extremo reductor de la cadena creciente (29). Esto posee la ventaja de que la enzima polimerasa no requiere localizar el extremo no reductor del polímero creciente, el cual está probablemente lejos de la membrana y del sitio activo de la polimerasa. Sin embargo, este ciclo biosintético no parece ser común a todos los lipopolisacáridos estudiados (6,7). En algunos casos hay evidencias de síntesis de cadena O utilizando el extremo no reductor del polímero, pero la enzimología no ha sido esclarecida aun.

3. GENÉTICA

Lípido A. Los genes que participan en la biosíntesis del A no están agrupados de manera tan evidente como los que participan en la síntesis del polisacárido O. Varios genes de las reacciones tempranas de la vía se hallan localizados en un operon complejo y heterogéneo cerca del minuto 4 del mapa de ligamiento físico de *E. coli* K12, el cual también contiene genes relacionados con el crecimiento y la síntesis de macromoléculas (30), mientras que otros genes están diseminados alrededor del cromosoma. La transferencia del grupo acilo (ácido β -hidroximiriístico) al UDP-GlcNAc en el primer paso de la síntesis de lípido A

es llevada a cabo por una aciltransferasa muy específica codificada por el gen *lpxA* localizado en el minuto 4 del mapa de *E. coli* K12 (31). El gen *lpxA* es parte de un grupo de 11 genes organizado en un operon complejo llamado operon de síntesis macromolecular II, en el cual incluye otros genes vitales para la bacteria (30). Esto reafirma aun más la naturaleza esencial de la vía del LPS en bacterias Gramnegativas. La posterior acilación de esta molécula para formar el lípido X es realizada por los productos de los genes *lpxC* y *lpxD* (20). La reacción de condensación que lleva a la formación del lípido IVA es catalizada por el producto del gen *lpxB* (32). El lípido IV_A es la primera estructura que exhibe algunas de las características que definen la endotoxina bacteriana, aun cuando no es tóxica como el LPS mismo (21, 33). La posibilidad de usar el lípido IV como un precursor y manipular la síntesis del LPS abre una serie de alternativas interesantes para el desarrollo de agentes antimicrobianos y drogas diseñadas para combatir el choque endotóxico.

Núcleo o core. La mayoría de los genes que participan en la biosíntesis del núcleo se encuentran agrupados en el grupo *rfa* que comprende 17 genes en *E. coli* K12 (34). El arreglo de los genes del LPS en grupos y en operones no siempre está en paralelo con la vía biosintética misma. Por ejemplo, la unión de los dos primeros residuos de Kdo al precursor de lípido IVA tiene lugar antes de la acilación final del lípido A. Asimismo, aun cuando muchos de los genes del núcleo están organizados en el grupo *rfa*, parte de esos genes están también involucrados en la unión de la cadena O al core.

Además, existen genes que participan en la biosíntesis del núcleo que no están localizados en este grupo principal. Dichos genes están involucrados en la síntesis del Kdo y son el gen *kdsA*, localizado en el minuto 27 (34), que codifica por a Kdo-8-fosfato sintetasa la cual genera el Kdo-fosfato. El gen *kdsB*, localizado en el minuto 85, cerca del grupo *la*, codifica por la enzima que activa el Kdo a CMP-Kdo. El gen *kdtA*, localizado en un extremo del grupo *rfa*, codifica a su vez por una enzima bifuncional que transfiere en forma secuencial las dos moléculas de CMP-Kdo al lípido IV_A y además posee características que la hacen capaz de servir como anclaje de la molécula nascente de LPS a la membrana (35). Por su parte, los genes del grupo *rfa* codifican por una serie de glicosiltransferasas que actúan en forma secuencial, así como por otras enzimas accesorias que añaden grupos funcionales a diversas regiones del núcleo (36).

Cadena O. Como es generalmente cierto para las vías biosintéticas de carbohidratos complejos que han sido estudiadas a nivel genético, los genes tanto del núcleo como del antígeno O están organizados principalmente en agrupaciones de genes contiguos. En *E. coli* K12 y *S. typhimurium* estos grupos están presentes en dos regiones del cromosoma, cerca de los genes involucrados en la biosíntesis del polisacárido capsular. El grupo de genes *rfa* se localiza en la región entre el minuto 81 y el minuto 85, que flanquea el sitio de origen de la replicación del cromosoma. Por su parte, el grupo de genes *rfa* está situado entre el minuto 44 y el minuto 4 del mapa físico del cromosoma de estas bacterias (30).

El grupo *rfa*, además de codificar por la biosíntesis del oligosacárido nuclear, lo hace también de la unión del antígeno O al núcleo, mientras que el grupo *rfa* contiene 16 genes en *S. typhimurium*, los cuales están involucrados en la síntesis del antígeno O y en su unión al núcleo. El número de genes en este último grupo varía con la composición de azúcares en el antígeno O. En ambos grupos la mayoría de genes codifican por proteínas solubles que alguna forma están asociadas con la superficie interna de la membrana citoplasmática, y no se han encontrado aun proteínas que puedan ser translocados al periplasma o a la membrana externa. Muchas de estas proteínas operan como complejos multienzimáticos que sintetizan precursores activados de azúcares y como transferasas de residuos glicosídicos a las cadenas crecientes de azúcares, mientras que un número reducido de proteínas se encargan de la polimerización de las unidades y de la transferencia del antígeno O al complejo lípido A-núcleo (30).

CONCLUSIONES

El trabajo de un gran número de laboratorios por más de 25 años ha permitido elucidar la mayoría de los pasos bioquímicos y su control genético involucrados en la biosíntesis del lipopolisacárido en *Salmonella* sp y *E. coli*. Sin embargo una serie de pasos y mecanismos aun quedan por resolverse completamente. Dado que tanto las unidades repetitivas de la cadena O, así como el lípido A-núcleo son sintetizados en la cara interna de la membrana citoplasmática, debe existir un sistema de transporte de

intermediarios biosintéticos y sustratos precursores a través de la membrana hacia el sitio de su utilización. Sin embargo, los mecanismos involucrados de estos procesos, así como la topología global de la síntesis de LPS, no han sido esclarecidos aun.

Un área sumamente interesante de investigación actual es el mecanismo de translocación del LPS hacia la membrana externa. Se ha demostrado que el LPS es sintetizado en la membrana citoplasmática y es translocado de manera irreversible a la membrana externa. Sin embargo, no se conoce cómo se da este proceso en la célula bacteriana. Actualmente se ha acumulado evidencia de que parte de este proceso de transporte podría llevarse a cabo en el espacio periplásmico, como en el caso del peptidoglucano pero las teorías son complejas y difíciles de demostrar (37). Se ha sugerido también la participación de canales proteicos que permitan el paso de polisacáridos a través de membranas, o bien de proteínas que recubran los polisacáridos de alguna forma durante su translocación (17).

El estudio del LPS o sus análogos en bacterias provenientes de una gran variedad de ambientes está generando información muy valiosa con respecto a esta molécula tan antigua evolutivamente. El análisis de sus variantes estructurales y, sobre todo, la investigación de los mecanismos bioquímicos de su síntesis contribuirá notablemente al conocimiento del significado del LPS para la viabilidad bacteriana y al desarrollo de nuevas armas terapéuticas en el combate de las infecciones bacterianas.

ABSTRACT

Lipopolysaccharides (LPS) constitute the O antigen and the endotoxin of Gram-negative bacteria. They are located in the outer membrane of bacterial cell envelope and play an important role in the pathogenesis of infectious disease, as well as in the interaction with host immune system. Basically, LPS is composed of a conserved, hydrophobic portion, the lipid A, which is immersed in the outer leaflet of outer membrane, and a hydrophilic portion, the O polysaccharide, with high structural variability. Lipid A is responsible for the pathophysiological properties of endotoxin. O polysaccharide, the outermost region, confers bacterial cell its serological specificity. Core oligosaccharide binds O polysaccharide to the lipid A region in the outer membrane. In general, genes for LPS synthesis are organized either in discrete gene clusters as in the core and O polysaccharide, or they are scattered around the bacterial chromosome as in lipid A. In enterobacteria the majority of LPS biosynthetic pathway has been elucidated. Currently, the molecular interactions of enzymes and their substrates, as well as the transport of LPS across the membrane are under continuous research, given the important implications in the knowledge of the biology of bacteria and the potential pharmacological use of LPS analogs or antagonists in therapeutics of endotoxic shock. This is an updating review of the most relevant aspects of the structure, biochemistry and genetics of this important bacterial molecule.

BIBLIOGRAFIA

1. Mäkelä, P. H., and Stocker, B. A. D. Genetics of lipopolysaccharide. En: *Handbook of endotoxin*, vol. 1. Chemistry of endotoxin. E. T. Rietschel (ed.). Elsevier Biomedical Press, Amsterdam. 1984; pp.59-137.
2. Davis, B. Bacterial Architecture. En: Davis, B., Dulbecco, R., Eisen H. and Ginsberg, H. (Eds.). *Microbiology*, 4th Edition. J. B. Lippincott Co. Philadelphia, 1990, pp. 21-50.
3. Morrison, D. C. and Ryan, J. L. Endotoxins and disease mechanisms. *Ann. Rev. Med.* 1987, 38:417-432.
4. Rietschel, E. T. and H. Brade. Bacterial Endotoxins. *Sci. Am.* 1992; 267:26-33.
5. Galanos, C., Luderitz, O., Rietschel, E. T., Westphal, O., Brade, H., Brade, L., Freudenberg M., Schade, U., Imoto, M., Yoshimura, H., Kusumoto, S. and Shiba, T. Synthetic and natural *Escherichia coli* free lipid A express identical endotoxic activities. *Eur. J. Biochem.* 1985; 148: 1-5.
6. Rick, P. D. Lipopolysaccharide biosynthesis. En *Escherichia coli and Salmonella typhimurium, cellular and molecular biology*, F. C. Neidhardt (Ed). Washington, DC: ASM Publications. 1987; p. 648-662.
7. Raetz, C. R. H. Biochemistry of endotoxins. *Ann. Rev. Biochem.* 1990, 59: 129-170.
8. Nikaido, H., and Vaara, M. Outer membrane. En *Escherichia coli and Salmonella typhimurium, cellular and molecular biology*, F. C. Neidhardt (Ed.). Washington, DC: ASM Publications. 1987; pp. 7-22.
9. Strain, S. M., Fesik, S. W., and Armitage, I. M. Characterization of lipopolysaccharide from a heptoseless mutant of *Escherichia coli* by carbon 13 nuclear magnetic resonance. *J. Biol. Chem.* 1983; 258:2906-2910.
10. Labischinski, H. L., Barnickel, G., Bradaczek, H., Naumann, D., Rietschel, E. T. and Giesbrecht, P. High state of order of isolated bacterial lipopolysaccharide and its possible contribution to the permeability barrier property of the outer membrane. *J. Bacteriol.* 1985; 162:9-20.
11. Weckesser, J. and Mayer, H. Different lipid A types in lipopolysaccharides of phototrophic and related nonphototrophic bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 1988; 54: 143-154.
12. Mayer, H., Tharanathan, R. N. and Weckesser, J. Analysis of lipopolysaccharides of Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol.* 1985; 18:157-207.
13. Bhat, U. R., Carlson, R. W., Busch, M. and Mayer, H. Distribution and phylogenetic significance of 27-hydroxy-octacosanoic acid in lipopolysaccharides from bacteria belonging to the alpha-2 subgroup of Proteobacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1991; 41:213-217.

14. Mayer, H., Bhat, U. R., Masoud, H., Radziejewska-Lebrecht, J., Widemann, C. and Krauss, J. H. Bacterial lipopolysaccharides. *Pure & Appl. Chem.* 1989, 61:1271-1282.
15. Gibson, B. W., Webb, J. W., Yamasaki, R., Fisher, S. J., Burlingame, A. L., Mandrell, R. E., Schneider, H., and Griffiss, J. M. Structure and heterogeneity of the oligosaccharides from lipopolysaccharides of *Neisseria gonorrhoeae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1989; 86:17-21.
16. Palva, E. T. and Mákelá, P. H. Lipopolysaccharide heterogeneity in *Salmonella typhimurium* analyzed by sodium dodecyl sulfate/polyacrylamide gel electrophoresis. *Eur. J. Biochem.* 1980; 107:137-143.
17. Kastowski, M., Gutberlet, T., and Bradaczek, H. Molecular modeling of the three dimensional structure and conformational flexibility of bacterial lipopolysaccharide. *J. Bacteriol.* 1992; 174:4798-4806.
18. Caroff, M., Bundie, D. R., Perry, M. B., Cherwonogrodzky, J. W. and Duncan, J. R. Antigenic S-type lipopolysaccharide of *Brucella abortus* 1119-3. *Infect. Immun.* 1984; 46 :384-389.
19. Raetz, C. R. H. Structure and biosynthesis of lipid A in *Escherichia coli*. En *Escherichia coli and Salmonella typhimurium, cellular and molecular biology*, F. C. Neidhardt (Ed.). Washington, DC: ASM Publications. 1987; pp. 498-503.
20. Ray, B. L., Painter, G., and Raetz, C. R. H. The biosynthesis of Gram-negative endotoxin: formation of lipid A disaccharides from monosaccharide precursors in extracts of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 1984; 259: 4852-4859.
21. Levine, D. H., and Racker, E. Condensation of arabinose-5-phosphate and phosphorylenolpyruvate by 2-keto-3-deoxy-8-phosphooctonic acid synthetase. *J. Biol. Chem.* 1959; 234: 2532-2539.
22. Ghalambor, M. A., and Heath, E. C. The biosynthesis of cell wall lipopolysaccharide in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 1966; 241 :3222-3227.
23. Brozek, K. A., Hosaka, K., Robertson, A. D., and Raetz, C. R. H. Biosynthesis of lipopolysaccharide in *Escherichia coli*: cytoplasmic enzymes that attach 3-deoxy D manno-octulosonic acid to lipid A. *J. Biol. Chem.* 1989; 264:6956-6966.
24. Eidels, L. and Osborn, M. J. Phosphoheptose isomerase, first enzyme in the biosynthesis of aldoheptose in *Salmonella typhimurium*. *J. Biol. Chem.* 1974; 249:5642-5648.
25. Hasin, M., and Kennedy, E. P. Role of phosphatidyletanolamine in the biosynthesis of pyrophosphoetanolamine residues in the lipopolysaccharide of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 1982; 257:12475-12477.

26. Mühlradt, P. Biosynthesis of Salmonella lipopolysaccharide. The in vitro transfer of phosphate to the heptose moiety of the core. *Eur. J. Biochem.* 1969; 11:241-248.
27. Osborn, M. J. Structure and biosynthesis of the bacterial cell wall. *Ann. Rev. Biochem.* 1969; 3g: 501 -538.
28. Rothfield, L. and Romeo, D. Role of lipids in the biosynthesis of the bacterial cell envelope. *Bacteriol. Rev.* 1971; 35:14-38.
29. Robbins, P. W., Bray, D., Dankert, M., and Wright, A. Direction of chain growth in polysaccharide synthesis. *Science.* 1967; 158: 1536-1540.
30. Schnaitman, C. A., and Klena, J. D. Genetics of lipopolysaccharide biosynthesis in enterobacteria. *Microbiol. Rev.* 1993; 57: 655-682.
31. Galloway, S. M., and Raetz, C. R. H. A mutant of *Escherichia coli* defective in the first step of endotoxin biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 1990; 265:6394-6402.
32. Crowell, D. N., Reznikoff, W. S., and Raetz, C. R. H. Nucleotide sequence of the *Escherichia coli* gene for lipid A disaccharide synthetase. *J. Bacteriol.* 1987; 169:5727-5734.
33. Golenbock, D. T., Hampton, R. Y., Qureshi, N., Takayama, K., and Raetz, C. R. H. Lipid A-like molecules that antagonize the effects of endotoxins on human monocytes. *J. Biol. Chem.* 1991; 266:19490-19498.
34. Bachmann, B. J. Linkage map of *Escherichia coli* K-12, edition 8. *Microbiol. Rev.* 1990; 54:130-197.
35. Clementz, T., and Raetz, C. R. H. A gene coding for 3-deoxy-D-manno-octulosonic acid transferase in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 1991; 266:9687-9696.
36. Pradel, E., Parker, C. T., and Schnaitman, C. A. The structure of the *rfaB*, *rfaI*, *rfaJ*, and *rfaS* genes of *Escherichia coli* K-12 and their roles in the assembly of the lipopolysaccharide core. *J. Bacteriol.* 1992; 174:4736-4745.
37. Park, J. T. Murein synthesis. In *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurim*, F. C. Neidhart (Ed.). Washington, DC: ASM Publications. 1987; pp. 663-671.

Cuadro 1.

Composición química de unidades repetitivas de polisacárido O en algunas bacterias

BACTERIA	COMPOSICION QUIMICA ^a	REFERENCIA
<i>Salmonella typhimurium</i>	Abe-Man-Ram-Gal	12,14
<i>Salmonella anatum</i>	Tiv-Man-Ram-Gal-Glc	6
<i>Salmonella anatum</i>	Man-Ram-GalOAc	6
<i>Salmonella newinton</i>	Man-Ram-Gal	6
<i>Yersinia enterocolitica</i> 02	dAlt	14
<i>Shigella sonnei</i>	AltNac-FucNac	14
<i>Escherichia coli</i> 09111	GlcNac-Glc-Gal-Col	14
<i>Escherichia coli</i> 08	Man-Man-Man	14
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 3a	ManNac-FucNac	14
<i>Brucella abortus</i>	N-formilperosamina	18

^a

Abe, abecucosa; Man, manosa; Ram, ramnosa; Gal, galactosa; Tiv, tivelosa; Galc, glucosa; GalOAc, 0-acetilgalactosa; dAlt, desoxialtrosa; AltNac, ácido N-acetilaltrosaminuránico; FucNac, N-acetilfucosamina; GlcNac, N-acetilglucosamina; Col, ácido colánico; ManNac, ácido N-acetilmanurónico.

FIGURA 1

Representación esquemática molecular del lipopolisacárido de *Salmonella tyhimurium*. Los hexágonos corresponden a diferentes hexosas presentes en el núcleo externo y en la cadena O. Modificado de Rietschel y Brade (4).

