



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**ESTUDIO DE CORRELACIÓN ESTRUCTURA/FUNCIÓN DE CETPI COMO UNA
NUEVA PROTEÍNA DE UNIÓN A LIPOPOLISACÁRIDOS BACTERIANOS**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctora en Ciencias

PRESENTA:

ERÉNDIRA GUADALUPE PÉREZ HERNÁNDEZ

TUTOR PRINCIPAL:

Dr. JAIME MAS OLIVA
[Instituto de Fisiología Celular, UNAM](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

DR. JOSÉ SIFUENTES OSORNIO
[Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán](#)

DR. ABEL MORENO CÁRCAMO
[Instituto de Química, UNAM](#)

Ciudad de México. Septiembre, 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



CGEP/PMDCBQ/835
16A83A-64665D02112AC
Asunto: Jurado de examen

PÉREZ HERNÁNDEZ ERÉNDIRA GUADALUPE
Estudiante de Doctorado en Ciencias Bioquímicas
Presente

Los miembros del Subcomité Académico en reunión ordinaria del **16 de mayo de 2023**, conocieron su solicitud de asignación de **JURADO DE EXAMEN** para optar por el grado de **Doctora en Ciencias**, con la réplica de la tesis "**Estudio de Correlación Estructura/Función de CETPI como una Nueva Proteína de Unión a Lipopolisacáridos bacterianos**", dirigida por el/la Dr(a). **MAS OLIVA JAIME**.

De su análisis se acordó nombrar el siguiente jurado integrado por los doctores:

MUÑOZ CLARES ROSARIO ADELAIDA	PMDCBQ	PRESIDENTE
HERNÁNDEZ MUÑOZ ROLANDO EFRAÍN	PMDCBQ	SECRETARIO
GAVILANES-RUIZ RUIZ MARINA	PMDCBQ	VOCAL
MUÑOZ GARAY ROBERTO CARLOS	PMDCBQ	VOCAL
ÁVILA RODRÍGUEZ MIGUEL ÁNGEL	NO ACREDITADO	VOCAL

Sin otro particular por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 16 de mayo de 2023

Coordinadora
Dra. Claudia Lydia Treviño Santa Cruz

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Agradezco a CONACYT por el apoyo económico que recibí durante mis estudios de doctorado a través del programa de Becas de Estudios de Posgrado Nacionales en el periodo: Febrero 2017- Enero 2021; Número de Registro de Becario: 270247; Número de apoyo: 465348.

A los siguientes apoyos de financiamiento para el desarrollo de este proyecto: UNAM-PAPIIT IN207121, UNAM-PAPIIT IN206619 y Estímulo a Investigaciones Médicas “Miguel Alemán Valdés”, Fundación Miguel Alemán A.C.

Al “Programa de Apoyo a los Estudios del Posgrado” (PAEP) por el apoyo brindado para participar en el XXXII CONGRESO NACIONAL DE BIOQUÍMICA, 2018, con el trabajo: “CETPI: a new protein involved in the pathophysiology of sepsis and septic shock”

A la M. en C. Tzipe Govezensky del Instituto de Investigaciones Biomédicas, por su gran ayuda con el análisis estadístico.

A la Dra. Georgina Díaz- Herrera del Instituto de Investigaciones Biomédicas y a la Dra. Hilda Vázquez-López del Instituto de Biotecnología por su asistencia en la parte experimental.

Al Ing. Aurey Galván Lobato e Ing. Manuel Ortínez Benavidez miembros del taller de mantenimiento electrónico, eléctrico y mecánico del Instituto de Fisiología Celular.

A Julio Ignacio Palacios Ordoñez y al personal administrativo del Posgrado en Ciencias Bioquímicas.

Agradezco a mi Tutor Principal, el Dr. Jaime Mas Oliva por aceptarme en su grupo de investigación y por todo su apoyo durante mi formación para concluir el Doctorado. A los miembros del Comité Tutor, al Dr. Abel Moreno Cárcamo y al Dr. Dr. José Sifuentes Osornio por su apoyo y sus aportaciones en el desarrollo de este proyecto.

A los miembros del Jurado: Dra. Muñoz Clares Rosario Adelaida, Hernández Muñoz Rolando Efraín, Dra. Gavilanes Ruíz Marina, Muñoz Garay Roberto Carlos y Dr. Ávila Rodríguez Miguel Ángel, por su tiempo para la revisión de esta tesis y por sus valiosos comentarios.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A mis padres Saúl César Pérez Pérez y Ma. Guadalupe Hernández Aguilera por su apoyo en todo momento para que yo pudiera enfocarme en la realización de este trabajo.

A mis hermanos Julio César Pérez Hernández y Saúl Jesús Pérez Hernández por su comprensión y estar al tanto de mí.

Con mucho cariño agradezco a la M. en C. Blanca A. Delgado Coello por ser una gran amiga y por su disposición de ayuda en este camino tanto en ámbitos personales como académicos.

A mis amigos del laboratorio 322 Norte: Dra. Roxana G. Gutiérrez Vidal, M. en C. Ismael Luna Reyes y M. en C. Sandra D. Calixto Tlacomulco, por los momentos compartidos y su apoyo.

Al Dr. Víctor Manuel de la Puente Díaz de León, muchas gracias por ser un excelente compañero de trabajo, por tu paciencia, generosidad y gran compromiso.

A la Dra. Danaí Montalván Sorrosa y al Dr. Héctor V. Miranda Astudillo, deseo expresar mi más profundo agradecimiento por su apoyo en la preparación de mi examen de candidatura, son un gran ejemplo para mí.

Al Dr. Gabriel Muciño Hernández y al Dr. Rodolfo Servín Blanco por sus consejos, su paciencia y su amistad, los admiro mucho.

A mis queridas amigas la Dra. Verónica Rojo León y la Q.F.B. Norma Citlalli Sandoval Vázquez, porque siempre que hablo con ustedes sus palabras y compañía son muy reconfortantes. He compartido con ustedes los momentos más difíciles y gratos de este camino y siempre llevo sus consejos conmigo, lo que me ha permitido disfrutar y aprender de cada momento, ¡Muchas gracias!

A mis amigos de la Facultad de Química: el Dr. Eduardo Molina Jijón, la Dra. Lila L. Domínguez y la M. en C. Gabriela Contreras por su ejemplo de dedicación, trabajo duro y disciplina. Gracias por permitirme compartir momentos con ustedes.

Con cariño a mi amiga de la Facultad de Química, la Dra. Rosa Elia Islas Vigueras porque a pesar de la distancia seguimos apoyándonos.

A mis amigas la M. en A. Karen Córdova y la Q.F.B. Marisol Torres, gracias por siempre estar presentes incluso cuando por momentos desparezco para lograr culminar mis proyectos.

A mis compañeros y amigos de Facultad de Medicina, a la Dra. Claudia Rangel, muchas gracias por el apoyo y confianza que me has brindado. Al doctor sin doctorado Alejandro Martínez y a Diego Herrerías (Diegui) por su compañía durante la pandemia.

A mis compañeros y amigos de Bioextracto: Gonzalo, Laura, Lidia, Amayelli, Leticia y Alan, muchas gracias por siempre escucharme, por sus consejos y los momentos compartidos.

A mis primos, tíos y sobrinos, en especial a los que están más cerca de mí, mis tíos: Sonia, Gloria, Paco y Catalina; así como a mis pequeños sobrinos Belén, Rodrigo, Fátima, Daniel, Danaé y Merlina.

Por último, agradezco a todas las personas con las que compartí momentos en los que me apoyaron, pero nuestros caminos tomaron rumbos distintos.

DEDICATORIA

Este trabajo está dedicado con mucho cariño a mi tía Lilia Pérez, a mis abuelos Josefina Pérez, Alberto Pérez y a mis amigas Angélica Díaz y Laura Reyes. Q. E. P. D. Siempre estarán a mi lado.

y la paciencia, prueba; y la prueba, esperanza;
y la esperanza no avergüenza; porque el amor
de Dios ha sido derramado en nuestros corazones
por el Espíritu Santo que nos fue dado.

Romanos 5:4-5

ABREVIATURAS

APCs	Antigen-Presenting Cell / Células presentadoras de antígeno
BPI	Bactericidal/Permeability-Increasing protein / Proteína aumentadora de la permeabilidad y bactericida
CD14	Cluster of Differentiation 14 / "Clúster" de diferenciación 14
CETP	Cholesteryl Ester Transfer Protein / Proteína de transferencia de ésteres de colesterol
CETPI	Isoforma de la proteína de transferencia de ésteres de colesterol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECs	Endothelial Cells / Células endoteliales
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay / Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas
FITC	Fluorescein Isothiocyanate / Isotiocianato de fluoresceína
HDL	High Density Lipoprotein / Lipoproteínas de alta densidad
HLA-DR	Human Leukocyte Antigen-DR / Antígeno leucocitario humano isotipo DR
HPLC	High-Performance Liquid Chromatography / Cromatografía líquida de alta resolución
HRP	Horseradish Peroxidase / Peroxidasa de rábano
IFN γ	Interferón gamma
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-18	Interleucina 18
IL-1 β	Interleucina 1 beta
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
INCMNSZ	Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán
IRAK	Interleukin-1 Receptor-Associated Kinases / Cinasas asociadas al receptor de IL-1
KLH	Keyhole Limpet Hemocyanin / Hemocianina de lapa ojo de cerradura
LBP	Lipopolysaccharide Binding Protein / Proteína de unión a lipopolisacáridos
LDL	Low Density Lipoprotein / Lipoproteínas de baja densidad
LPS	Lipopolisacáridos
MD-2	Lymphocyte antigen 96 o Myeloid Differentiation factor 2 / Antígeno 96 de linfocitos
MDSC	Myeloid-Derived Suppressor Cells / Células supresoras de origen mielóide
MIP-1 β	Macrophage Inflammatory Protein-1 beta / Proteína Inflamatoria de macrófagos 1 beta
MMPs	Matrix metalloproteinases / Metaloproteinasas de matriz
mRNA	messenger Ribonucleic Acid / Ácido ribonucleico mensajero
NF- κ B	Nuclear Factor Kappa-light-chain-enhancer of activated B cells / Factor nuclear κ B
PBS	Phosphate Buffered Saline / Amortiguador de fosfatos salino
PCR	Proteína C Reactiva
PCT	Procalcitonina
PLTP	Phospholipid Transfer Protein / Proteína de transferencia de fosfolípidos
SOFA	Sequential Organ Failure Assessment Score / Escala de evaluación de falla orgánica
TA	Temperatura Ambiente
TIR	Toll/Interleukin-1 (IL-1) Receptor / Dominio intracelular (de Toll/receptor IL-1)
TIRAP	TIR Domain Containing Adaptor Protein / Proteína adaptadora que contiene un dominio TIR
TLR4	Toll Like Receptor 4 / Receptor tipo Toll 4

TMB	3,3',5,5'- tetrametilbenzidina
TNF- α	Tumor Necrosis Factor-alpha / Factor de necrosis tumoral alfa
TRAM	Toll/IL-1R domain-containing adaptor-inducing IFN- β -Related Adaptor Molecule / Molécula adaptadora relacionada con TRIF (dominio TIR que contiene un adaptador inductor de interferón- β)
TRIF	Toll/IL-1R domain-containing adaptor-inducing IFN- β / Dominio TIR que contiene a la proteína adaptadora que induce interferón
Treg	Regulatory T cells / Células T reguladoras
UCI	Unidad de Cuidados Intensivos
VLDL	Very Low Density Lipoprotein / Lipoproteína de muy baja densidad

ÍNDICE

1.	RESUMEN	1
2.	ABSTRACT	3
3.	INTRODUCCIÓN	5
3.1	Sepsis y choque séptico	5
3.1.1	Incidencia y mortalidad de la sepsis.....	6
3.1.2	Etiología.....	7
3.2	Fisiopatología de la sepsis	8
3.2.1	Inflamación sostenida.....	9
3.2.1.1	Inicio de la inflamación en respuesta a los LPS.....	9
3.2.1.2	El papel de los LPS en la fisiopatología de la sepsis.....	12
3.2.1.2.1	Activación del complemento.....	12
3.2.1.2.2	Activación de las células endoteliales y coagulación.....	13
3.2.2	Inmunosupresión asociada a sepsis.....	14
3.2.3	Disfunción orgánica inducida por sepsis.....	16
3.3	Proteínas de unión a lipopolisacáridos	18
3.4	Proteína de transferencia de ésteres de colesterol e isoformas	20
4.	ANTECEDENTES	25
4.1	Isoforma de la proteína de transferencia de ésteres de colesterol y mecanismos que disminuyen los efectos de los LPS en sepsis.....	25
5.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	29
6.	HIPÓTESIS	30
7.	OBJETIVOS	30
8.	METODOLOGÍA	31
8.1	Diseño del estudio.....	31
8.2	Población de estudio.....	31
8.3	Recolección de las muestras.....	32
8.4	Anticuerpo anti- CETPI.....	33
8.5	Inmunotransferencia.....	33

8.6	Medición de la concentración de citocinas en plasma.....	34
8.7	Determinación de la concentración de la isoforma de la proteína de transferencia de ésteres de colesterol (CEPTI) empleando un ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas	34
8.8	Ensayo de la actividad proteolítica total en plasma.....	35
8.9	Cuantificación de la concentración de LPS en plasma.....	35
8.10	Eliminación de albúmina del plasma.....	35
8.11	Análisis estadístico.....	36
9.	RESULTADOS	37
9.1	Sujetos de estudio y parámetros clínicos.....	37
9.2	La concentración plasmática de CETPI es mayor en los pacientes con bacteriemia por Gram-negativos.....	39
9.3	Los niveles plasmáticos de CETPI y citocinas correlacionan con la severidad de los pacientes con bacteriemia por Gram-negativos.....	40
9.4	La concentración de CETPI correlaciona negativamente con los niveles de IL-1 β , IL-8 e IL-10 en pacientes con choque séptico.....	42
9.5	Los niveles de LPS correlacionan con los niveles de CETPI en pacientes con infección o sepsis por bacterias Gram-negativas.....	45
9.6	La actividad proteolítica sobre CETPI se asocia con la severidad de la infección.....	47
10.	DISCUSIÓN	52
11.	CONCLUSIONES	59
12.	PERSPECTIVAS	60
13.	REFERENCIAS	61
14.	ANEXOS	68
14.1	Datos demográficos y clínicos de los sujetos controles y pacientes con infección, sepsis o choque séptico.....	68
14.2	Lista de publicaciones generadas durante el programa de doctorado.....	69
14.3	Lista de publicaciones en colaboración.....	69
14.4	Artículo original: The cholesteryl-ester transfer protein isoform (CETPI) and derived peptides: new targets in the study of Gram-negative sepsis.....	70
14.5	Artículo de revisión: New insights into lipopolysaccharide inactivation mechanisms in sepsis.....	84

1. RESUMEN

La sepsis es un síndrome en el cual hay una respuesta desregulada del hospedero ante un agente infeccioso. La progresión de la enfermedad se debe principalmente a la gran heterogeneidad del proceso fisiopatológico, la cual conduce al daño en múltiples órganos, contribuyendo al desarrollo del choque séptico y a un peor pronóstico del paciente. Es alarmante el aumento de la mortalidad a nivel mundial debido a sepsis y choque séptico, por lo que se ha observado un interés creciente, tanto en la búsqueda de nuevos biomarcadores que permitan un diagnóstico oportuno, así como en el entendimiento de los procesos bioquímicos, celulares e inmunológicos que puedan dar lugar a mejores opciones terapéuticas.

A pesar de que los agentes etiológicos de sepsis varían de acuerdo con la región geográfica y a lo largo del tiempo, las bacterias Gram-negativas prevalecen como la principal causa de sepsis. En la membrana externa de las bacterias Gram-negativas, se encuentran los lipopolisacáridos (LPS), cuya continua presencia en plasma contribuye a una respuesta inmune exacerbada. Dentro de los mecanismos que amortiguan los efectos sistémicos de los LPS y favorecen su eliminación, se encuentran la proteína aumentadora de la permeabilidad y bactericida (BPI, por sus siglas en inglés), la proteína de unión a LPS (LBP, por sus siglas en inglés) y la isoforma de la proteína de transferencia de ésteres de colesterol (CETPI, por sus siglas en inglés). Esta última, originalmente identificada en nuestro laboratorio, es una proteína sintetizada exclusivamente en el intestino, con una alta capacidad de unión a *LPS in vitro*. Mientras que en animales experimentales, estudiando la interacción de CETPI con los LPS, se encontró su capacidad de disminuir la respuesta pro-inflamatoria.

En el presente trabajo se determinó la concentración de CETPI en plasma de pacientes clasificados según su gravedad en infección, sepsis o choque séptico, debido a bacterias Gram-negativas. Además, se estudió la relación entre la concentración de CETPI con los niveles de LPS y de citocinas pro- y anti-inflamatorias. En los pacientes incluidos en este estudio, la bacteria aislada con mayor frecuencia en sangre fue *Escherichia coli* y el abdomen fue el principal sitio de infección. La concentración en plasma de CETPI fue mayor en todos los pacientes con datos de infección, sepsis y choque séptico en comparación con los niveles presentes en los sujetos sanos, encontrándose una correlación con la severidad de la enfermedad determinada por la escala de evaluación de falla orgánica (SOFA, por sus siglas en inglés). Los pacientes con choque séptico tuvieron una mayor concentración de IL-6 e IL-8, y una menor concentración de IFN γ respecto a los pacientes con infección. Además, en estos

pacientes críticos, los niveles de CETPI correlacionaron negativamente con las citocinas IL-1 β , IL-8, e IL-10. El análisis de los niveles de LPS y CETPI mostró una correlación directa entre dichas variables en los pacientes con infección y sepsis. Finalmente, la identificación por inmunotransferencia de una banda adicional a la correspondiente para CETPI, junto a la actividad proteolítica aumentada en el plasma de los pacientes, sugiere la presencia de péptidos derivados del dominio carboxilo terminal de CETPI en plasma. De esta forma, estos resultados muestran la existencia de una correlación directa y novedosa entre el grado de gravedad de una infección que puede llegar a sepsis y choque séptico, con la presencia, no sólo de la proteína CETPI, sino también con péptidos derivados de ella. En su conjunto, los resultados presentan a CETPI y péptidos derivados como nuevas moléculas con potencial función amortiguadora de los efectos sistémicos deletéreos de los LPS en pacientes en condición de sepsis o choque séptico.

2. ABSTRACT

Sepsis is a syndrome caused by a dysregulated host response to an infectious agent. The heterogeneity of the syndrome contributes to disease progression and a worse outcome. The increase of sepsis and septic shock-related deaths in critically ill patients around the world is alarming, which led to increased interest in searching for new diagnostic biomarkers and therapeutic options based on a better understanding of the biochemical, cellular, and immunological alterations in sepsis.

Although the main etiological agents in sepsis change according to the geographic region and over time, Gram-negative bacteria prevail as the leading cause of sepsis. The continuous presence of lipopolysaccharides (LPS), components of the outer membrane of Gram-negative bacteria, contributes to an exacerbated host immune response. The LPS-binding proteins: Bactericidal/permeability-increasing protein (BPI), LPS-binding protein (LBP), and the isoform of the cholesteryl ester transfer protein (CETPI) are components of the systemic mechanisms that decrease the effects of LPS. CETPI, originally identified in our laboratory, is a protein synthesized exclusively in the intestine and is present in human plasma. *In vitro* assays show that CETPI and peptides derived from its C-terminal sequence have the ability to bind LPS. Also, in experimental animals, the study of the interaction of CETPI with LPS shows its ability to decrease the pro-inflammatory response.

In this work, we determined the CETPI plasma concentration in patients with Gram-negative bacteremia classified according to disease severity as infection, sepsis or septic shock. Also, we studied the correlation between the CETPI plasma concentration with the plasma levels of LPS and a set of pro- and anti-inflammatory cytokines. In all patients, the most prevalent bacteria isolated from the bloodstream was *Escherichia coli* and the main site of infection was the abdomen. The CETPI plasma concentration was found to be higher in patients with infection, sepsis and septic shock, and positive blood culture for Gram-negative bacteria than in control subjects, showing a correlation with the disease severity evaluated by the Sequential [Sepsis-Related] Organ Failure Assessment (SOFA) values. In patients with septic shock higher levels of IL-6 and IL-8, and lower levels of IFN- γ were observed with respect to patients with infection. Furthermore, in these critically ill patients, we found a negative correlation between CETPI with IL-1 β , IL-8, and IL-10. Whereas, in patients with infection and sepsis, higher CETPI levels correlated with a high plasma LPS concentration. Finally, the identification of an additional band recognized by the CETPI antibody employing Western blot, and the higher proteolytic activity in

the plasma of the patients, suggest the presence of peptides derived from the C-terminal domain of CETPI.

Therefore, these results show the existence of a correlation between the degree of severity of an infection that can lead to sepsis and septic shock, with the presence not only of the CETPI protein but also with peptides derived from it. Taken as a whole, the results present CETPI and derived peptides as molecules with a potential protective function against the deleterious systemic effects of LPS in patients with sepsis or septic shock.

3. INTRODUCCIÓN

3.1 Sepsis y choque séptico

Sepsis es un síndrome definido por una respuesta desregulada del huésped a la infección que conduce a disfunción orgánica asociada a una elevada mortalidad (Singer *et al.*, 2016). Los pacientes con sepsis presentan alteraciones fisiológicas, patológicas y bioquímicas, en las cuales, factores como el sexo, la raza, edad, presencia de comorbilidades y el ambiente contribuyen a la respuesta sistémica que compromete la función de diversos órganos (Singer *et al.*, 2016; Rudd *et al.*, 2020).

El estado de sepsis en el cual las anomalías circulatorias, celulares y metabólicas están lo suficientemente marcadas para incrementar la mortalidad sustancialmente, se conoce como choque séptico (Font *et al.*, 2020; Singer *et al.*, 2016). Clínicamente, el choque séptico se define como sepsis con hipotensión persistente que requiere vasopresores para mantener la presión arterial media ≥ 65 mmHg, con la presencia de una concentración de lactato sérico >2 mM a pesar de una adecuada administración de líquidos intravenosos (Singer *et al.*, 2016; Guo *et al.*, 2018).

Para evaluar la disfunción orgánica se emplea la escala SOFA, en la cual se considera una puntuación basal de cero y una puntuación de SOFA ≥ 2 refleja daño orgánico y un riesgo de mortalidad global de 10 % en la población general. En esta escala se consideran variables correspondientes a la función del sistema respiratorio, sistema nervioso central, renal, cardiovascular, hepático y coagulación (**Tabla 1**). Aunque la escala SOFA es una herramienta útil para la estratificación de los pacientes, su evaluación requiere determinaciones clínicas no disponibles para pacientes fuera de la unidad de terapia intensiva. Por lo que en aquellos pacientes con sospecha de infección, se emplea una evaluación rápida denominada “quickSOFA”, que incluye alteraciones en el estado mental, presión arterial sistólica <100 mmHg y una frecuencia respiratoria ≥ 22 /min. La identificación de al menos dos de estos criterios clínicos en el paciente indica un mal pronóstico relacionado con sepsis (Singer *et al.*, 2016).

Tabla 1. Escala SOFA. FIO2, fracción de oxígeno inspirado; PAM, presión arterial media; PaO2, presión parcial de oxígeno (Adaptada de: Singer et al., 2016).

Sistema	Puntuación				
	0	1	2	3	4
Respiratorio PaO2/ FIO2, mmHg (kPa)	≥400 (53.3)	<400 (53.3)	<300 (40)	<200 (26.7) con soporte respiratorio	<100 (13.3) con soporte respiratorio
Coagulación Plaquetas, x 10 ³ /μL	≥150	<150	<100	<50	<20
Hígado Bilirrubina, mg/dL (μmol/L)	<1.2 (20)	1.2-1.9 (20-32)	2.0-5.9 (33-101)	6.0-11.9 (102-204)	>12.0 (204)
Cardiovascular	PAM ≥70 mmHg	PAM <70 mmHg	Dopamina <5 o dubotamina (cualquier dosis)	Dopamina 5.1-15 o epinefrina ≤0.1 o norepinefrina ≤0.1	Dopamina >15 o epinefrina >0.1 o norepinefrina >0.1
Sistema nervioso central Puntaje en la escala de coma Glasgow	15	13-14	10-12	6-9	<6
Renal Creatinina, mg/dL (μmol/L)	<1.2 (110)	1.2-1.9 (110-170)	2.0-3.4 (171-299)	3.5-4.9 (300-440)	>5.0 (440)
Flujo urinario, mL/d				<500	<200

3.1.1 Incidencia y mortalidad de la sepsis

En 2017, se registraron aproximadamente 48.9 millones de casos de sepsis alrededor del mundo, de los cuales, 33.1 millones ocurrieron en personas que presentaban una infección subyacente que ocasionó la pérdida de la salud, mientras que 15.8 millones ocurrieron en personas sin lesiones subyacentes o con enfermedades no transmisibles. En este mismo año, se reportaron 11 millones de muertes asociadas a sepsis, representando el 19.7 % de todas las muertes globales. La incidencia y mortalidad de la sepsis difieren significativamente en las distintas regiones del mundo, existiendo una correlación inversa con el índice sociodemográfico; en México se estima una incidencia de 340 a 440 por 100 000 habitantes y una mortalidad del 14 al 16 % (Rudd *et al.*, 2020). En este sentido, un estudio en el que se incluyeron 68 servicios de urgencias médicas de México reportó una prevalencia de 12.9 % y una mortalidad global de 16.9 %, siendo mayor para los pacientes con choque séptico (65.9 %) respecto a los pacientes con sepsis (9.4 %) (Gorordo-Delsol *et al.*, 2020).

Entre las causas del incremento en la incidencia de sepsis se encuentran el aumento de adultos mayores en la población, quienes presentan comorbilidades crónicas y alteraciones inmunitarias como resultado de inmunosenescencia (Hotchkiss & Opal, 2020), así como el aumento de la resistencia bacteriana a antibióticos. Aunado a esto, se ha sugerido que muchos de los casos de sepsis se deben a infecciones nosocomiales. Pacientes admitidos al hospital

por una condición no-infecciosa pueden estar expuestos a un agente infeccioso presente en dispositivos invasivos tales como catéteres venosos centrales o urinarios, o a través de malas prácticas de lavado de manos (Rudd *et al.*, 2020).

Uno de los principales factores que contribuyen a la alta mortalidad observada en los pacientes es el número de disfunciones orgánicas. Asimismo, muchos pacientes tienen al menos una comorbilidad y la muerte es frecuentemente atribuida a esta condición más que al proceso de sepsis. Las comorbilidades de mayor prevalencia son las enfermedades crónicas o inmunosupresoras. Por lo que los pacientes con cáncer, cuyo sistema inmune está comprometido, son una población frecuentemente afectada (Carrillo *et al.*, 2015).

Además, dado que aún queda mucho por comprender sobre la fisiopatología de la sepsis y a que las manifestaciones clínicas de este síndrome son heterogéneas, muchos casos son reconocidos tardíamente, de manera que los pacientes son tratados inapropiadamente antes de ingresar a la unidad de cuidados intensivos (UCI). De esta manera, se ha reportado que aquellos pacientes que reciben antibióticos oportunamente tienen una disminución en la mortalidad del 10 al 15 % (Vincent *et al.*, 2002).

3.1.2 Etiología

A pesar de que el 80 % de los casos de sepsis son originados principalmente por complicaciones de infecciones adquiridas en la comunidad, este síndrome presenta una alta incidencia dentro de los hospitales (Sakr *et al.*, 2018; Hollenberg & Singer, 2021). Un estudio global que incluyó 195 países muestra que desde 1990 a 2017 la causa subyacente más común de sepsis fueron las enfermedades diarreicas. En particular, dicho estudio reportó que en el 2017 la causa más común de sepsis asociada a una lesión fue el traumatismo vial, mientras que los desórdenes relacionados con la maternidad fueron la causa de enfermedad no transmisible más común asociada a sepsis (Rudd *et al.*, 2020). En otro estudio, en el que se recopilaban datos de 10069 pacientes de ocho regiones geográficas incluyendo el continente americano, se reportó que el origen más común de sepsis fue el tracto respiratorio (67.4 %), seguido por el tracto digestivo (21.8 %) (Sakr *et al.*, 2018). Por lo que, de forma global los sitios de infección más comunes asociados a sepsis son: pulmones (64 %), cavidad abdominal (20 %), torrente sanguíneo (15 %) y tractos renales y genitourinario (14 %) (Hollenberg & Singer, 2021).

De acuerdo con los registros internacionales de sepsis, las bacterias Gram-negativas (41.4 %) y Gram-positivas (32.4 %) son los principales agentes causales, seguidas por infecciones por

hongos (8.7 %) y virales (1.3 %) (Bhan *et al.*, 2016; Font *et al.*, 2020). Las principales especies bacterianas causantes de sepsis son para Gram-negativas: *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*; y para Gram-positivas: la especie *Staphylococcus aureus* (Hollenberg & Singer, 2021). Sin embargo, se debe considerar que los patrones microbiológicos varían alrededor del mundo (Sakr *et al.*, 2018).

3.2 Fisiopatología de la sepsis

El organismo es capaz de defenderse ante agentes patógenos a través del sistema inmune, así como de reparar el tejido dañado que resulta de la infección o trauma (Tabas & Glass, 2013). De manera fisiológica, ante una infección el hospedero activa una respuesta inflamatoria que es protectora, localizada y bien controlada. Procesos como la activación de células del sistema inmunológico, del complemento, del endotelio y de la coagulación contribuyen conjuntamente a la eliminación del agente patógeno y, posteriormente, los mecanismos antiinflamatorios resuelven el proceso inflamatorio, reparan los tejidos dañados y restauran la homeostasis (**Figura 1**).

El primer paso en el inicio de la respuesta del hospedero al patógeno es la activación de células del sistema inmune innato, constituido principalmente por macrófagos, monocitos, neutrófilos y células NK. Esto ocurre por la interacción de receptores de reconocimiento de patrones con patrones moleculares asociados a patógenos y con patrones moleculares asociados a daño (Medzhitov, 2008). Esta unión resulta en la activación de vías de transducción de señales intracelulares que causan la transcripción de los genes que codifican para citocinas proinflamatorias. Estas promueven la activación y proliferación de leucocitos, la activación del sistema del complemento, la producción de moléculas de adhesión endoteliales, del factor tisular y de quimiocinas, así como la inducción de proteínas de fase aguda (**Figura 1**) (Gyawali *et al.*, 2019). El sistema inmune adaptativo también es activado mediante la presentación de antígeno por las células presentadoras de antígeno (APCs, por sus siglas en inglés) a los linfocitos T y B. Lo anterior resulta en la producción de anticuerpos y en la generación de memoria inmunológica para subsecuentes infecciones con el mismo patógeno.

En los pacientes con sepsis, la continua presencia de los agentes patógenos está asociada con una fuerte activación del sistema inmune, así como de alteraciones mitocondriales, de la homeostasis del calcio y del metabolismo de la glucosa y de proteínas (Delano & Ward, 2016). Por muchos años se consideró que la respuesta inflamatoria desproporcionada a una infección constituía la patogénesis central a la sepsis, sin embargo, ahora se conoce que la respuesta del hospedero se modifica en otras vías más complejas que incluyen la inflamación sostenida, la

supresión inmune y alteraciones en los mecanismos fisiológicos necesarios para restaurar la homeostasis (**Figura 1**) (Van Der Poll *et al.*, 2017).

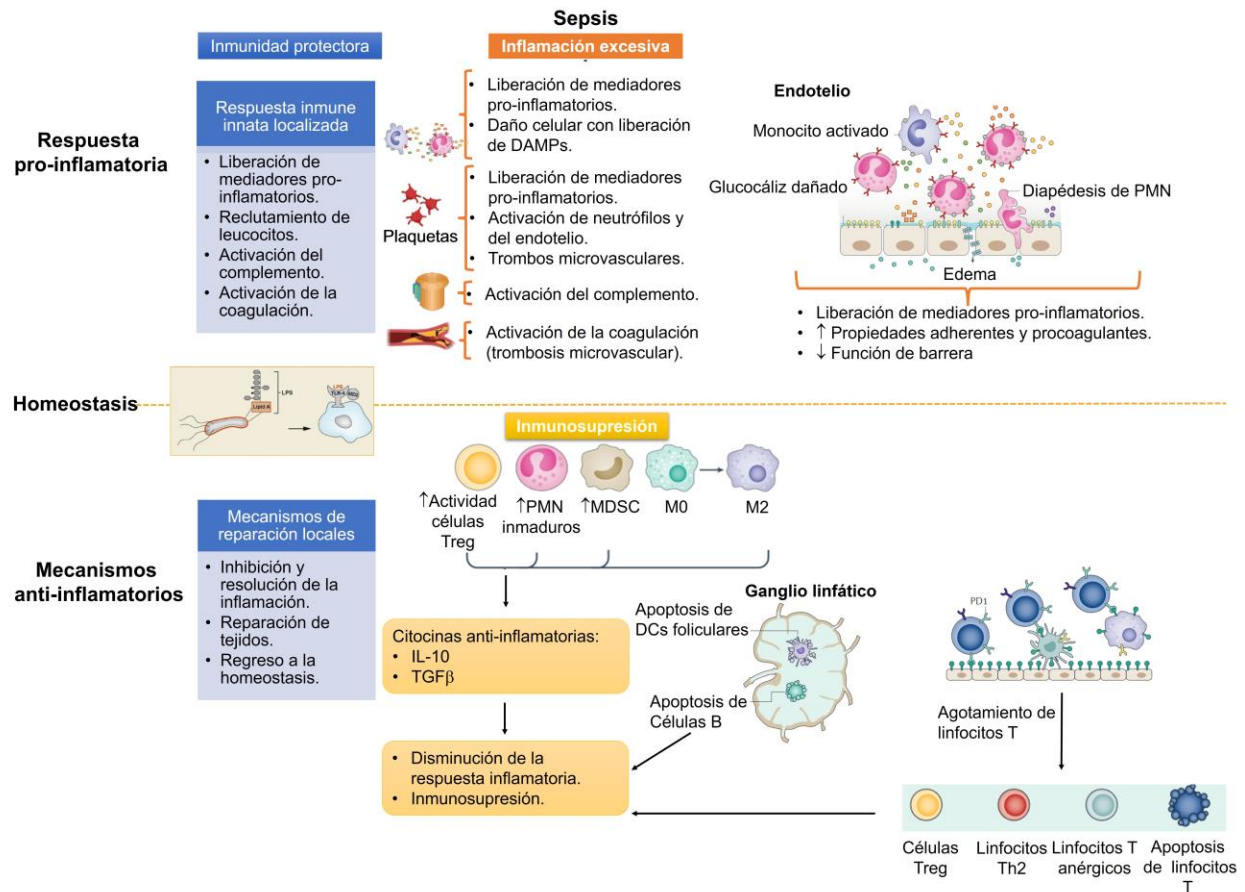


Figura 1. Respuesta del hospedero a la infección y durante la sepsis. El sistema inmune innato monta una respuesta balanceada y protectora contra el patógeno (izquierda arriba: inmunidad protectora). Esto resulta en la eliminación del patógeno seguido por un regreso a la homeostasis (izquierda abajo: mecanismos de reparación locales). Sin embargo, en algunos procesos infecciosos, persiste el patógeno a pesar de la activación de la respuesta inmune dando lugar a una respuesta desregulada y dañina para el huésped. La respuesta del hospedero durante la sepsis se caracteriza por inflamación excesiva (derecha arriba) e inmunosupresión (derecha abajo). DAMPs: patrones moleculares asociados a daño; PMN: leucocitos polimorfonucleares; MDSC: células supresoras de origen mieloide; Treg; células T reguladoras; PD1: proteína de muerte programada 1.

3.2.1 Inflamación sostenida

3.2.1.1 Inicio de la inflamación en respuesta a los LPS

En las infecciones bacterianas, componentes de la pared celular, como los LPS en las bacterias Gram-negativas y ácidos teicoicos en bacterias Gram-positivas, son los principales activadores de la respuesta inmune del hospedero (Golucci *et al.*, 2018). Los LPS fueron descritos a finales del siglo XIX por Richard Pfeiffer como sustancias tóxicas estables al calor, denominándose

endotoxinas por su presencia en el interior de *Vibrio cholerae* y para diferenciarlas de las exotoxinas ya conocidas (Beutler & Rietschel, 2003). Los LPS son el principal componente de la membrana externa de las bacterias Gram-negativas; sus células blanco primarias son las células fagocíticas del sistema inmune, incluyendo macrófagos tisulares, monocitos periféricos, neutrófilos y células dendríticas (Mazgaeen & Gurung, 2020). De esta manera, la respuesta desregulada del hospedero a la infección inicia a nivel del sistema inmune innato y está directamente asociada al reconocimiento de componentes de la pared celular bacteriana como lo son los LPS.

Los agentes patógenos Gram-negativos presentes en el sitio de infección son la principal fuente de endotoxina en pacientes con sepsis o choque séptico. Otra causa de endotoxemia consiste en la translocación de bacterias Gram-negativas o solo de LPS a través de la barrera mucosa intestinal a ganglios linfáticos y órganos distantes (Adamik *et al.*, 2015). La estructura de los LPS es heterogénea, pero de manera general consiste en tres elementos: (1) el lípido A, que es una región hidrofóbica embebida en la membrana externa, (2) el núcleo compuesto de oligosacáridos y (3) el antígeno O que consiste en subunidades repetitivas de diversos azúcares (Wang & Quinn, 2010) (**Figura 2**). El lípido A es responsable de los efectos tóxicos de los LPS y corresponde a la región más conservada en los LPS de la familia *Enterobacteriaceae*. En *E. coli*, el lípido A consiste en un disacárido de *N*-acetilglucosamina, fosforilado en las posiciones 1 y 4', con cuatro residuos acilo en las posiciones 2, 3 y 2', 3'. A su vez, el carbono 3 de los grupos acilo presentes en los carbonos 2' y 3' están sustituidos por ácido láurico o mirístico, respectivamente, lo que da lugar a un lípido A hexacilado (Holst & Molinaro, 2010; Wang & Quinn, 2010) (**Figura 2**).

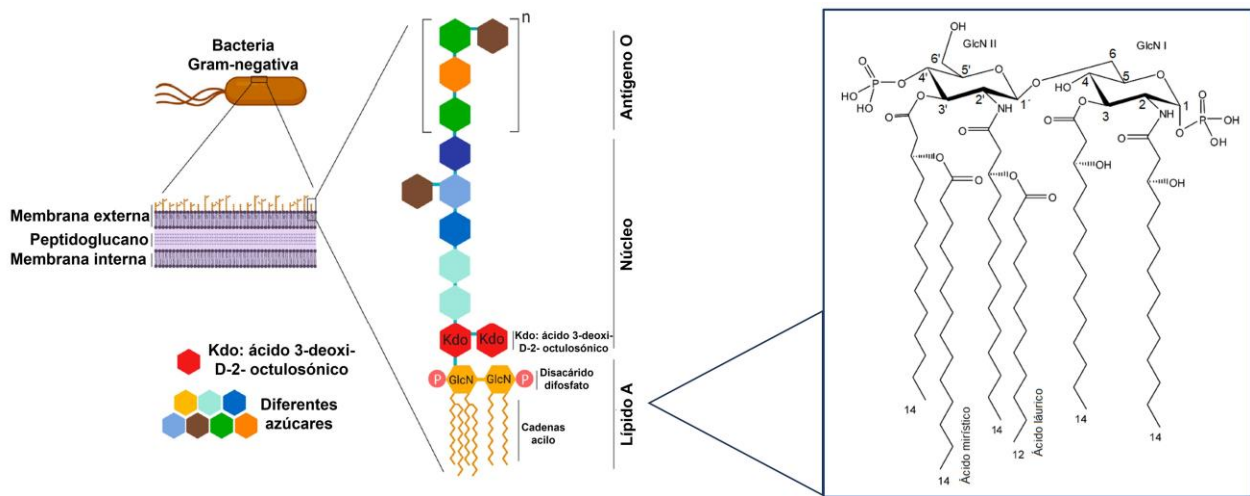


Figura 2. Estructura de los LPS. Representación esquemática de la estructura de la membrana externa de las bacterias Gram-negativas, en donde se encuentran los LPS, cuyos componentes son: el antígeno

O, un núcleo y el lípido A. El número de cadenas acilo secundarias en el lípido A determina la actividad endotóxica de los LPS. Imagen modificada de Mazgaeen & Gurung, 2020.

Los LPS presentes en las bacterias Gram-negativas, además de ser elementos estructurales, proporcionan integridad funcional a la bacteria (Adamik *et al.*, 2015). Sin embargo, durante la proliferación o lisis bacteriana son expuestos al contacto con células del sistema inmune. En el reconocimiento de los LPS por las células del sistema inmune participan la proteína LBP, así como las moléculas: “Clúster” de diferenciación 14 (CD14), antígeno 96 de linfocitos (MD-2, por sus siglas en inglés) y el receptor tipo Toll 4 (TLR4, por sus siglas en inglés). Los agregados de LPS son disociados por LBP y transferidos a CD14 para la activación del sistema inmune, o bien a lipoproteínas para su posterior detoxificación. La transferencia de los monómeros de LPS de CD14 a la molécula accesoria MD-2 ocasiona la dimerización de dos complejos TLR4-MD-2 (Meng J *et al.*, 2010), lo que activa a la proteína adaptadora que contiene un dominio TIR (TIRAP) y a la molécula adaptadora relacionada con TRIF (TRAM). Posteriormente, TIRAP media la formación de un complejo de señalización denominado midsosoma entre la proteína MyD88 con proteínas cinasas de la familia de cinasas asociadas al receptor de IL-1 (IRAK) (Balka & Nardo, 2019), en tanto que TRAM promueve la señalización a través del dominio TIR que contiene a la proteína adaptadora que induce interferón (TRIF) (Rosadini & Kagan, 2017). Por una parte, el midsosoma conduce a la translocación nuclear de los factores de transcripción NF- κ B y AP-1. Lo que resulta en la activación de genes proinflamatorios y respuestas celulares que incluyen autofagia, fagocitosis y producción de especies reactivas de oxígeno (Pérez-Hernández *et al.*, 2021). Mientras que por la vía TRAM-TRIF, la internalización en endosomas del complejo TLR4/MD-2/LPS, mediada por CD14, produce Interferones tipo I dependientes del factor de transcripción IRF3 (Tan & Kagan, 2014) (**Figura 3**). De esta forma, TLR4 es un mediador central de la respuesta inmune innata y adaptativa a los LPS, lo que le confiere un papel protector al controlar las infecciones bacterianas (Tan & Kagan, 2014; Kim, 2020). Sin embargo, durante un proceso infeccioso persistente, la activación exacerbada de TLR4 promueve una respuesta inflamatoria desregulada (Rosadini & Kagan, 2017).

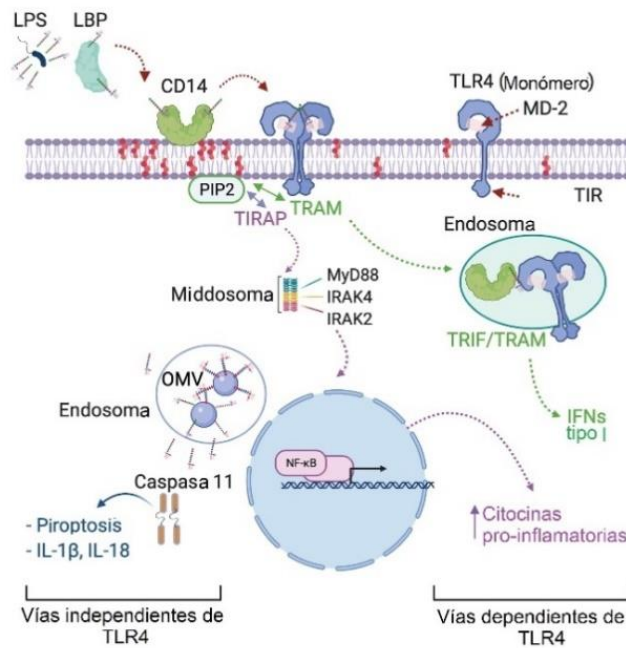


Figura 3. Diagrama esquemático de la vía de señalización de LPS/TLR4 y sus efectos. La cascada de eventos celulares mediada a través de la señalización del LPS por TLR4 inicia con la interacción de LPS con LBP y CD14, facilitando la transferencia de LPS monomérico al complejo TLR4-MD-2 en la membrana plasmática y la dimerización de TLR4-MD-2-LPS. Los adaptadores TIRAP y TRAM producen la formación del middosoma o la señalización a través de TRIF, resultando en la producción de citocinas pro-inflamatorias e interferones (IFNs) tipo I, respectivamente. Se ha descrito un mecanismo alternativo mediado por la caspasa 11, en el que vesículas de la membrana externa (OMV) producidas por las bacterias Gram-negativas, son endocitadas, llevando LPS al citosol de la célula, lo que produce IL-1 β , IL-8 y piroptosis. Imagen modificada de Pérez-Hernández *et al.*, 2021.

3.2.1.2 El papel de los LPS en la fisiopatología de la sepsis

3.2.1.2.1 Activación del complemento

Los procesos característicos de la respuesta inflamatoria ante la presencia de LPS en sepsis incluyen la activación del sistema del complemento, el sistema de coagulación y del endotelio vascular, cuyas funciones están interconectadas (**Figura 4**). Los patógenos que invaden los tejidos y se diseminan por el torrente sanguíneo se encuentran con el sistema del complemento, que es parte humoral del sistema inmune innato y que consiste en aproximadamente 30 proteínas séricas. El LPS activa el sistema del complemento a través de la vía alterna y la vía de las lectinas (Ward, 2004), generando reacciones de proteasas de serina en cascada que escinden proteínas del complemento para la formación de complejo de ataque a la membrana que crea un poro en la membrana externa de las bacterias Gram-negativas. A través de este poro, los metabolitos y las proteínas pequeñas pueden difundir libremente,

resultando en la lisis de la bacteria (de Bont *et al.*, 2018). La activación del complemento también resulta en la opsonización de bacterias Gram-negativas y en la liberación de las proteínas C3a y C5a, conocidas como anafilotoxinas, que tienen efectos pro-inflamatorios que incluyen el reclutamiento y activación de leucocitos, células endoteliales (ECs, por sus siglas en inglés) y plaquetas (Krukonis & Thomson, 2020). Si la activación del complemento no es controlada, éste contribuye a la progresión de la sepsis a través de alteraciones en la actividad de los neutrófilos (Mollnes & Huber-Lang, 2020), e incluso activando una respuesta trombo-inflamatoria que conduce a daño orgánico (Mannes *et al.*, 2021).

3.2.1.2.2 Activación de las células endoteliales y coagulación

La activación del endotelio contribuye a la eliminación de algún agente patógeno, al aumentar la producción de moléculas de adhesión que favorecen la migración de las células inmunes y plaquetas al sitio de infección. Las uniones tipo Gap entre las ECs se separan, permitiendo el ingreso de leucocitos y plasma (el cual contiene factores del complemento y nutrientes) a través de la pared de los vasos sanguíneos y hacia los tejidos infectados (Arina & Singer, 2020). En sepsis, la inflamación desregulada aumenta este proceso generando incompetencia de la barrera endotelial y perfusión microvascular reducida (Lelubre & Vincent, 2018). Las ECs responden ante los LPS, puesto que expresan TLR4, causando la producción de citocinas proinflamatorias y quimiocinas que amplifican la respuesta inmune al reclutar un mayor número de células (**Figura 4**). Esta respuesta inflamatoria ante los LPS también se ve potenciada por el hecho de que en circunstancias especiales las ECs actúan como APCs expresando las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I y II (Delano & Ward, 2016).

Después del daño a los vasos, los mecanismos homeostáticos incluyen la agregación de plaquetas al tejido dañado, creando un tapón plaquetario. Este tapón es subsecuentemente reforzado por la cascada de coagulación en un proceso conocido como homeostasis secundaria, el cual implica la formación de una red de fibrina. El coágulo de plaquetas-fibrina forma el trombo que sella los vasos sanguíneos para prevenir la pérdida de sangre e infecciones oportunistas. De manera similar al sistema del complemento, la cascada de coagulación consiste en múltiples proteasas de serina, las cuales inician la formación de fibras de fibrina (Mannes *et al.*, 2021). La cascada de coagulación puede iniciar por dos vías distintas que conducen a la conversión de protrombina en trombina. La vía extrínseca es activada por la exposición del factor tisular, una proteína que es normalmente expresada en las células que no están en contacto directo con el flujo sanguíneo. Por otro lado, en la vía intrínseca el iniciador

es el factor FXII, una proteína que se activa al unirse a moléculas cargadas negativamente como los LPS presentes en las membranas bacterianas (de Bont *et al.*, 2018).

Durante el proceso de sepsis existe una fuerte activación del sistema de coagulación, resultando en coagulación intravascular diseminada, lo que se asocia clínicamente con trombosis microvascular y hemorragia; esta última debido al consumo de factores de coagulación y plaquetas (**Figura 4**). La etiología de la desregulación de la coagulación en sepsis es multifactorial. El factor tisular, liberado de ECs dañadas, monocitos y células polimorfonucleares, es el principal activador de la coagulación en sepsis. Además, el proceso de trombosis durante la sepsis es aumentado por la actividad comprometida de las principales vías anticoagulantes (Van Der Poll *et al.*, 2017; de Bont *et al.*, 2018).

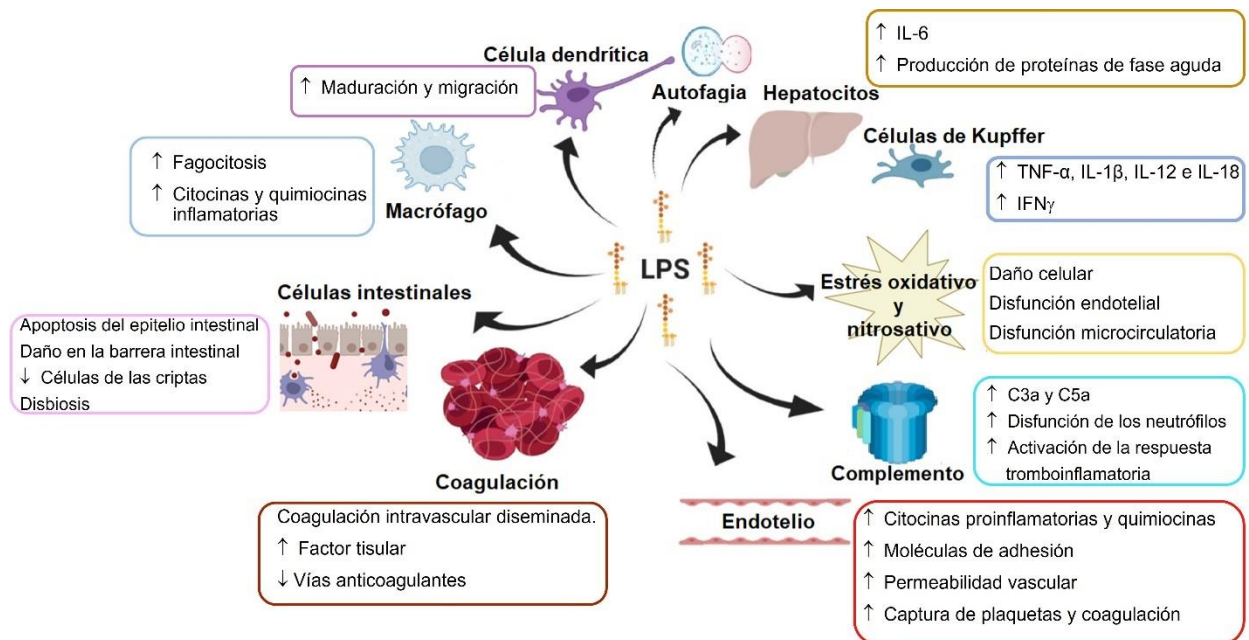


Figura 4. Resumen de la respuesta sistémica ante la presencia de LPS. Los LPS tienen efectos en distintos tipos celulares, iniciando con la activación de la respuesta inmune a través de la migración y maduración de las células dendríticas, la activación de macrófagos, la autofagia y el sistema del complemento. En el hígado, los LPS estimulan la producción de proteínas de fase aguda y de mediadores inflamatorios. La producción de especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno contribuye al estrés celular. Además, los LPS promueven la coagulación y el daño endotelial.

3.2.2 Inmunosupresión asociada a sepsis

Evidencias recientes han demostrado que tanto la respuesta pro-inflamatoria como la anti-inflamatoria ocurren temprana y simultáneamente en sepsis. Sin embargo, en general hay un predominio de la fase hiperinflamatoria inicial, la cual depende de numerosos factores

incluyendo las comorbilidades preexistentes, el estado nutricional, la carga de microorganismos y los factores de virulencia (Hotchkiss *et al.*, 2013). Por otro lado, el estado de inmunosupresión puede persistir por meses o aún por más tiempo desde el inicio de la sepsis (Gao *et al.*, 2022). Los numerosos mecanismos de inmunosupresión incluyen a la respuesta inmune innata y a la adaptativa, siendo característico de la sepsis el aumento en la apoptosis de los linfocitos T y B, así como de las células dendríticas (**Figura 1**). La apoptosis de las células inmunes se lleva a cabo en órganos linfoides y en tejidos linfoides asociados a mucosas, lo cual es relevante a nivel intestinal pues un menor número de células inmunes en la lámina propia facilita la translocación de bacterias a la circulación (Hotchkiss *et al.*, 2013).

Además de la disminución de células inmunes, la captura de los cuerpos apoptóticos por monocitos, macrófagos y células dendríticas resulta en tolerancia inmune al inducir anergia y una respuesta Th2 con un aumento en la liberación de IL-10 (Hotchkiss *et al.*, 2013); lo que produce una incapacidad de los macrófagos en eliminar a los organismos patógenos restantes. Mientras que alteraciones en la función de APCs, tales como una disminución en la concentración del antígeno leucocitario humano isotipo DR (HLA-DR), defectos en la producción de citocinas y el desarrollo de tolerancia a endotoxina, reducen su capacidad para estimular a los linfocitos T (Delano & Ward, 2016).

Aunque el sistema inmune innato predomina en el estadio temprano de sepsis, las Treg actúan como un vínculo entre el sistema inmune innato y adaptativo. Estas células, contribuyen a la inmunoparálisis (estado de inmunosupresión prolongado inducido por sepsis), eventualmente al síndrome de disfunción orgánica múltiple y, en última instancia, a la muerte del paciente. Posteriormente, la duración prolongada del estado séptico, que se caracteriza por una carga alta de antígeno y niveles aumentados de citocinas pro- y anti-inflamatorias, conduce al agotamiento de las células T (**Figura 1**) (Gao *et al.*, 2022).

A pesar del debate sobre si la respuesta inflamatoria desregulada o la inmunosupresión son la causa de la muerte en pacientes con sepsis, es claro que en un proceso séptico prolongado hay inmunosupresión sistémica. Esta inmunosupresión dificulta la erradicación de infecciones primarias y, a su vez, aumenta la susceptibilidad a adquirir infecciones secundarias letales (Delano & Ward, 2016). Aproximadamente del 60 al 70 % de las muertes por sepsis ocurren en un estado tardío y están asociadas a complicaciones adquiridas en la UCI (Hotchkiss & Opal, 2020). Además, se demostró que los que los pacientes que sobreviven a la sepsis sufren infecciones subsecuentes después de que el episodio séptico inicial se ha resuelto. Ello ha aumentado el número de readmisiones a la UCI debido a complicaciones por infección, lo que

es un reflejo de la supresión inmune, que si no es tratada disminuye la calidad de vida del paciente (Delano & Ward, 2016).

3.2.3 Disfunción orgánica inducida por sepsis

La comprensión completa de los mecanismos precisos que subyacen al daño celular y la falla orgánica en la sepsis aún es limitada. Sin embargo, el desarrollo de disfunción orgánica es el evento clínico directamente relacionado con la mortalidad y morbilidad del paciente (Pool *et al.*, 2018). La alteración en el flujo sanguíneo microvascular y en la entrega de oxígeno son complicaciones serias y comunes en los pacientes con sepsis. La alteración en el flujo sanguíneo capilar se observa durante la sepsis debido a la presencia de hipotensión sistémica y obstrucción microvascular ocasionada por la adhesión de los leucocitos al endotelio y por la activación localizada de la cascada de coagulación. Los leucocitos activados, particularmente los neutrófilos, pueden mediar el daño endotelial causando fuga capilar y activación de vías de coagulación. Las fugas capilares pueden dar lugar a la acumulación de edema tisular contribuyendo a la disfunción orgánica debido a la alteración de las funciones celulares (Guo *et al.*, 2018).

El óxido nítrico contribuye a la disfunción microcirculatoria y durante un proceso de sepsis se ha reconocido un incremento global en su producción (**Figura 4**) (Pool *et al.*, 2018). La activación descontrolada del complemento también contribuye al daño de distintos órganos vitales a través de la activación de cascadas intravasculares, que como se mencionó previamente culmina en la formación de microtrombos. Estos, en conjunto con los cambios hemodinámicos, resultan en hipoperfusión y en una glucólisis anaerobia aumentada con la acumulación de ácido láctico (Gyawali *et al.*, 2019). Además, las especies reactivas de oxígeno producidas por la respuesta inflamatoria producen disfunción mitocondrial y una disminución en los niveles de ATP, causando daño a nivel celular (**Figura 5**) (Pool *et al.*, 2018).

Los procesos previamente descritos tienen importantes efectos sistémicos. A nivel pulmonar, hay una alteración de la barrera endotelio-alveolar con la acumulación de fluido rico en proteínas en el espacio intersticial pulmonar y en los alveolos. Esto puede alterar la relación ventilación-perfusión, generar hipoxia y reducir la distensibilidad pulmonar, dando lugar al síndrome de dificultad respiratoria aguda en casos extremos (**Figura 5**) (Gyawali *et al.*, 2019). Por su parte, en los riñones, la combinación de la perfusión renal reducida, necrosis tubular aguda, más defectos sutiles en la microvasculatura y en los túbulos, producen distintos grados de daño renal agudo (Pool *et al.*, 2018; Gyawali *et al.*, 2019).

El hígado, es un órgano que participa activamente en la respuesta inflamatoria a los LPS en sepsis. En los hepatocitos, los LPS y el TNF- α estimulan la secreción de IL-6, la cual induce la síntesis de proteínas de fase aguda, tal como lo son la proteína C reactiva (PCR), el fibrinógeno, la protrombina, la alfa-1 antitripsina y la haptoglobina. Los LPS también estimulan la secreción de TNF- α , IL-1 β , IL-12 e IL-18 por las células de Kupffer (**Figura 4**). La liberación prolongada de IL-18 es de especial interés, ya que contribuye al daño hepático observado en los pacientes con sepsis, al promover la secreción de IFN- γ que induce tanto la apoptosis de los hepatocitos, como un incremento en la concentración de TNF- α y de CD14 (Woznica *et al.*, 2018; Pérez-Hernández *et al.*, 2021). Esta respuesta inflamatoria exacerbada a lo largo del tiempo compromete la función hepática y la recuperación del paciente. También, hay una disminución en la síntesis de proteínas y una transformación alterada de toxinas exógenas y endógenas (Pool *et al.*, 2018), presentándose una supresión en la eliminación de la bilirrubina que da lugar a colestasis (**Figura 5**) (Gyawali *et al.*, 2019).

Las alteraciones mentales son comunes en los pacientes con sepsis indicando disfunción del sistema nervioso central. Los cambios en el endotelio descritos anteriormente dañan la barrera hemato-encefálica, provocando la entrada de toxinas, células inflamatorias y citocinas. Los cambios siguientes al edema cerebral, las modificaciones en neurotransmisores, el estrés oxidativo y el daño a la materia blanca dan lugar a un espectro clínico de encefalopatía en sepsis que varía de confusión moderada a delirio y coma (Gyawali *et al.*, 2019) (**Figura 5**). El intestino y el bazo son órganos en los que se ha descrito mayor muerte celular en sepsis. El aumento en la apoptosis del epitelio intestinal y la proliferación disminuida de células de las criptas, altera su función de barrera (**Figura 4**) (Pool *et al.*, 2018). Por lo que el aumento de la permeabilidad intestinal permite la traslocación de bacterias y la autodigestión por enzimas luminales (Gyawali *et al.*, 2019; Pérez-Hernández *et al.*, 2021).

Durante la sepsis también se producen cambios metabólicos que se caracterizan por un predominio del estado catabólico. Hay una degradación rápida y significativa del músculo que libera aminoácidos para la gluconeogénesis que podría proporcionar energía a las células inmunes. Además, se observa resistencia a la insulina que genera un estado de hiperglucemia (Gyawali *et al.*, 2019).

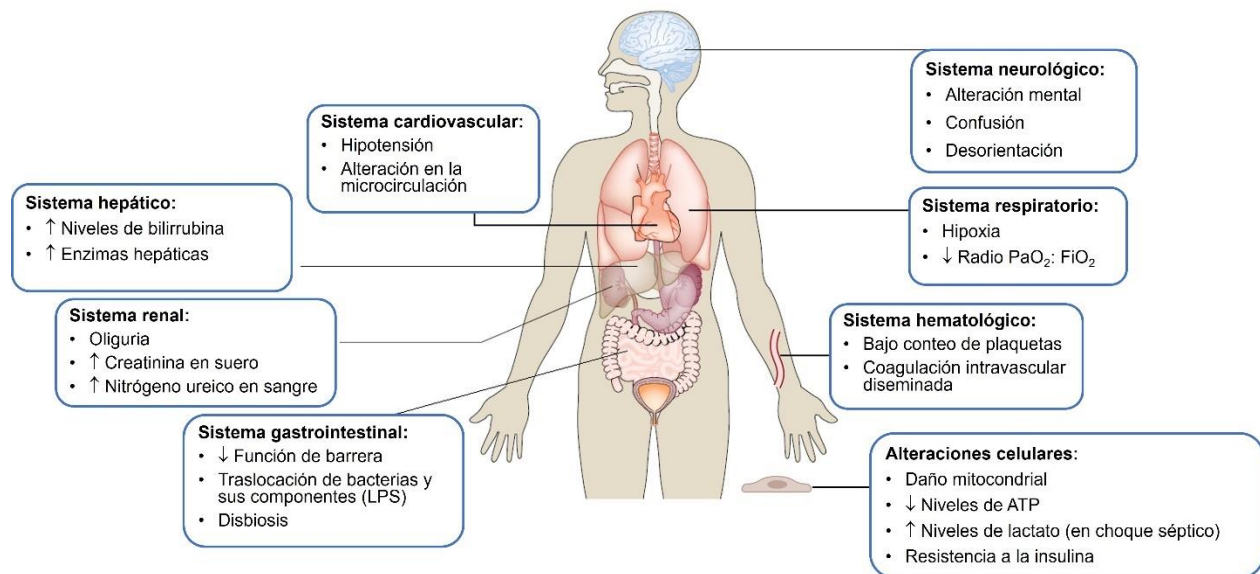


Figura 5. Principales sistemas orgánicos que sufren daño durante la sepsis. Aunque la pérdida de función durante la sepsis puede ocurrir en cualquier órgano, las alteraciones que ocurren en los sistemas gastrointestinal, cardiovascular, respiratorio, renal, neurológico, hematológico y hepático tienen consecuencias severas. Por lo que en la clínica se suelen monitorear algunos de los signos característicos de disfunción indicados en los recuadros.

3.3 Proteínas de unión a lipopolisacáridos

Los LPS presentes en la circulación del paciente con sepsis pueden provenir de la lisis bacteriana producida por la administración de antibióticos, la proliferación bacteriana, o bien de la traslocación de bacterias a través de la barrera intestinal dañada (Adamik *et al.*, 2015). En la circulación, estos LPS son transportados mediante complejos LPS-proteína y LPS-lipoproteínas. En el humano y otros mamíferos se ha descrito una familia de proteínas que interactúa con lípidos, la cual incluye a: la proteína aumentadora de la permeabilidad y bactericida (BPI, por sus siglas en inglés), la proteína de unión a LPS (LBP, por sus siglas en inglés), la proteína de transferencia de ésteres de colesterol (CETP, por sus siglas en inglés), la proteína de transferencia de fosfolípidos (PLTP, por sus siglas en inglés) y la isoforma de CETP (CETPI). Así, las proteínas BPI, LBP y CETPI desempeñan un papel crucial en la respuesta inmune innata contra las infecciones bacterianas y modulan la cascada inflamatoria activada por los LPS (Theprungsirikul *et al.*, 2021; Luna-Reyes *et al.*, 2021). En cambio, CETP y PLTP intervienen en el transporte de lípidos en el torrente sanguíneo entre lipoproteínas de alta densidad y lipoproteínas que contienen apolipoproteína B, participando en la patogénesis de la aterosclerosis (Beamer, 2003; von Eckardstein *et al.*, 2023).

Las proteínas LBP, CETP y PLTP son principalmente sintetizadas por el hígado y se encuentran en el torrente sanguíneo (Gutsmann *et al.*, 2001; Blauw *et al.*, 2020). La CETPI también está presente en sangre, siendo producida por células intestinales (Alonso *et al.*, 2003), en tanto que BPI es abundante en los gránulos primarios de neutrófilos (Theprungsirikul *et al.*, 2021). La similitud estructural de estas proteínas que interactúan con lípidos es alta a pesar de tener una baja similitud en su secuencia de aminoácidos (Schumann *et al.*, 1990). En este sentido, se ha reportado que dichas proteínas tienen forma de búmeran con los dominios amino y carboxilo estructuralmente similares conectados por una hoja beta central. La estructura cristalina de BPI (**Figura 6a**) ha mostrado que en la superficie cóncava de cada dominio se encuentran regiones apolares que podrían estar involucradas en unir LPS al incorporar dos o más cadenas acilo del lípido A. Mientras que el amino terminal con residuos cargados positivamente interactúa electrostáticamente con los azúcares fosforilados de los LPS (Beamer *et al.*, 1998). Esta interacción desestabiliza la integridad de la membrana bacteriana, lo que conduce a lisis y a la muerte. La porción carboxilo terminal de BPI está implicada en la unión de los LPS y en la opsonización, sin embargo, este proceso es menos entendido. Por lo que cuando los neutrófilos tienen contacto con la bacteria Gram-negativa se libera BPI para promover efectos bactericidas, fagocitosis, la captación de bacterias por los neutrófilos y células dendríticas, así como la neutralización de los efectos inflamatorios de los LPS (Theprungsirikul *et al.*, 2021).

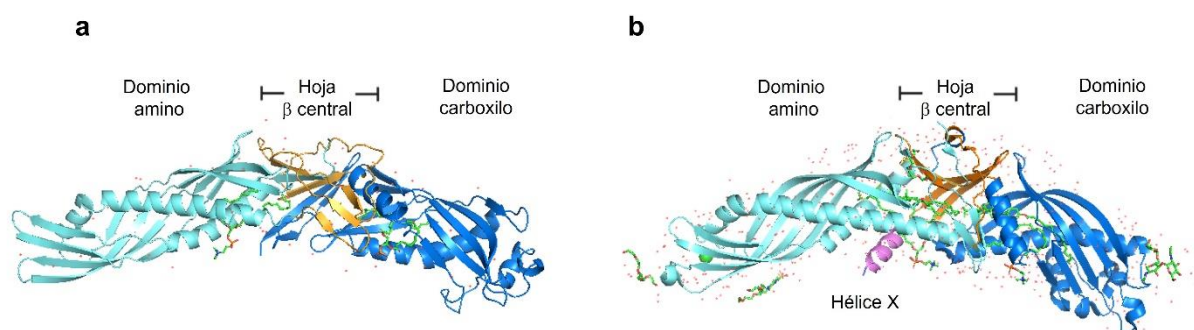


Figura 6. Diferencias estructurales entre proteínas de unión a lípidos y a LPS. **a** Diagrama de cinta de la estructura de BPI. El dominio amino se muestra en verde, el dominio carboxilo en azul y la hoja β central en naranja. **b** Diagrama de cinta de la estructura de CETP. El dominio amino se muestra en verde, el dominio carboxilo en azul, la hoja β central en naranja y la hélice X en rosa (Beamer *et al.*, 1998; Qiu *et al.*, 2007).

LBP es un polipéptido de 50 kDa que es secretado en el torrente sanguíneo como una glicoproteína de 58-60 kDa; se sintetiza principalmente en el hígado como una proteína de fase

aguda (Eckert *et al.*, 2013). Fisiológicamente, se encuentra presente en suero en concentraciones de 5 a 10 µg/mL, aumentando a más de 200 µg/mL 24 horas después de la inducción de una respuesta de fase aguda (Gutsmann *et al.*, 2001). LBP al igual que BPI, interacciona con el lípido A mediante su dominio amino terminal (Clark *et al.*, 2010). Sin embargo, LBP a diferencia de BPI, no tiene una actividad bactericida significativa. Por otro lado, tanto CETP como PLTP carecen de estos residuos cargados positivamente en su dominio amino, los cuales parecen ser importantes para unir LPS con alta afinidad.

LBP reconoce al LPS presente en las bacterias Gram-negativas, monomerizando los multímeros de LPS y favoreciendo por tanto su reconocimiento vía CD14 y el complejo receptor TLR4-MD-2, iniciando así la activación de macrófagos y neutrófilos. Esta transferencia de LPS a CD14 se lleva a cabo por la región C-terminal (Eckert *et al.*, 2013). La LBP tiene una función dual que depende de su concentración: bajas concentraciones de LBP potencian la activación de células mononucleares inducida por LPS, mientras que las concentraciones altas de LBP inhiben la estimulación celular por los LPS (Gutsmann *et al.*, 2001). Además, se ha descrito que LBP media la transferencia de los LPS a lipoproteínas de alta densidad (HDL, por sus siglas en inglés) y a lipoproteínas de baja y muy baja densidad (LDL y VLDL, respectivamente por sus siglas en inglés) favoreciendo así su detoxificación al transportarlos al hígado para su excreción en la bilis, limitando la inflamación (Vreugdenhil *et al.*, 2001; Murch *et al.*, 2007; Eckert *et al.*, 2013).

3.4 Proteína de transferencia de ésteres de colesterol e isoformas

CETP es un importante regulador del metabolismo de lipoproteínas, llevando a cabo la transferencia neta de ésteres de colesterol de las HDL a lipoproteínas que contienen apolipoproteína B (LDL y VLDL) a cambio de triglicéridos (Charles & Kane, 2012). Aunque parece una transferencia bidireccional, hallazgos clínicos y genéticos sugieren que CETP afecta predominantemente los niveles de HDL que las de LDL (Blauw *et al.*, 2020). En este sentido, la presencia de variantes del gen de CETP que resultan en una disminución en su concentración, aumentan los niveles de HDL, mientras que tienen un menor efecto en la disminución de la concentración de LDL (Thompson., 2008).

CETP es una glicoproteína hidrofóbica que es secretada principalmente por las células de Kupffer del hígado y se encuentra en plasma unida mayoritariamente a HDL (Kosmas *et al.*, 2016; Blauw *et al.*, 2020). En el humano, la CETP presente en plasma está constituida por 493 residuos, contiene cuatro glicosilaciones, en los residuos 88, 240, 341 y 396, y un 44 % de los

residuos son hidrofóbicos. La estructura cristalina de la CETP muestra una gran similitud con la de BPI, a pesar de tener solo el 22 % de similitud de secuencia de aminoácidos (**Figura 6b**). CETP tiene una forma de búmeran y dos dominios similares conectados por una secuencia de unión, por lo que su estructura puede dividirse en cuatro unidades estructurales: un dominio amino, un dominio carboxilo, una hoja β central entre los dos dominios y una extensión en el carboxilo terminal, que no está presente en BPI (**Figura 6b**) (Qiu *et al.*, 2007). Los últimos 23 aminoácidos de esta región carboxilo terminal se estructuran como una hélice- α anfipática (hélice X) que está involucrada en el transporte de lípidos y ésteres de colesterol (**Figura 6b**) (García-González *et al.*, 2014).

Se ha descrito una variante de CETP originada por corte y empalme alternativo que carece de 60 aminoácidos (234-293) codificados por el exón 9 (Inazu *et al.*, 1992). El nivel de expresión del ácido ribonucleico mensajero (mRNA, por sus siglas del inglés) de esta isoforma se modifica con la dieta y varía entre los tejidos, contribuyendo en algunos con más del 50 % del mRNA total de CETP (Inazu *et al.*, 1992). A diferencia de la CETP completa, esta isoforma es pobremente secretada encontrándose principalmente en el retículo endoplásmico, en donde a través de la unión intracelular con la CETP completa reduce su síntesis y evita su secreción al medio extracelular (Izem *et al.*, 2020). Además de esta isoforma, se han reportado variantes menos frecuentes originadas por corte y empalme alternativo y por polimorfismos de nucleótido único, que no son secretadas e inhiben la secreción de CETP (Boekholdt *et al.*, 2004; Genga *et al.*, 2018).

Una nueva isoforma de CETP denominada Isoforma de la Proteína de Transferencia de Ésteres de Colesterol (CETPI) se identificó en intestino delgado de conejo y se encuentra presente tanto en plasma de conejo como humano (Alonso *et al.*, 2003). El mRNA de esta isoforma es idéntico al de CETP hasta el nucleótido de la posición 1419, a partir del cual hay una inserción de 108 bases del intrón previo al exón 16, denominada Secuencia I (**Figura 7a**). Dentro de esta Secuencia I, hay dos codones de paro que evitan la traducción del exón 16, de manera que sólo 54 bases contenidas en el intrón forman parte del nuevo mRNA (**Figura 7b**).

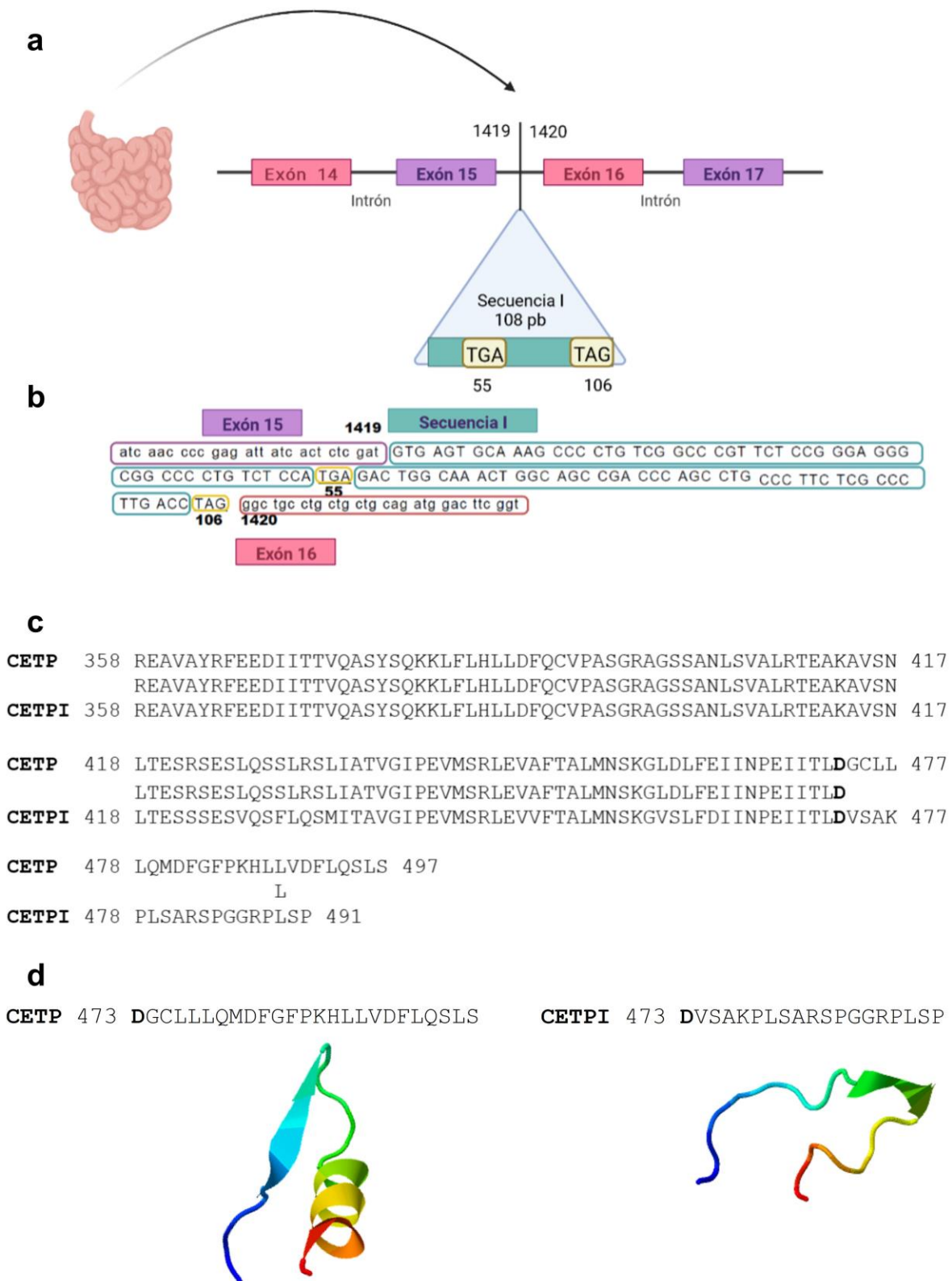


Figura 7. Representación de la secuencia de nucleótidos del mRNA de CETPI y estructura de su región carboxilo terminal en conejo. a Representación esquemática de la secuencia del mRNA distintiva de CETPI identificada en el epitelio intestinal. A diferencia del mRNA de CETP, el mRNA de CETPI incluye la Secuencia I de 108 pb presente entre los exones 15 y 16. **b** La Secuencia I es parte de

la región terminal del mRNA de CETPI. Dentro de la Secuencia I se encuentran dos codones de paro (recuadros amarillos), uno en la posición 55 (TGA) y el otro en la posición 106 (TAG), que evitan la traducción del exón 16. **c** Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de la región carboxilo terminal de las proteínas CETP y CETPI presentes en el conejo. **d** Comparación de la estructura secundaria del extremo carboxilo de CETP y de CETPI a partir del residuo ácido aspártico (D) 473.

Al realizar el alineamiento de las secuencias de aminoácidos de la región carboxilo terminal de CETP y CETPI presentes en el conejo (**Figura 7c**) se observa que ambas secuencias son idénticas hasta el residuo D473, que es el último aminoácido codificado por el exón 15. A partir de este punto, la similitud de secuencias de aminoácidos de ambas proteínas es nula. En CETPI, la extensión de 24 residuos del dominio carboxilo terminal de CETP, que contribuye a la transferencia de ésteres de colesterol entre lipoproteínas, se sustituye por una secuencia de 18 residuos. Debido a estas diferencias, en el carboxilo terminal de CETPI se observa la presencia de una estructura aleatoria o en inglés “random coil”, en lugar de la α -hélice anfipática presente en el carboxilo terminal de CETP (**Figura 7d**), y como resultado CETPI pierde la capacidad de unir ésteres de colesterol (Alonso *et al.*, 2003; García-González *et al.*, 2015).

En el humano, el intrón “O” localizado entre los exones 15 y 16 tiene un tamaño de 180 pb y tiene un 87 % de similitud con 20 nucleótidos de la Secuencia I. El mRNA de CETPI se genera por un mecanismo de edición y empalme alternativo, en la cual no se encuentran de la base 6 a la 96 del intrón “O”. El codón de terminación se encuentra en la posición 1573 del exón 16, por lo que CETPI tiene 16 aminoácidos adicionales en comparación con CETP (**Figura 8a**) y presenta una masa molecular de 56 kDa, sin considerar las modificaciones postraduccionales. Al igual que CETPI de conejo, en el humano la extensión del dominio carboxilo terminal de CETPI presenta una estructura “random coil”, distinta a lo observado con CETP (**Figura 8b, c**), como se mencionó previamente.

Es relevante notar que la región terminal del dominio carboxilo de CETPI de ambas especies comparten la estructura “random coil”, contienen residuos de prolina en su secuencia de aminoácidos, así como residuos con carga positiva (lisina y arginina). Estas nuevas características presentes en el carboxilo terminal de CETPI, así como la homología estructural con las proteínas de unión a LPS, sugirieron que podría ser una proteína involucrada en la respuesta a LPS a nivel sistémico e intestinal.

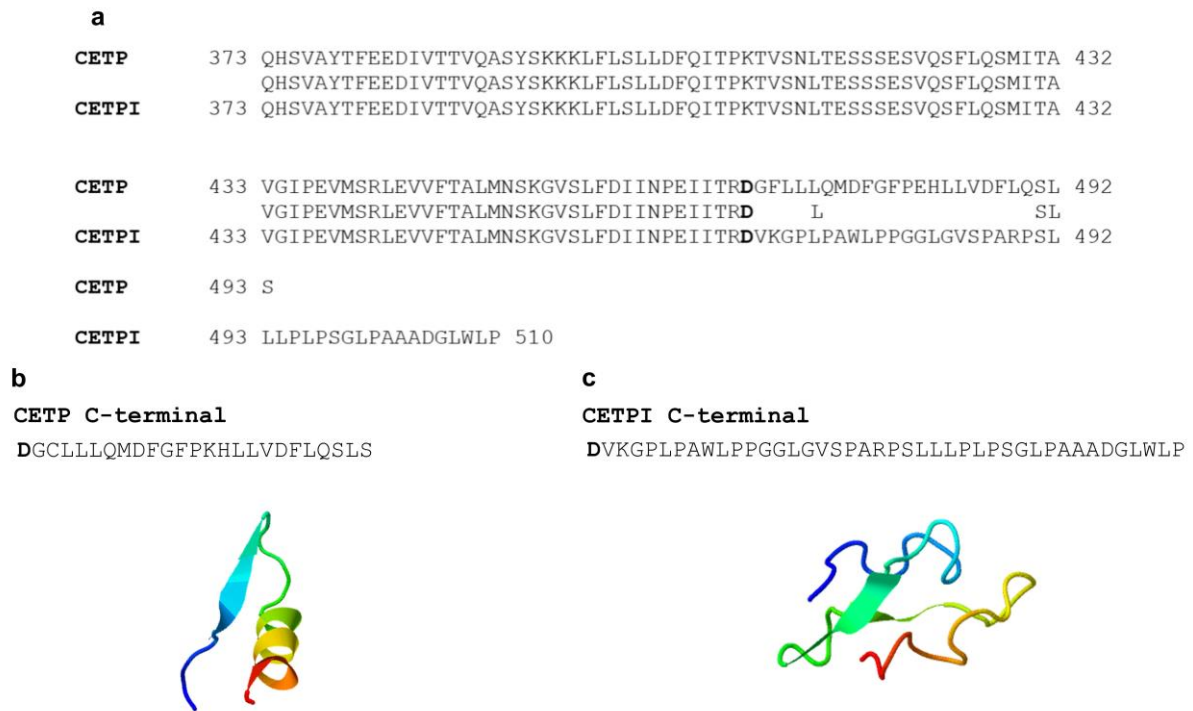


Figura 8. Diferencias en la región del carboxilo terminal de CETP Y CETPI en el humano. a Alineamiento de las secuencias de la región del carboxilo terminal de CETP y CETPI. **b** Estructura secundaria de la región carboxilo terminal de CETP y **c** CETPI.

4. ANTECEDENTES

4.1 Isoforma de la proteína de transferencia de ésteres de colesterol y mecanismos que disminuyen los efectos de los LPS en sepsis

A través del análisis de las propiedades fisicoquímicas de péptidos sintéticos derivados del carboxilo terminal de CETPI, se reportó que los péptidos correspondientes a los últimos 11 y 18 residuos, denominados ARS (ARSPGGRPLSP) y VSAK (VSAKPLSARSPGGRPLSP), respectivamente, presentan una carga electrostática neta positiva. La interacción de los LPS con los péptidos sintéticos ARS y VSAK se estudió empleando geles nativos de gradiente de poliacrilamida. En las muestras que solo contenían LPS se apreció un patrón de barrido en el corrimiento electroforético por el alto contenido de polisacáridos que son retenidos en el gel. Cuando los péptidos ARS o VSAK se resolvieron en el gel no se observó dicho patrón de barrido, mientras que cuando los LPS y los péptidos se incubaron juntos se visualizó un patrón de migración más amplio (**Figura 9a**). Al analizar la interacción LPS-péptido (ARS o VSAK) por inmunotransferencia usando el anticuerpo anti-CETPI, que reconoce al dominio C-terminal de CETPI, se observó señal únicamente en los carriles donde se incubaron los LPS con los péptidos (**Figura 9b**). Estos hallazgos sugieren que los péptidos ARS y VSAK pueden interactuar con los LPS manteniéndose en la matriz de poliacrilamida. Además, mediante ensayos complementarios de cosedimentación lipido/ péptido y espectroscopía del enlace peptídico, se detectó la presencia del péptido VSAK exclusivamente en las muestras incubadas con los LPS (García-González *et al.*, 2015).

La especificidad de la unión de los péptidos ARS y VSAK con los LPS se evaluó utilizando como controles péptidos derivados del dominio carboxilo terminal de CETP, el péptido hélice- X (EHLLVDFLQSL) (**Figura 8**) y la hélice- Z que contiene la mutación D₄₇₀N (EHLLVNFLQSL). Al realizar la inmunotransferencia no se detectó ninguna señal en las muestras de los LPS incubadas con la hélice X o la hélice- Z. Esto contrasta, con lo observado al emplear los péptidos ARS y VSAK, donde se observó claramente el patrón de barrido, que consistentemente fue más intenso al usar el péptido VSAK (**Figura 9c**). El péptido VSAK interactúa con los serotipos O111:B4, O26:B6 y O55:B5 de *E.coli* (**Figura 9d**), y su interacción con los LPS se caracterizó a través de ensayos por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA, por sus siglas en inglés) y a través del uso de LPS acoplados al fluorocromo borodipirrometeno, BODIPY, por sus siglas en inglés (García-González *et al.*, 2015). Asimismo, empleando microscopia electrónica de transmisión, se observó que las fibras de LPS (4.0 mg/mL) en

presencia de VSAK (0.5 mg/mL) se disgregan, formando complejos más electrodensos (**Figura 9e, f**).

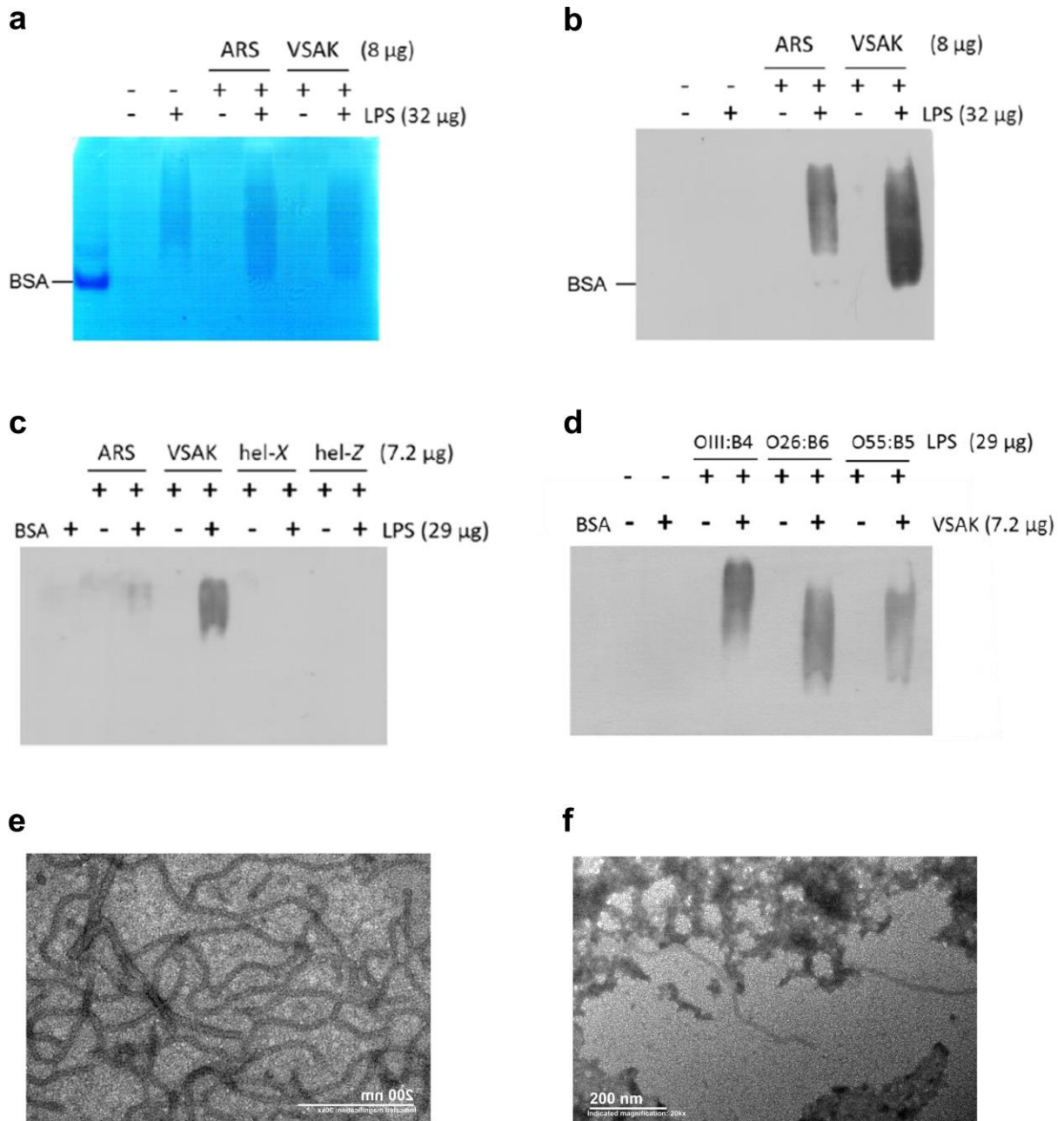


Figura 9. Interacción de péptidos derivados del extremo carboxilo de CETPI con LPS. a Gel nativo de gradiente de poliacrilamida (0.8 – 25 %) teñido con azul de Coomassie que muestra la interacción entre los péptidos ARS y VSAK (8 µg) con los LPS (32 µg). **b** Inmunotransferencia del gel mostrado en a, empleando el anticuerpo anti- CETPI. **c** Inmunotransferencia que muestra la interacción de los péptidos ARS, VSAK y de los péptidos no relacionados derivados del carboxilo terminal de CETP (hel-X, hel-Z) (8

µg) con los LPS (29 µg). **d** Interacción del péptido VSAK con LPS provenientes de los serotipos O111:B4, O26:B6 y O55:B5 de *E. coli*. **e** Imagen de microscopía electrónica de transmisión de LPS (4.0 mg/mL) y **f** de los LPS con VSAK (0.5 mg/mL).

Por otra parte, se demostró que la interacción del péptido VSAK con los LPS es mediada por interacciones electrostáticas y a través de ensayos de inmunotransferencia, se reportó que la defosforilación de los LPS, empleando la enzima fosfatasa alcalina, disminuye su unión con VSAK. Por lo que se sugiere que la interacción VSAK-LPS se asocia con la neutralización de las cargas electrostáticas negativas en los grupos fosfatos de los LPS (García-González *et al.*, 2015).

En un modelo *in vitro*, se demostró que el péptido VSAK protege a los macrófagos de la citotoxicidad inducida por los LPS, mediante el bloqueo de la interacción de estos con la superficie celular. Así, se redujo la internalización de los LPS y los efectos asociados al estrés oxidativo inducido por la respuesta celular a los LPS. Además, la estimulación de las células derivadas de colon e intestino, con concentraciones crecientes de LPS aumentó la concentración de CETPI (García-González *et al.*, 2015).

Experimentos *in vivo* realizados en nuestro laboratorio mostraron que la administración intravenosa del péptido VSAK (60 µg/kg) tras 10 minutos previos a la estimulación sistémica con LPS (0.3 µg/kg) a conejos Nueva Zelanda, previno el aumento de la temperatura corporal, redujo los niveles de la citocina proinflamatoria TNF-α y permitió la sobrevivencia de los animales, en comparación con el grupo control al cual solo se le administró LPS (García-González *et al.*, 2015).

Por otro lado, utilizando un modelo de síndrome de respuesta inflamatoria sistémica en conejos enanos y empleando tomografía de emisión de positrones, se observó que la administración simultánea de VSAK (60 µg/kg) y LPS (0.3 µg/kg) reduce los efectos deletéreos de los LPS. Entre estos efectos se encuentran una disminución en los niveles de insulina y glucosa, que previene una condición similar a resistencia a la insulina, una disminución en la producción de moléculas inflamatorias (TNF-α, IL-1α, IL-1β, MIP-1β e IL-8) y una mejoría en la condición general de los animales (**Figura 9**) (Luna-Reyes *et al.*, 2021).

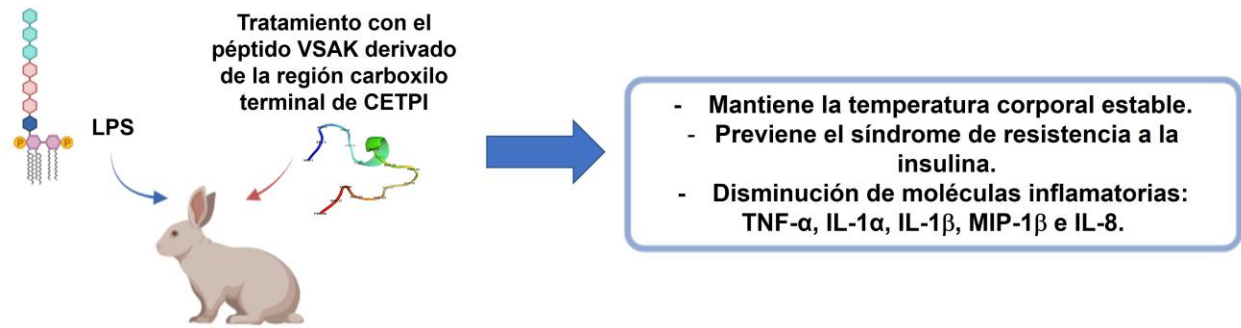


Figura 9. El péptido VSAK evita los efectos sistémicos de los LPS. Empleando un modelo de síndrome de respuesta inflamatoria sistémica en conejos, en el cual se administra LPS intravenosamente, se describió que el uso del péptido VSAK, administrado simultáneamente por la misma vía, disminuye la respuesta desregulada del hospedero a los LPS, previniendo el desarrollo de la sepsis, choque séptico y la muerte (García-González *et al.*, 2015; Luna-Reyes *et al.*, 2021).

5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La sepsis es un síndrome que representa un problema de salud pública debido a su alto índice de mortalidad, a los costos asociados al tratamiento del paciente y a sus efectos a largo plazo. En México se estima una incidencia en las unidades de terapia intensiva del 27.3 % y una mortalidad del 30.4 %. En los países en vías de desarrollo, la elevada frecuencia de infecciones de origen abdominal y respiratorio contribuye al aumento de casos de sepsis, que en México representan el 43 % y el 33 % de los casos, respectivamente.

La respuesta inmune y fisiológica desregulada ante el patógeno conforma la fisiopatología de la sepsis, la cual es compleja debido a la presencia de comorbilidades y a la respuesta heterogénea de los pacientes. Es esencial en el tratamiento de la sepsis la eliminación tanto del agente patógeno como de los elementos estimuladores de la respuesta inmune, y la resolución del proceso pro- y anti-inflamatorio. El principal agente etiológico de la sepsis son las bacterias Gram-negativas, cuyo inmunógeno es el LPS presente en su membrana externa. Dentro de los mecanismos que contribuyen a amortiguar sus efectos sistémicos se encuentran las proteínas que unen LPS. CETPI es una isoforma de CESTP producida en el intestino y presente en plasma, que interactúa con LPS. El carboxilo terminal de CETPI presenta una estructura "random coil" con aminoácidos cargados positivamente que son esenciales para la interacción electrostática con los LPS. Dicha interacción, bloquea la unión de los LPS a la superficie celular de macrófagos, protegiéndolos de sus efectos citotóxicos.

Si bien *in vitro*, mediante análisis por inmunodetección, se ha observado un aumento en la producción de CETPI en respuesta al estímulo con LPS, se desconoce la participación de esta proteína en la fisiopatología de la sepsis debida a bacterias Gram-negativas. En este trabajo determinamos las concentraciones de CETPI en pacientes con infección, sepsis o choque séptico debido a bacterias Gram-negativas. Además, para comprender la relación entre los niveles de CETPI y el estado inmunológico del paciente, analizamos los niveles de un perfil de citocinas y de los LPS en plasma.

6. HIPÓTESIS

La concentración plasmática de CETPI será mayor en los pacientes con infección, sepsis o choque séptico con hemocultivo positivo para bacterias Gram-negativas respecto a los sujetos sanos. Además, la concentración de CETPI será mayor en pacientes con niveles elevados de LPS en circulación, así como en aquellos pacientes que presenten un perfil pro-inflamatorio.

7. OBJETIVO

Determinar si la concentración plasmática de CETPI se modifica acorde a la gravedad de los pacientes con hemocultivo positivo para bacterias Gram-negativas.

Objetivos específicos

1. Determinar la concentración plasmática de CETPI y LPS en sujetos sanos y pacientes con infección, sepsis o choque séptico.
2. Establecer la relación entre la concentración plasmática de CETPI y la severidad de la enfermedad de los pacientes.
3. Evaluar la relación entre los niveles plasmáticos de CETPI con el estado inmunológico de los pacientes, a través de la determinación de su perfil de citocinas en plasma.

8. METODOLOGÍA

8.1 Diseño del estudio

Para este estudio se emplearon muestras de plasma de sujetos sanos y de pacientes con infección, sepsis o choque séptico con hemocultivo positivo para bacterias Gram negativas, recolectadas de la unidad de terapia intensiva del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ). La cuantificación de la concentración de CETPI se realizó empleando ensayos de ELISA. Los niveles de citocinas pro- y anti-inflamatorias se determinaron usando el sistema de detección múltiple Milliplex de perlas magnéticas. Se estudió la correlación entre la concentración en plasma de LPS y de CETPI en pacientes que presentaron daño hepático. Además, se confirmó la presencia de CETPI en plasma empleando inmunotransferencia y las bandas reconocidas por el anticuerpo policlonal anti-CETPI se identificaron por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, por sus siglas en inglés) acoplada a espectrometría de masas. Finalmente, se inició el estudio de la presencia de péptidos derivados del dominio carboxilo terminal de CETPI en plasma y su posible interacción con albúmina.

8.2 Población de estudio

Para el desarrollo de este estudio se incluyeron 47 muestras de plasma de sujetos sanos y 105 muestras de pacientes del INCMNSZ con infección, sepsis o choque séptico. El intervalo de edad de la población de estudio fue de 18 a 65 años. Todos los sujetos brindaron su consentimiento informado antes de su participación en este estudio. Como grupo control se emplearon las 47 muestras obtenidas de voluntarios sanos donadores del banco de sangre del INCMNSZ. Los criterios de inclusión para el grupo control fueron: índice de masa corporal $<30 \text{ kg/m}^2$, signos vitales normales, saturación de oxígeno $>90 \%$, sin evidencia de infección o enfermedad aguda o crónica. Los criterios de exclusión fueron: haber consumido drogas siete días antes de la colección de la muestra, presencia de infección, o bien de un proceso inflamatorio o traumático seis semanas previas a su inclusión en este estudio.

Los pacientes se dividieron en tres grupos: infección, sepsis y choque séptico. Los valores basales del puntaje SOFA se determinaron al ingreso del paciente a terapia intensiva y el puntaje delta SOFA se calculó como el cambio en el puntaje SOFA total entre el determinado después de las 24 horas de admisión y el basal. El grupo de pacientes con infección incluyó 50 pacientes sin evidencia de daño orgánico definido como un puntaje delta SOFA menor de 2

puntos. En el grupo de pacientes con sepsis, se incluyeron 28 pacientes con infección y daño orgánico evaluado por un puntaje delta SOFA de 2 puntos o más. Mientras que el grupo de choque séptico se conformó por 27 pacientes con sepsis, que presentaron hipotensión persistente con requerimientos de vasopresores para mantener la presión arterial media de 65 mmHg, o mayor, y niveles de lactato sérico mayores a 2 mmol/L (18 mg/dL) en ausencia de hipovolemia. Todos los pacientes tuvieron hemocultivo positivo para bacterias Gram-negativas. Fueron excluidos de este trabajo aquellos pacientes que presentaron trauma, terapia de reemplazo renal, o que hubiesen consumido anti-inflamatorios 48 horas previas a la recolección de la muestra.

La evaluación clínica de los pacientes se realizó mediante la medición de los signos vitales, de la presión arterial media, así como las concentraciones de la PCR, hemoglobina, albúmina, procalcitonina (PCT), bilirrubina, lactato, creatinina, HDL, leucocitos, plaquetas y el tiempo de administración de antibiótico. También, al ingreso del paciente a la UCI se recolectaron datos demográficos y comorbilidades basales, estas últimas clasificadas como: enfermedad cardíaca, enfermedad pulmonar, daño hepático crónico, inmunosupresión, cáncer, endocrinopatía, dislipidemia y enfermedad autoinmune. Los criterios para el diagnóstico de inmunosupresión fueron la presencia de neutropenia y/o el tratamiento con esteroides o fármacos citotóxicos. El sitio de infección se clasificó en 8 grupos: abdomen, pulmón, tracto urinario, tejidos blandos, senos paranasales, espacio pleural, sistema nervioso central y catéter intravenoso. Los criterios empleados para definir a un paciente con daño hepático fueron: enfermedad hepática conocida, puntaje SOFA basal > 1 en el rubro de función hepática y coagulación, o un diagnóstico previo de cirrosis.

Este estudio fue revisado y aprobado por el Comité de ética del INCMNSZ, con el número de referencia: 2252.

8.3 Recolección de las muestras

Todas las muestras de sangre se recolectaron dentro de las 12 h de la admisión del paciente a la UCI. Se realizaron hemocultivos empleando las muestras de todos los pacientes tras su ingreso a la UCI. Las muestras que se incluyeron en el estudio fueron aquellas con un hemocultivo positivo para bacterias Gram-negativas. Estas muestras se centrifugaron por 10 min a 1,500 rpm (290 x g), se recolectó el plasma y se hicieron alícuotas que fueron almacenadas a -80 °C.

8.4 Anticuerpo anti-CETPI

Para la producción del anticuerpo policlonal anti- CETPI se emplearon péptidos sintéticos que corresponden a los últimos 12 aminoácidos del segmento carboxilo terminal de CETPI. En el extremo amino de estos péptidos se incorporó un residuo adicional de cisteína para dirigir su acoplamiento a la proteína hemocianina de lapa ojo de cerradura, KLH por sus siglas en inglés. Los péptidos acoplados a KLH se usaron para la producción del anticuerpo anti-CETPI IgY en gallinas blancas Leghorn, empleando un protocolo estándar de 63 días por Alpha Diagnostic International Inc, San Antonio, TX, USA. Además, se obtuvo el anticuerpo policlonal anti-CETPI IgG mediante un protocolo de inmunización de 91 días en conejos Nueva Zelanda empleando el péptido AWLPPGGLGVSP acoplado a KLH. Se siguió un régimen de inmunización que consistió en una administración inicial y tres refuerzos mensuales. La primera inmunización se realizó empleando 1mg/mL de péptido acoplado a KLH disuelto en adyuvante completo de Freund (Sigma Immuno Chemicals, St Louis, MO, USA), y en los tres refuerzos se aplicó 0.5 mg/mL de péptido acoplado a KLH disuelto en adyuvante incompleto de Freund (Sigma Immuno Chemicals). Se tomaron muestras de sangre antes de iniciar el protocolo de inmunización, en el día 35 y, posteriormente, se realizó el sangrado final el día 91 del protocolo. De las muestras de sangre obtenidas se separó el plasma y se titularon los anticuerpos por un ensayo de ELISA.

8.5 Inmunotransferencia

Se realizó la cuantificación de proteínas en los plasmas recolectados utilizando un conjunto de reactivos ("kit") comercial basado en el método de Lowry (Bio-Rad, CA, USA). Se empleó un total de 30 µg de proteína para realizar la separación por electroforesis desnaturizante y posteriormente las proteínas presentes en el gel se transfirieron a membranas de fluoruro de polivinilideno (Immobilon-P, Merck Millipore, Billerica, MA, USA). Las membranas se bloquearon con una disolución al 10 % de un agente bloqueador (Bio-Rad) en amortiguador de Tris salino (TBS-Tween 20) por 1 h a temperatura ambiente (TA). La incubación con el anticuerpo anti-CETPI (1:4000) se realizó durante toda la noche a 4 °C. Posteriormente, se incubó con el anticuerpo secundario anti-IgY (1:30 000, v:v) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) por 1 h a TA. La dilución de los anticuerpos se realizó en una disolución al 5 % del agente bloqueador (Bio-Rad). Finalmente, las proteínas se visualizaron por medio del "kit" de quimioluminiscencia (Merck Millipore) en placas radiográficas X-OMAT (Kodak, Rochester, NY, USA).

8.6 Medición de la concentración de citocinas en plasma

La cuantificación de la concentración de las citocinas IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-8, IL-12 (p70), IFN γ e IL-10 en plasma se realizó empleando el sistema de determinación de citocinas basado en un panel de perlas magnéticas Milliplex Map “Kit” (Merck Millipore). Las muestras de plasma se analizaron por duplicado de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Brevemente, 25 μ L de plasma de las muestras del grupo control o de los pacientes se incubaron con los anticuerpos inmovilizados sobre perlas magnéticas durante toda la noche a 4 °C. Después se realizaron 2 lavados y se incubaron con 25 μ L de anticuerpo de detección (biotinilado) por 1 h con agitación. Se agregaron 25 μ L de un conjugado estreptavidina-ficoeritrina y se incubó por 30 min a TA con agitación. Después de realizar 2 lavados, se adicionaron 150 μ L de la disolución MAGPIX “Drive Fluid”, que permite el análisis de la muestra en el sistema Luminex MAGPIX empleando el software xPONENT. Se analizó la intensidad media de fluorescencia de cada muestra por duplicado.

8.7 Determinación de la concentración de la isoforma de la proteína de transferencia de ésteres de colesterol (CETPI) empleando un ensayo por inmunabsorción ligado a enzimas

La concentración de CETPI en plasma se determinó mediante un ensayo de ELISA empleando placas Maxisorb (Thermo Fisher Scientific). Se utilizó una curva estándar empleando un péptido sintético correspondiente a la secuencia de los últimos 18 aminoácidos del carboxilo terminal de CETPI. Se colocaron 50 μ L de las muestras de la curva estándar, o bien de plasma del grupo control y de los pacientes (dilución 1:100, en amortiguador de bicarbonatos pH 9.5) en la placa y se incubó durante toda la noche a 4 °C. Se realizó un lavado con amortiguador de fosfatos salino (PBS, por sus siglas en inglés) y se agregó la disolución de bloqueo (2.5 % de albúmina sérica bovina y 2.5 % de agente bloqueador (Bio-Rad)) por 2 h a 37 °C. Posteriormente, se realizaron tres lavados con PBS y se incubó con el anticuerpo anti-CETPI (1:5000) por 90 min, a 37 °C. Después de 3 lavados con PBS se adicionó el anticuerpo secundario anti-IgY conjugado con peroxidasa de rábano (HRP, por sus siglas en inglés) (Thermo Fisher Scientific) y se incubó por 30 min a 37 °C. Se realizó un lavado final con PBS y se adicionó el sustrato colorimétrico 3,3',5,5'- tetrametilbenzidina (TMB) (Thermo Fisher Scientific) a cada pozo, incubándose por 15 min a TA. La oxidación del TMB se lleva a cabo por una reacción catalizada por la HRP, produciéndose un complejo TMB diamina/diimina de color azul. Dado que la actividad óptima de la enzima HRP se encuentra en un intervalo de pH de 5.0 a 7.0 (Bally & Gribnau, 1989; Saud., *et al.* 2019), para detener la reacción se disminuyó el pH adicionando 50 μ L de H₂SO₄ 2 M. Esto genera un producto de color amarillo correspondiente a la formación de TMB-diimina que absorbe a una longitud de onda de 450 nm. Por lo que se midió la absorbancia de las muestras

a 450 nm empleando el espectrofluorómetro Synergy HT (BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA).

8.8 Ensayo de la actividad proteolítica total en plasma

La actividad total de proteasas en plasma se determinó empleando el “kit” de ensayo de la actividad de proteasas (Abcam, Cambridge, UK), que usa caseína acoplada a isotiocianato de fluoresceína (FITC, por sus siglas en inglés) como un sustrato general. Las muestras de plasma se incubaron con el sustrato Caseína-FITC durante 30 min a 25 °C y se midió la fluorescencia a Ex/Em= 485/550 nm, inmediatamente después de la adición del sustrato de proteasa (R1) y a los 30 min después del tiempo de incubación (R2). Las diferencias entre ambas lecturas (R2-R1) indicaron la fluorescencia del FITC generado por la digestión proteolítica del sustrato. La actividad proteolítica plasmática total se reportó como mU/mL. Una unidad se definió como la cantidad de proteasa que escinde el sustrato, para producir una cantidad de fluorescencia equivalente a 1.0 μ mol de FITC/ min a 25 °C.

8.9 Cuantificación de la concentración de LPS en plasma

La concentración de LPS en plasma se midió utilizando un inmunoensayo enzimático de inhibición competitiva (Cloud-Clone Corp, Houston, TX, EE. UU.). Este ensayo emplea un anticuerpo monoclonal contra los LPS, que se encuentra adherido en una microplaca. Se agregaron 50 μ L de diluciones del estándar, del blanco o de las muestras de plasma en los pozos de la microplaca. Se inició una reacción de inhibición competitiva entre el lipopolisacárido biotinilado y el lipopolisacárido no marcado presente en las muestras con el anticuerpo presente en la microplaca. Después de incubar durante 1 h a 37 °C, se realizó un lavado y se agregó el conjugado avidina-peroxidasa de rábano a cada pozo de cada condición probada. La placa se incubó durante 30 min a 37 °C y se hicieron 5 lavados. Se añadió la disolución de sustrato a cada pozo y después del tiempo de incubación (30 min a 37 °C), se adicionaron 50 μ L de la disolución para detener la reacción. La absorbancia se midió a 450 nm utilizando el espectrofluorómetro Synergy HT (BioTek Instruments, Inc.). La intensidad del color desarrollado representa la cantidad de HRP unida, que está relacionada de manera inversa con la concentración de LPS en la muestra.

8.10 Eliminación de albúmina del plasma

La eliminación de albúmina de las muestras de plasma se realizó con un “kit” de eliminación de albúmina (Thermo Fisher Scientific), el cual consta de una mezcla de resina de agarosa y del colorante azul Cibacron que se unen a la albúmina presente en el plasma. Brevemente, la resina se transfirió a una columna y se realizó un lavado empleando el tampón de unión/lavado.

Después, se adicionó la muestra de plasma y se incubó durante 1-2 min a TA. La columna se centrifugó y el plasma recolectado se volvió a aplicar a la columna y nuevamente se incubó durante otros 1-2 min a TA para garantizar la eliminación máxima de albúmina. Después de la centrifugación, el plasma carente de albúmina se almacenó y la columna se colocó en un nuevo tubo. Finalmente, la columna se lavó para liberar las proteínas unidas inespecíficamente y la albúmina se eluyó con una solución de fosfato de sodio 20 mM y tiocianato de sodio 250 mM, pH 7.2. Se realizó la cuantificación de proteínas en las fracciones recolectadas utilizando un ensayo basado en el método de Lowry (Bio-Rad, CA, USA) y se analizaron mediante electroforesis desnaturizante (SDS-PAGE).

8.11 Análisis estadístico

Los datos se expresaron como frecuencias para las variables categóricas y como la media aritmética con desviación estándar (SD) o mediana con rango intercuartil (IQR) para las variables continuas, según su distribución evaluada por la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk. Cuando las variables no presentaron una distribución normal, las diferencias entre los grupos se analizaron empleando la prueba U de Mann Whitney o la prueba de Kruskal-Wallis con la Prueba de Comparación Múltiple de Dunn. En el caso de variables con distribución normal, el análisis estadístico se efectuó mediante la prueba t de Student.

Se realizó la transformación logarítmica (\log_{10}) de los valores de la concentración en plasma de CETPI y de las citocinas antes de hacer el análisis de correlaciones para normalizar la distribución de los datos. Las correlaciones entre la concentración de citocinas y los niveles plasmáticos de CETPI se evaluaron mediante el coeficiente de correlación de Pearson. De manera particular, la prueba estadística empleada, el nivel de significancia y el número de muestra para cada análisis se indican en las leyendas de las figuras. En todas las pruebas aplicadas las diferencias se consideraron estadísticamente significativas en valores de $P < 0.05$. Los análisis estadísticos se realizaron empleando los programas GraphPad Prism (GraphPad Software, La Jolla, CA) y JMP 16.1.0 (SAS Institute, Cary NC, EE. UU.). El tamaño de la muestra se determinó para estimar el número de sujetos en el estudio empleando el programa GPower versión 31.9.4.

9. RESULTADOS

9.1 Sujetos de estudio y parámetros clínicos

Se colectaron 47 muestras de sangre de sujetos sanos donadores del banco de sangre del INCMNSZ como controles. Este grupo incluyó 22 hombres y 25 mujeres de entre 22 y 61 años. También, se incluyeron 105 pacientes de la unidad de terapia intensiva con bacteriemia por Gram-negativos. De estos, 50 pacientes presentaron infección, con un cambio en el puntaje SOFA menor a 2, y 55 pacientes fueron diagnosticados con sepsis o choque séptico, presentando un cambio en el puntaje SOFA mayor a 2. La edad promedio en los pacientes fue de 50 años (37.5 - 57.5) y del total de pacientes, 55 (52.4 %) fueron mujeres y 50 (47.6 %) hombres (**Tabla 2**).

En toda la población de pacientes, las bacterias aisladas con mayor frecuencia fueron *E. coli* (58.1 %), *Klebsiella pneumoniae* (11.4 %) y *Pseudomonas aeruginosa* 12 (11.4 %). Los sitios de infección más frecuentes fueron abdomen (67.6 %) y tracto urinario (19.1 %). En los pacientes con infección, las principales comorbilidades fueron dislipidemia (64.0 %), cáncer (56.0 %), inmunosupresión (52.0 %) y daño hepático (24.0 %). Mientras que en los pacientes con sepsis y choque séptico las comorbilidades más frecuentes fueron dislipidemia (52.7 %), inmunosupresión (52.7 %), cáncer (49.1 %) y daño hepático (27.3 %) (**Tabla 2**).

Los principales parámetros clínicos de los pacientes se muestran en la **Tabla 2**, en donde se observa que los niveles de PCR, PCT, bilirrubina, lactato y creatinina fueron mayores en pacientes con puntaje SOFA mayor a 2 respecto a pacientes con un puntaje SOFA menor a 2.

Tabla 2. Parámetros demográficos, clínicos y de laboratorio de los pacientes estudiados

Los datos se reportan como la media (\pm SD), mediana (IQR) y n (%). Las comparaciones se llevaron a cabo empleando la prueba exacta de Fisher o la prueba de chi cuadrado de Pearson, y la prueba U de Mann-Whitney o la prueba t de Student. PCR: Proteína C Reactiva; PCT: Procalcitonina; HDL: Lipoproteínas de alta densidad; LDL: Lipoproteínas de baja densidad; SOFA: escala de falla orgánica secuencial.

	Total (n=105)	Pacientes con puntaje Delta SOFA <2 (n=50)	Pacientes con puntaje Delta SOFA >2 (n=55)	<i>p</i>
Género, masculino, n (%)	50 (47.6 %)	27 (54.0 %)	23 (41.8 %)	0.24
Género, femenino, n (%)	55 (52.4 %)	23 (46.0 %)	32 (58.1 %)	
Edad en años Mediana (IQR)	50.0 (37.5 - 57.5)	54.5 (39.0 - 58.0)	47.0 (35.0 - 55.0)	0.17
Agente etiológico, n (%)				
<i>Escherichia coli</i>	61 (58.1 %)	28 (56.0 %)	33 (60.0 %)	0.36
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	12 (11.4 %)	7 (14.0 %)	5 (9.1 %)	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	12 (11.4 %)	8 (16.0 %)	4 (7.3 %)	
Sitio de Infección, n (%)				
Abdominal	71 (67.6 %)	32 (64.0 %)	39 (70.9 %)	0.15
Tracto urinario	20 (19.1 %)	12 (24.0 %)	8 (14.6 %)	
Catéter intravenoso	5 (4.8 %)	3 (6.0 %)	2 (3.6 %)	
Pulmonar	4 (3.81 %)	0 (0.0 %)	4 (7.3 %)	
Comorbilidades, n (%)				
Dislipidemia	61 (58.1 %)	32 (64.0 %)	29 (52.7 %)	0.89
Inmunosupresión	55 (52.4 %)	26 (52.0 %)	29 (52.7 %)	
Cáncer	55 (52.4 %)	28 (56.0 %)	27 (49.1 %)	
Daño hepático	27 (25.7 %)	12 (24.0 %)	15 (27.3 %)	
Pruebas de laboratorio				
PCR (mg/L)	14.00 (7.30 - 19.80)	10.75 (4.80 - 16.87)	15.20 (9.47 - 21.50)	<0.05
PCT (ng/mL)	7.40 (1.80 - 17.90)	3.10 (1.33 - 8.58)	11.40 (3.90 - 24.33)	<0.01
Hemoglobina (g/dL)	10.27 \pm 2.63	10.38 \pm 2.62	10.17 \pm 2.66	0.47
Albúmina (g/dL)	3.17 \pm 0.73	3.26 \pm 0.70	3.09 \pm 0.76	0.23
Bilirrubina total (mg/dL)	1.40 (0.62 - 4.90)	0.90 (0.60 - 2.93)	2.20 (0.90 - 7.40)	<0.01
Lactato (mmol/L)	2.40 (1.40 - 4.00)	1.65 (1.18 - 2.60)	3.45 (1.63 - 4.20)	<0.01
Creatinina (mg/dL)	0.90 (0.65 - 1.40)	0.80 (0.50 - 1.06)	1.00 (0.70 - 1.90)	<0.01
Células blancas ($\times 10^9/L$)	6.95 (0.35 - 12.30)	7.25 (0.60 - 12.18)	6.65 (0.10 - 12.30)	0.87
Plaquetas ($\times 10^3/\mu L$)	107.0 (21.00 - 243.00)	162.50 (26.25 - 265.00)	100.00 (16.00 - 216.00)	0.19

HDL (mg/dL)	35.19±17.71	36.88±17.57	33.65±17.89	0.40
Colesterol total (mg/dL)	138.50 (113.30 - 181.80)	139.50 (109.00 - 201.30)	136.00 (115.80 - 165.50)	0.56
LDL (mg/dL)	75.00 (48.25 - 109.30)	77.00 (48.75 - 118.30)	73.00 (47.50 - 101.50)	0.46
Puntaje Delta SOFA	0 - 11	0 - 1	2 - 11	

9.2 La concentración plasmática de CETPI es mayor en los pacientes con bacteriemia por Gram-negativos

Para determinar la relación entre los niveles de CETPI y la severidad de la enfermedad en infecciones debidas a bacterias Gram-negativas, medimos su concentración en el plasma de pacientes con infección, sepsis o choque séptico. La concentración de CETPI fue mayor en los pacientes con bacteriemia por Gram-negativos (15.21 nM [10.52 - 26.23]) respecto al grupo control (11.58 nM [8.05 - 14.71], $p < 0.001$) (**Figura 10a**). El análisis de la distribución de los datos muestra una clara diferencia entre los pacientes y controles a concentraciones de CETPI mayores a 18 nM (**Figura 10b**).

Al analizar las concentraciones de CETPI en los pacientes con puntaje SOFA mayor o menor a 2, no se encontraron diferencias (**Figura 10c**). Tampoco se observaron diferencias en las concentraciones de CETPI en relación con la mortalidad de los pacientes en la UCI (**Figura 10d**).

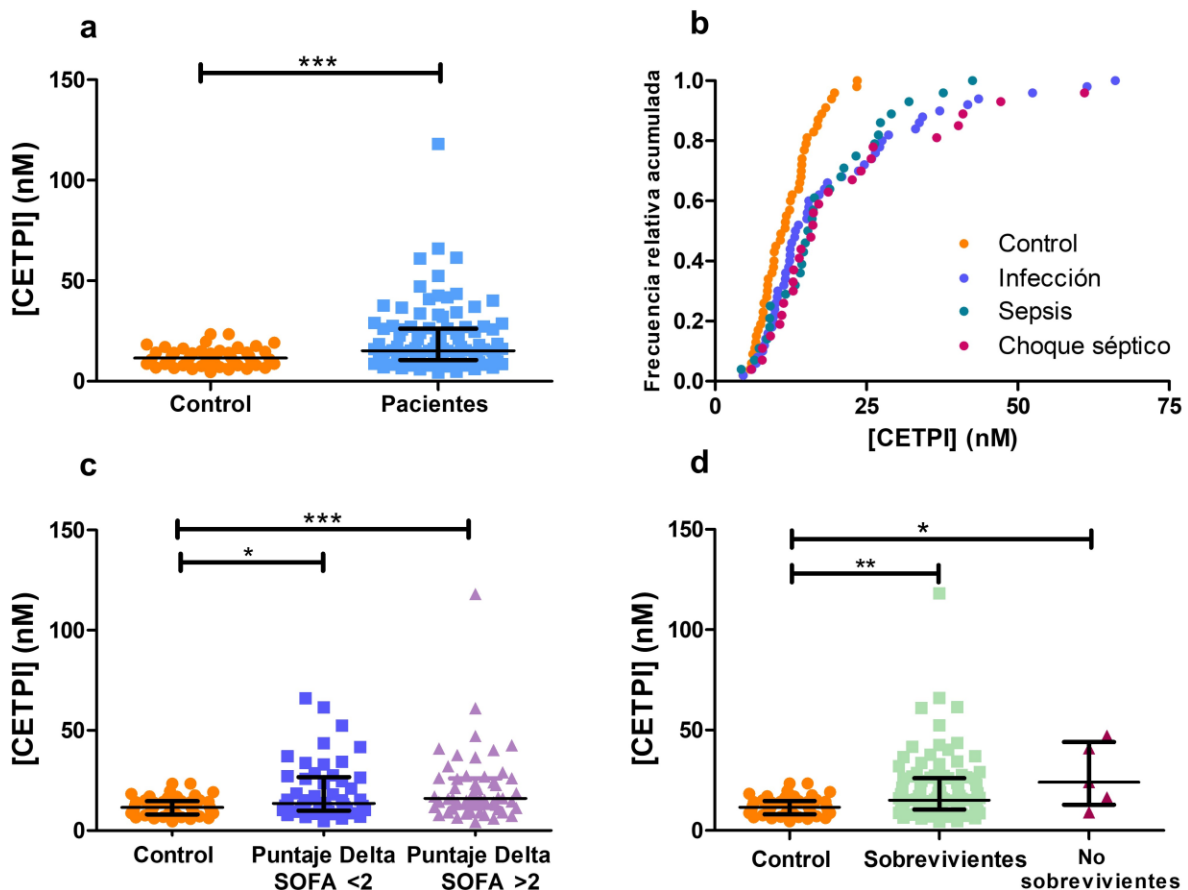


Figura 10. Concentración de CETPI en plasma de pacientes con bacteriemia por Gram-negativos. **a** Concentración de CETPI en el plasma de pacientes con hemocultivo positivo para bacterias Gram-negativas (n=105) y en sujetos control (n=47). **b** Frecuencia relativa acumulada de la concentración de CETPI en plasma del grupo control (n=47) y de los pacientes con infección (n= 50), sepsis (n= 28) y choque séptico (n= 27). **c** Concentración de CETPI en plasma de los pacientes con un puntaje SOFA <2 (n=50) o >2 (n=55), así como en los sujetos control (n=47). **d** Concentración de CETPI en plasma entre los pacientes sobrevivientes (n=100), no sobrevivientes (n=5) y sujetos control (n=47). Los datos se muestran como la mediana con IQR. *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001. Las diferencias entre los grupos se evaluaron usando la prueba de Mann-Whitney o la prueba de Kruskal-Wallis y posteriormente la prueba de Dunn para comparaciones múltiples. Las muestras se evaluaron por duplicado en ensayos ELISA.

9.3 Los niveles plasmáticos de CETPI y citocinas correlacionan con la severidad de los pacientes con bacteriemia por Gram-negativos

Además de determinar la concentración de CETPI en plasma, se midieron los niveles de las siguientes citocinas: IL-1 β , TNF α , IL-6, IL-8, IL-12 (p70), IFN γ e IL-10. Considerando que la concentración plasmática de CETPI fue mayor en los pacientes con bacteriemia por Gram-negativos respecto a los sujetos sanos, y que es capaz de interactuar con los LPS, se analizó la correlación entre sus niveles plasmáticos, así como el de los niveles de las citocinas con el puntaje SOFA de los pacientes

determinado durante las 12 h después de su admisión a la unidad de terapia intensiva. El puntaje SOFA correlacionó positivamente con CETPI ($r=0.61$, $p<0.05$), TNF- α ($r=0.62$, $p<0.05$), IL-6 ($r=0.78$, $p<0.01$), IL-8 ($r=0.76$, $p<0.01$), e IL-10 ($r=0.58$, $p<0.05$) (**Figura 11a-e**); mientras que se encontró una correlación negativa con IFN γ ($r=-0.78$, $p<0.01$) (**Figura 11f**).

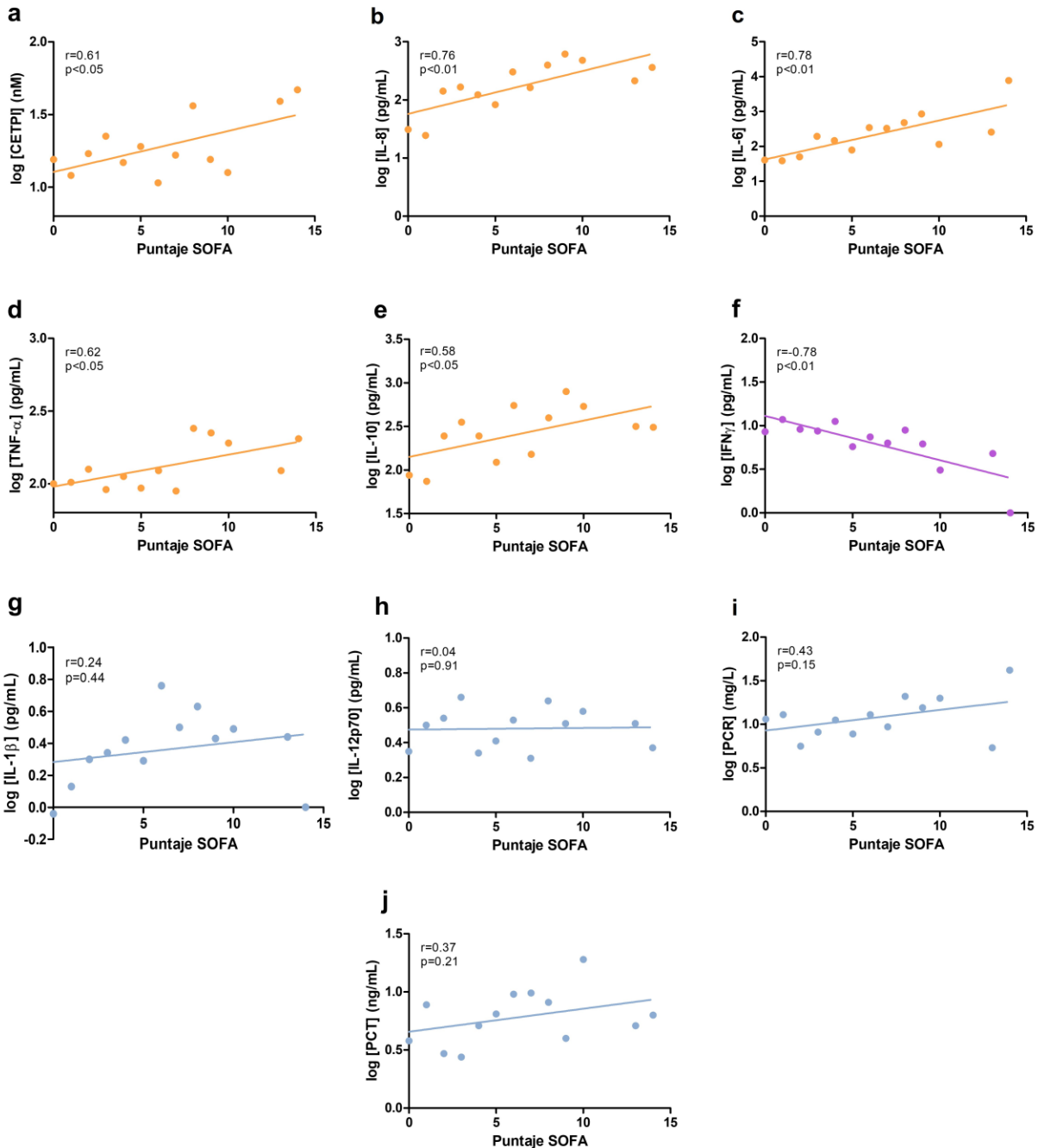


Figura 11. Correlación entre el puntaje SOFA medido durante las 12 h después del ingreso a la unidad de terapia intensiva con la concentración de CETPI y citocinas en pacientes con bacteriemia por Gram-negativos. Se realizaron correlaciones de Pearson entre el puntaje SOFA con los valores promedio de **a** CETPI; **b** IL-8; **c** IL-6; **d** TNF- α ; **e** IL-10; **f** IFN γ **g** IL-1 β ; **h** IL-12p70; **i** PCR; **j** PCT. Los niveles de las 7 citocinas, CETPI, PCR y PCT fueron transformados a valores logarítmicos para

las correlaciones. El color naranja indica una correlación positiva, el morado una correlación negativa y el azul sin correlación. SOFA: escala de falla orgánica secuencial; PCR: Proteína C Reactiva; PCT: Procalcitonina.

9.4 La concentración de CETPI correlaciona negativamente con los niveles de IL-1 β , IL-8 e IL-10 en pacientes con choque séptico

Se determinó la concentración de CETPI en los pacientes con infección, sepsis o choque séptico, sin encontrarse diferencias significativas entre ellos (**Figura 12a**). Sin embargo, los niveles de CETPI en los pacientes con choque séptico tendieron a ser mayores. Al analizar los niveles de citocinas en estos tres grupos de pacientes, se observaron diferencias significativas en los niveles de IL-6, IL-8 e IFN γ . La concentración de IL-6 fue 5 veces mayor en los pacientes con choque séptico y 2.7 mayor en los pacientes con sepsis respecto a los pacientes con infección (**Figura 12b**). La concentración de IL-8 fue 3.2 veces mayor en los pacientes con choque séptico en comparación con los pacientes con infección (**Figura 12d**). Mientras que la concentración de IFN γ fue 2.7 veces menor en los pacientes con choque séptico respecto a los pacientes con infección (**Figura 12f**).

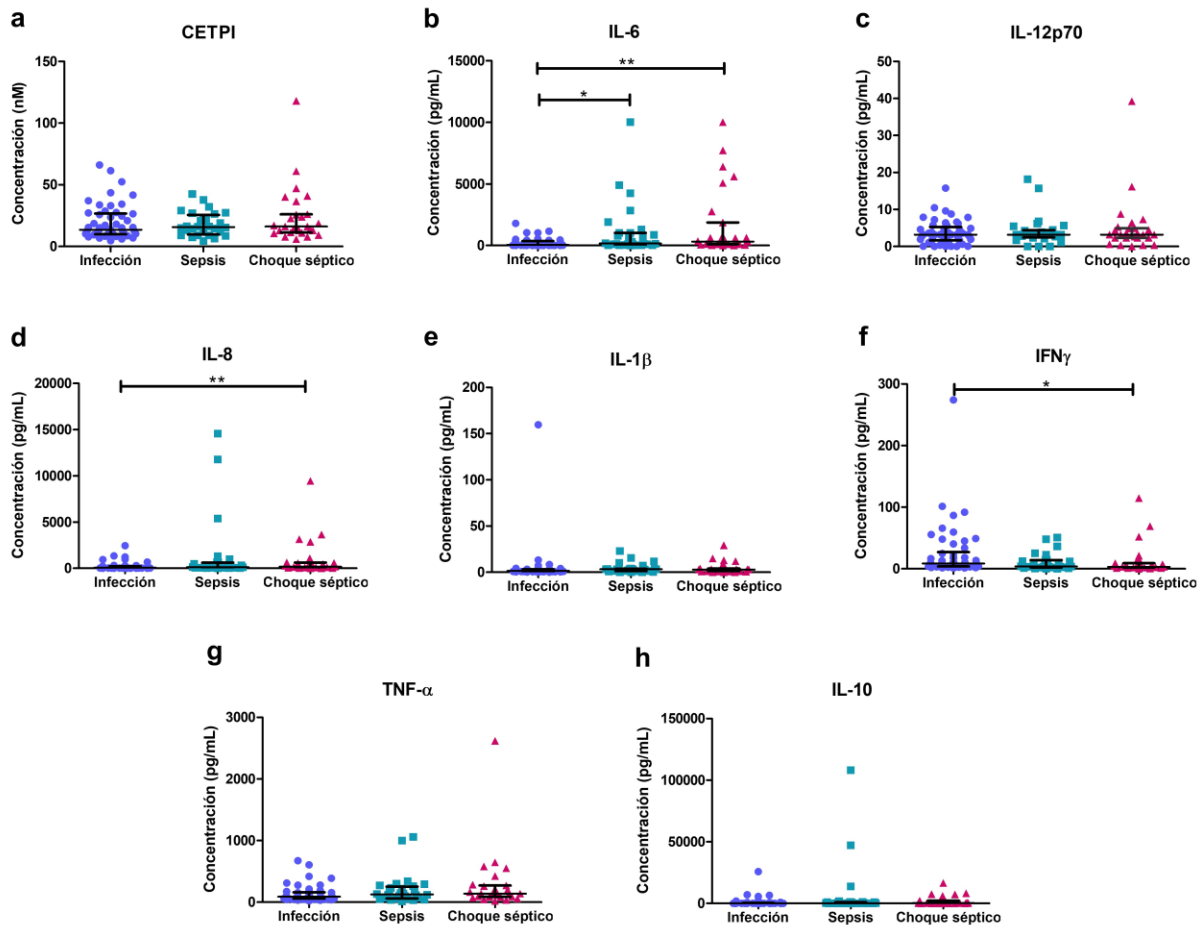
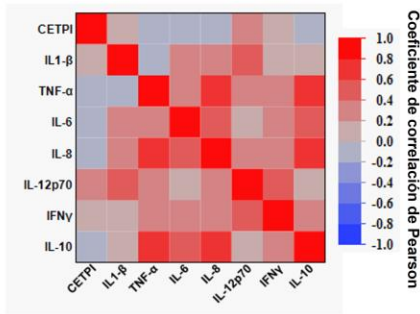


Figura 12. Concentración en plasma de CETPI y citocinas en pacientes con infección, sepsis y choque séptico debido a bacterias Gram-negativas. a CETPI; b IL-6; c IL-12p70; d IL-8; e IL-1 β ; f IFN γ ; g TNF- α ; h IL-10. Los datos se muestran como la mediana con IQR. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. Las diferencias entre los grupos se evaluaron usando la prueba de Kruskal-Wallis y posteriormente la prueba de Dunn para comparaciones múltiples.

Para analizar la asociación entre la concentración de CETPI y los niveles de las principales citocinas implicadas en la fisiopatología de la sepsis se realizaron correlaciones de Pearson. En los pacientes con infección, se encontraron correlaciones positivas entre **IL-1 β** con IL-6, IL-8 e IL-12p70; **TNF- α** con IL-6, IL-8, IFN γ , e IL-10; **IL-6** con IL-8 e IL-10; **IL-8** con IL-10; así como **IL-12p70** con IFN γ (**Figura 13a**). En los pacientes con sepsis, las correlaciones entre las citocinas fueron más evidentes, existiendo una relación positiva entre ellas (**Figura 13b**). En los pacientes con choque séptico los niveles de **CETPI** se correlacionaron negativamente con IL-1 β , IL-8 e IL-10 (**Figura 13c**). Mientras que se encontraron correlaciones positivas entre **IL-1 β** con TNF- α , IL-8, e IL-10; **TNF- α** con IL-6, IL-8, e IL-10; **IL-6** con IL-8 e IL-10; **IL-8** con IL-10; así como de **IL12p70** con IFN γ . Además, en estos pacientes se observó una pérdida de correlación de **IL-12p70** e IFN γ con el resto de las citocinas (**Figura 13c**).

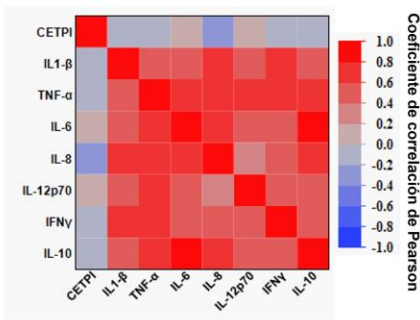
a Infección



Probabilidad de correlación

	CETPI	IL1-β	TNF-α	IL-6	IL-8	IL-12p70	IFNγ	IL-10
CETPI	<.0001	0.1670	0.3311	0.7530	0.3869	0.0941	0.9562	0.1659
IL1-β	0.1670	<.0001	0.8934	0.0488	0.0423	0.0036	0.1668	0.2375
TNF-α	0.3311	0.8934	<.0001	0.0048	<.0001	0.1498	0.0382	<.0001
IL-6	0.7530	0.0488	0.0048	<.0001	0.0004	0.3143	0.1029	0.0006
IL-8	0.3869	0.0423	<.0001	0.0004	<.0001	0.1480	0.1418	<.0001
IL-12p70	0.0941	0.0036	0.1498	0.3143	0.1480	<.0001	0.0004	0.2184
IFNγ	0.9562	0.1668	0.0382	0.1029	0.1418	0.0004	<.0001	0.0692
IL-10	0.1659	0.2375	<.0001	0.0006	<.0001	0.2184	0.0692	<.0001

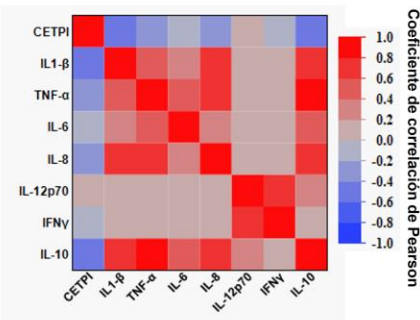
b Sepsis



Probabilidad de correlación

	CETPI	IL1-β	TNF-α	IL-6	IL-8	IL-12p70	IFNγ	IL-10
CETPI	<.0001	0.5093	0.9736	0.8218	0.0960	0.3767	0.6379	0.5125
IL1-β	0.5093	<.0001	0.0251	0.0128	0.0006	0.0218	0.0001	0.0084
TNF-α	0.9736	0.0251	<.0001	<.0001	0.0004	<.0001	0.0007	<.0001
IL-6	0.8218	0.0128	<.0001	<.0001	<.0001	0.0048	0.0192	<.0001
IL-8	0.0960	0.0006	0.0004	<.0001	<.0001	0.0473	0.0189	<.0001
IL-12p70	0.3767	0.0218	<.0001	0.0048	0.0473	<.0001	0.0010	0.0022
IFNγ	0.6379	0.0001	0.0007	0.0192	0.0189	0.0010	<.0001	0.0217
IL-10	0.5125	0.0084	<.0001	<.0001	<.0001	0.0022	0.0217	<.0001

c Choque séptico



Probabilidad de correlación

	CETPI	IL1-β	TNF-α	IL-6	IL-8	IL-12p70	IFNγ	IL-10
CETPI	<.0001	0.0042	0.0978	0.8463	0.0460	0.7298	0.8000	0.0226
IL1-β	0.0042	<.0001	0.0019	0.2124	0.0001	0.3738	0.5793	0.0004
TNF-α	0.0978	0.0019	<.0001	0.0035	<.0001	0.4028	0.3965	<.0001
IL-6	0.8463	0.2124	0.0035	<.0001	0.0443	0.9166	0.8019	0.0375
IL-8	0.0460	0.0001	<.0001	0.0443	<.0001	0.3697	0.5608	<.0001
IL-12p70	0.7298	0.3738	0.4028	0.9166	0.3697	<.0001	<.0001	0.3160
IFNγ	0.8000	0.5793	0.3965	0.8019	0.5608	<.0001	<.0001	0.8029
IL-10	0.0226	0.0004	<.0001	0.0375	<.0001	0.3160	0.8029	<.0001

Figura 13. Correlaciones de Pearson entre citocinas y CETPI en los pacientes con infección, sepsis y choque séptico debido a bacterias Gram-negativas. Se efectuaron mapas de calor de las correlaciones de Pearson entre las 7 citocinas medidas y CETPI en los pacientes con **a** infección, **b** sepsis y **c** choque séptico. El color rojo indica correlaciones positivas y el azul negativas. Al lado de cada mapa de color se muestran las probabilidades de correlación correspondientes.

9.5 Los niveles de LPS correlacionan con los niveles de CETPI en pacientes con infección o sepsis por bacterias Gram-negativas

Se analizó la correlación entre la concentración plasmática de LPS y la de CETPI en los pacientes con infección, sepsis o choque séptico, encontrándose una correlación positiva entre dichas variables en los pacientes con infección y sepsis (**Figura 14**).

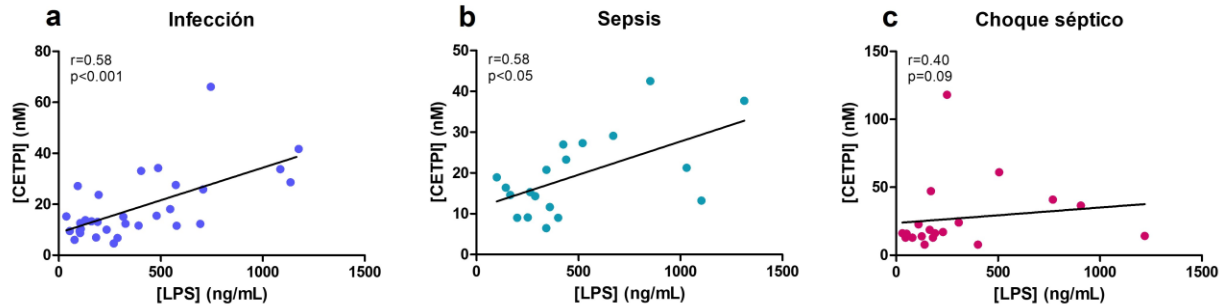


Figura 14. Los niveles de LPS correlacionan con la concentración de CETPI en plasma de pacientes con bacteriemia por Gram-negativos. Correlación de Spearman entre los niveles de LPS y CETPI en pacientes con **a** infección (n=31), **b** sepsis (n=19) y **c** choque séptico (n=19).

La relación entre los niveles de CETPI con alguna comorbilidad específica fue difícil de explorar, ya que la mayoría de los pacientes presentaban más de una comorbilidad. Sin embargo, se obtuvieron muestras de pacientes con infección, sepsis o choque séptico con una única comorbilidad (**Figura 15**), en donde fue posible observar que los pacientes con hepatopatía presentan altos niveles de CETPI (**Figura 15b,c**).

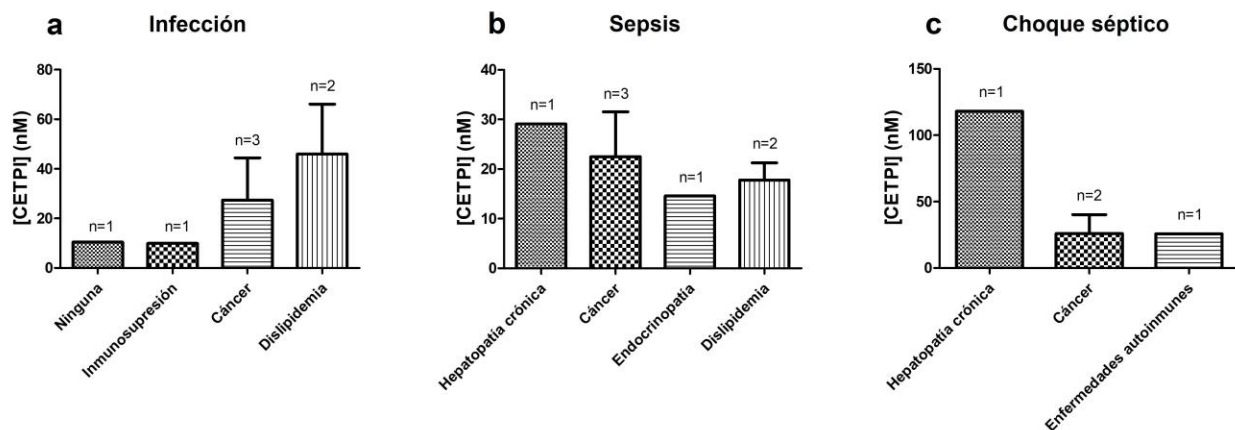


Figura 15. Concentración de CETPI en plasma de pacientes con bacteriemia por Gram-negativos de acuerdo a la presencia de comorbilidades. Concentración de CETPI en pacientes con **a** infección (n=7), **b** sepsis (n=7) y **c** choque séptico (n=4), en ausencia o presencia de una única comorbilidad. Los datos se muestran como la media con error estándar de la media.

Considerando que el principal sitio de infección de todos los pacientes fue el abdomen (**Tabla 2**), y que el hígado es el principal órgano responsable en detoxificar los LPS de origen intestinal, se determinó la relación de los niveles de LPS y CETPI en el plasma de los pacientes con y sin daño hepático. Los niveles plasmáticos de LPS fueron mayores en los pacientes con daño hepático, con diferencias estadísticamente significativas entre los pacientes con infección respecto a los pacientes con infección sin daño hepático (577.90 pg/mL [487.20 - 1136.00] vs 214.90 pg/mL [105.90 - 400.70], $p < 0.05$) (**Figura 16a**). La concentración de CETPI también fue más elevada en los pacientes con infección (31.19 nM [20.07 - 40.58]) y sepsis (28.21 nM [24.34 - 34.65]) con daño hepático respecto a los pacientes con infección (12.35 nM [9.50 - 17.41]) y sepsis (14.45 nM [9.04 - 19.39]) sin dicho daño (**Figura 16d,e**). A pesar de no encontrar diferencias significativas en los niveles de CETPI en los pacientes con choque séptico sin y con hepatopatía, los niveles tendieron a ser mayores en estos últimos ((14.84 nM [10.29 - 23.44]) vs (24.10 nM [13.54 - 44.07])) (**Figura 16f**).

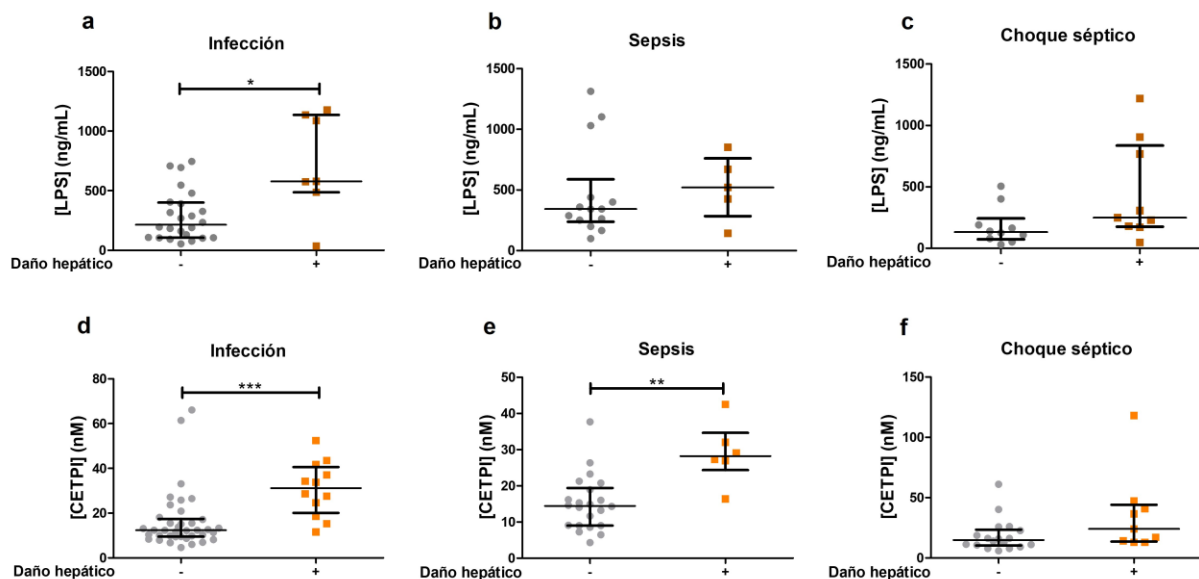


Figura 16. Concentración en plasma de LPS y CETPI en pacientes con bacteriemia por Gram-negativos, sin y con daño hepático. Concentración de LPS en plasma de pacientes con **a** infección (n=31), **b** sepsis (n=19) y **c** choque séptico (n=19) sin y con daño hepático. Concentración de CETPI en plasma de pacientes con **d** infección (n=50), **e** sepsis (n=28) y **f** choque séptico (n=27) sin y con daño hepático. Las diferencias entre los grupos se determinaron empleando la prueba de Mann-Whitney. Los datos se muestran como la mediana con IQR. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

9.6 La actividad proteolítica sobre CETPI se asocia con la severidad de la infección

Se analizó la presencia de CETPI mediante inmunotransferencia en el plasma del grupo control y de los pacientes (**Figura 17**). En el plasma de los sujetos sanos se detectó la banda esperada de 69 kDa (**Figura 17a-c**), mientras que en el plasma de los pacientes, además de la banda de 69 kDa, se identificó una segunda banda de ~67 kDa (**Figura 17d-i**). En el caso de los sujetos sanos, los niveles de citocinas se mantuvieron en concentraciones basales y no se encontró relación alguna con los niveles de CETPI (**Figura 17b,c**). Sin embargo, al analizar los niveles de citocinas en el plasma de los pacientes con infección, la presencia de la banda de ~67 kDa se asoció con un aumento en los niveles de las citocinas proinflamatorias, especialmente con la IL-6 (**Figura 17e,f**). En el caso de los pacientes con sepsis y choque séptico, el notorio aumento de IL-6 e IL-10 también se asoció con la presencia de la banda de ~67 kDa (**Figura 17h,i**). En la **Tabla 3** se muestran los parámetros clínicos de estos pacientes en donde se observa que la bacteria aislada en todos los casos fue *E. coli*. Además, en el paciente en el que únicamente se detectó la banda de CETPI (69 kDa) el origen de la infección fue el tracto urinario (**Figura 17e, Tabla 3**), que representa menor gravedad respecto a una infección de origen abdominal presente en el resto de los pacientes mostrados en la **Figura 17f,h,i**.

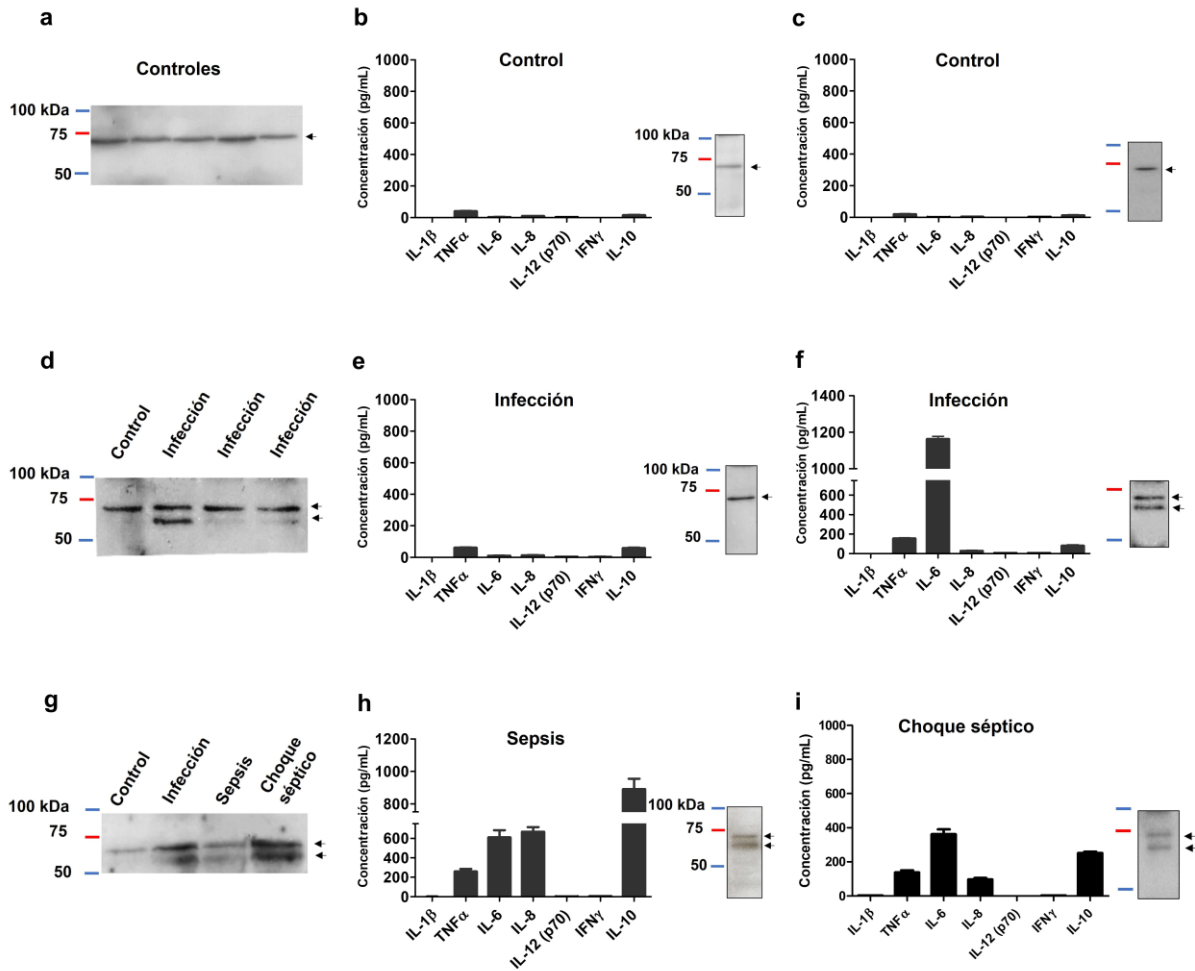


Figura 17. Presencia de CETPI y concentración citocinas en el plasma de sujetos control y pacientes con bacteriemia por Gram-negativos. **a** Presencia de CETPI en el plasma de muestras representativas del total de sujetos control; **b, c** Concentración de citocinas y presencia de CETPI en plasma de sujetos control (n=47); **d** Presencia de CETPI en el plasma de muestras representativas de sujetos control y de pacientes con infección; **e, f** Concentración de citocinas y presencia de CETPI en plasma de pacientes con infección (n=50); **g** Presencia de CETPI en el plasma de muestras representativas de sujetos control y de pacientes con infección, sepsis o choque séptico; **h, i** Concentración de citocinas y presencia de CETPI en plasma de pacientes con sepsis (n=28) o choque séptico (n=27).

Tabla 3. Parámetros clínicos de pacientes con **e, f** infección, **h** sepsis, e **i** choque séptico mostrados en la Figura 17.

Figura	Edad	Sexo	Comorbilidades	Sitio de infección	Bacteria aislada	SOFA (previo)	SOFA (T1)
17e	65	Femenino	- Inmunosupresión - Dislipidemia	Tracto urinario	<i>E. coli</i>	0	0
17f	59	Masculino	- Daño hepático - Cáncer	Abdominal	<i>E. coli</i>	3	4
17h	21	Femenino	- Inmunosupresión - Cáncer	Abdominal	<i>E. coli</i>	4	6

			- Dislipidemia				
17i	55	Masculino	- Cáncer - Endocrinopatía	Abdominal	<i>E. coli</i>	2	7

Con la finalidad de encontrar el origen de la banda de ~67 kDa identificada por inmunotransferencia, empleamos HPLC y espectrometría de masas. Inicialmente, se realizó el análisis de la banda de 69 kDa, en donde se identificaron péptidos asociados a la secuencia de CETPI (**Figura 18a**). Mientras que, las secuencias de los péptidos identificados en la banda de 67 kDa son derivadas de la albúmina humana, la cual es abundante en plasma, tiene la capacidad de unir péptidos con propiedades catiónicas y tiene una masa molecular de 66.5 kDa. Considerando que el anticuerpo empleado reconoce la secuencia del carboxilo terminal de CETPI, planteamos que péptidos derivados de dicho dominio pudieran estar interaccionando con la albúmina presente en plasma. Para demostrar esto, se realizó la eliminación de albúmina de muestras de plasma de pacientes y se analizaron por inmunotransferencia, comparando las muestras completas, las carentes de albúmina y la albúmina eluida. Interesantemente, no se observó la banda de ~67 kDa en las muestras de plasma de pacientes con sepsis o choque séptico a las cuales se les eliminó la albúmina (**Figura 18b**). Tampoco se identificó en la albúmina eluida, probablemente debido a que en la metodología empleada para su recuperación se usa una disolución con alta fuerza iónica lo que altera la interacción entre los péptidos y dicha proteína (**Figura 18b**). Estos resultados sugieren que péptidos derivados del carboxilo terminal de CETPI se unen a la albúmina y son detectados por inmunotransferencia como una banda de ~67 kDa.

a

Pico mW	Péptido MH+ (Da)	Secuencia	Puntaje	Valor E (Expect)	Identidades	Positivos	Gaps
3630.85	3630.86	GFNTNQAFLELSSNFPTGLAQVTVH CLKRPRI	46.2 bits(108)	1e-12	21/33 (64%)	25/33 (75%)	1/33 (3%)
2293.17	2293.17	GQICKEVNVISINIMADFVQKR	68.9 bits(155)	2e-20	20/22 (91%)	21/22 (95%)	0/22 (0%)
1330.70	1330.74	LFTNFISFTLKL	41.8 bits (91)	2e-11	12/12 (100%)	12/12 (100%)	0/12 (0%)

MLAATVLTLLALGNHACSKGTSHEAGIVCRITKPALLVNLHETAKVIQTAQFRASYPDITGEKAMMLLGQVKYG
LHNIQIHLSSIASSQVELVEAKSIDVSIQNVSVVFKGTLKYGYTTAWWLGIDQSIDFEIDSAIDLQINTQLTCDSDGRV
RTDAPDCYLSFHKLLHLQGEREPGWIKLFTNFISFTLKLVLKQICKEINVISINIMADFVQTRAASILSDGDIGVD
ISLTGDPVITASYLESHHKGHFYKNSVSEDLPLPTFSPTLLGDSRMLYFWFSERVFHSLAKVAFQDGRMLMSLMGD
EFKAVLETWGFNTNQEIFQEVVGGFPPSQAQVTVHCLKMMPKISQCNKGVVNVSSVMVKFLFPRPDQQHSVAYT
FEEDIVTVQASYSKKLFLSLLDLDFQITPKTVSNLTSSESESVQSLQSMITAVGIPEVMSRLEVVTALMNSKGVSL
FDIINPEIITRDGFLLLQMDGFGPEHLLVDFLQSL

b

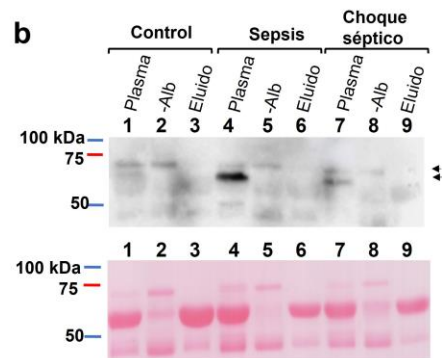


Figura 18. Análisis de las bandas de 69 y 67 kDa identificadas por inmunotransferencia. a Parámetros de los alineamientos de los péptidos identificados por HPLC y espectrometría de masas presentes en la banda de 69 kDa correspondiente a CETPI. Los péptidos identificados por HPLC y espectrometría de masas están resaltados en la secuencia de CETP (GenBank: AAV38867.1). **b** Panel

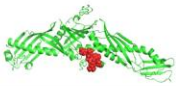
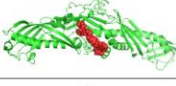
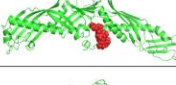
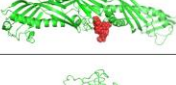

superior: Inmunodetección de CETPI en el plasma de sujetos control y de pacientes antes y después de la eliminación de albúmina. Panel inferior: Misma membrana usada en el panel superior teñida con Rojo de Ponceau.

Es probable que en el plasma de los pacientes exista una activación importante de enzimas proteolíticas que pudieran actuar sobre el extremo carboxilo de CETPI, dando lugar a péptidos que se unen a la albúmina. Para explorar esta posibilidad, se analizaron los sitios del carboxilo terminal de CETPI susceptibles a proteólisis mediante predicción bioinformática empleando la base de datos de Procleave (Li *et al.*, 2020). Se encontraron sitios susceptibles a proteólisis por las enzimas: matriz metalopeptidasa 2 (MMP-2), elastasa 2, quimiotripsina A y matriz metalopeptidasa 9 (MMP-9). Dichos sitios se encontraron en las posiciones 475, 476, 481, 482 y 483 dentro de la secuencia de aminoácidos de CETPI (**Figura 19a**). Con excepción del sitio localizado en la posición 475, el resto de los sitios susceptibles a proteólisis se encuentran expuestos dentro de la estructura de CETPI (**Figura 19b**). Además de este análisis, se observó una mayor actividad proteolítica en el plasma de los pacientes respecto al grupo control (**Figura 19c**), lo que apoya la hipótesis de que la banda de 67 kDa se forma debido a que se asocian a la albúmina péptidos derivados del carboxilo terminal de CETPI que son reconocidos por el anticuerpo anti-CETPI empleado.

a

Proteasa	Posición	Segmento	Fragmento amino	Fragmento carboxilo	Puntaje
Matriz metalopeptidasa-2	482	PPGG⋈LGVS	56.45 kDa	3.10 kDa	0.954
Elastasa-2	476	PLPA⋈WLPP	55.61 kDa	3.94 kDa	0.778
Quimiotripsina A	483	PGGL⋈GVSP	56.57 kDa	2.99 kDa	0.602
Matriz metalopeptidasa-9	481	LPPG⋈GLGV	56.28 kDa	3.28 kDa	0.549
	475	GPLP⋈AWLP	55.54 kDa	4.01 kDa	0.548

b

Proteasa	Posición	Segmento	Localización del segmento dentro de la estructura de CETPI	Predicción de la accesibilidad al disolvente	
				Puntaje	Descripción
Matriz metalopeptidasa-2	482	PPGG⋈LGVS		PPGGLGVS 34333324	Expuesto
Elastasa-2	476	PLPA⋈WLPP		PLPAWLPP 43433234	Expuesto
Quimiotripsina A	483	PGGL⋈GVSP		PGGLGVSP 343333244	Expuesto
Matriz metalopeptidasa-9	481	LPPG⋈GLGV		PPGGLGVS 34333324	Expuesto
Matriz metalopeptidasa-9	475	GPLP⋈AWLP		GPLPAWLP 44343323	Oculto

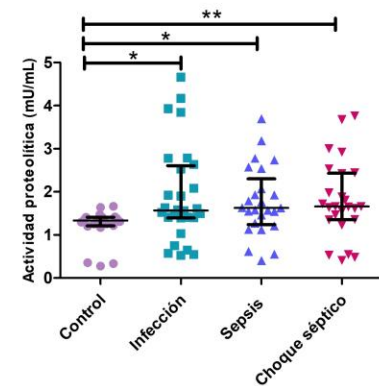
c

Figura 19. Actividad proteolítica sobre el carboxilo terminal de CETPI. **a** Predicción de la actividad proteolítica sobre el dominio carboxilo terminal de CETPI empleando Procleave (Li *et al.*, 2020). ⋈ indica un sitio de proteólisis predicho. **b** Localización de los sitios susceptibles a proteólisis dentro de la estructura secundaria de CETPI y predicción de su accesibilidad al disolvente empleando I-TASSER (Protein Structure & Function Predictions) (Zhou *et al.*, 2022) y PredictProtein (Bernhofer *et al.*, 2021). **c** Actividad proteolítica en plasma obtenido de los sujetos controles (n=21), y pacientes con infección (n=28), sepsis (n=25) y choque séptico (n=25). Los datos se muestran como la mediana con IQR. *p < 0.05, **p < 0.01.

10. DISCUSIÓN

La elevada tasa de mortalidad en los pacientes con sepsis se debe principalmente a la dificultad de brindar un diagnóstico y tratamiento oportuno por la heterogeneidad del proceso fisiopatológico de este síndrome, en el cual es central la interacción entre el patógeno y el huésped. En este último, el sexo, la edad y la presencia de comorbilidades son factores que influyen en la respuesta al agente infeccioso. A nivel mundial, la incidencia de sepsis es mayor en hombres que en las mujeres, teniendo un riesgo relativo más alto los pacientes mayores a 65 años (Carrillo *et al.*, 2015). En este trabajo, se incluyó en la población una proporción similar de hombres (47.6 %) y mujeres (52.4 %) para evitar el sesgo del sexo en la interpretación de los resultados correspondientes a la concentración en plasma de CETPI. La edad promedio de todos los pacientes fue 50 años, siendo la edad un factor de riesgo importante para el desarrollo de sepsis, ya que los pacientes neonatos, pediátricos o de edad avanzada son los que más frecuentemente desarrollan este síndrome (Emr *et al.*, 2018; Carrillo *et al.*, 2015). De hecho, dado el aumento de la población de edad avanzada que requiere procedimientos invasivos, que usa dispositivos médicos implantables, así como por la presencia de senescencia inmune, se espera un aumento en las tasas de mortalidad debido a sepsis en las próximas dos décadas (Barker *et al.*, 2021; Gudiol *et al.*, 2021).

La epidemiología de la sepsis se ve influenciada no solo por la edad, sino también por la presencia de comorbilidades, tales como enfermedades crónicas, enfermedades inmunosupresoras no relacionadas con el cáncer y el propio cáncer. Los pacientes con estas condiciones son especialmente susceptibles, presentando una probabilidad de riesgo diez veces mayor de desarrollar sepsis en comparación con la población general (Gudiol *et al.*, 2021), por lo que fueron comorbilidades comunes en este estudio. Un hallazgo de particular interés fue que la dislipidemia, en la que los niveles de HDL están debajo de los parámetros normales, se encontró como la comorbilidad más frecuente entre los pacientes. Las HDL, además de participar en el transporte reverso del colesterol, tienen un papel importante en la inflamación. Al inicio de la sepsis, las HDL ejercen diversos efectos protectores, entre ellos, la capacidad de unir y disminuir la concentración de LPS en el plasma, reducir la reacción inflamatoria en macrófagos, disminuir la agregación de plaquetas y modular funciones endoteliales. Esto último se lleva a cabo inhibiendo la producción de moléculas de adhesión, mediante la activación de la enzima óxido nítrico sintasa y al prevenir la activación endotelial (Cao & Huang, 2022; Tanaka *et al.*, 2020). Sin embargo, durante la progresión de este síndrome los niveles de HDL disminuyen y predominan las HDL pro- inflamatorias o

disfuncionales que tienen una mayor concentración de triglicéridos y una disminución de ésteres de colesterol y de la apolipoproteína A1 (Chien *et al.*, 2005; Barker *et al.*, 2021; Cho, 2022). Esto conlleva a la disminución de su función protectora, lo que a su vez se asocia con un pronóstico menos favorable (Barlage *et al.*, 2009). La interacción entre las HDL y los LPS es facilitada por la acción de las proteínas CETP, PLTP y LBP. Estas proteínas extraen los LPS de las membranas bacterianas y los transfieren a las HDL (Vesny *et al.*, 2000). Finalmente, los complejos HDL-LPS son transportados hacia el hígado para la posterior detoxificación de los LPS por la enzima aciloxiacil hidrolasa que remueve las cadenas acilo secundarias en el lípido A (Munford *et al.*, 2020; Pérez-Hernández *et al.*, 2021).

Más del 50 % de los pacientes con sepsis presentan al menos un estado comórbido (Fathi *et al.*, 2019), encontrándose el daño hepático como la cuarta comorbilidad más común entre los pacientes incluidos en este estudio (n=105). La presencia de daño hepático tiene un impacto significativo en la mortalidad de los pacientes y entre las manifestaciones clínicas se encuentran hepatitis isquémica, colestasis, así como alteración en la síntesis de proteínas que da lugar a coagulopatías (Woznica *et al.*, 2018).

Los estados comórbidos mencionado previamente y los agentes infecciosos son los principales factores que afectan la evolución y comportamiento de la sepsis. La prevalencia de los últimos varía en las distintas regiones y con el paso del tiempo. La información disponible sobre los principales agentes infecciosos causantes de sepsis en México es escasa. No obstante, en 2009 se publicó un estudio epidemiológico de la sepsis en donde se incluyeron 135 Unidades de Terapia Intensiva de 24 estados de la República Mexicana. De los agentes etiológicos aislados, 52 % fueron bacterias Gram-negativas, 38 % bacterias Gram-positivas y 10 % hongos (Carrillo *et al.*, 2009). También se observó una prevalencia de las bacterias Gram-negativas en los cultivos de pacientes con sepsis en un estudio internacional en el que se incluyó América Central y del Sur (Vincent *et al.*, 2009), encontrándose *E. coli* y *Pseudomonas aeruginosa* entre las principales especies aisladas (Carrillo *et al.*, 2009; Vincent *et al.*, 2009). Lo anterior es consistente con los resultados de este trabajo, en donde *E. coli* fue aislada en mayor porcentaje (58.1 %) de los hemocultivos realizados a los pacientes. *E. coli* es el principal agente causante de septicemia adquirida en la comunidad como en el hospital, observándose un aumento en su incidencia en todo el mundo durante la última década. Lo que es relevante tomando en cuenta que las cepas multi-resistentes a antibióticos han aumentado de forma importante (de Lastours *et al.*, 2020).

Se ha reportado que los sitios más comunes de la infección primaria en hospitales de México son abdominal (47 %), pulmonar (33 %), tejidos blandos (8 %), vías urinarias (7 %) y misceláneas (5 %) (Carrillo *et al.*, 2009). De manera consistente encontramos en este trabajo el abdomen como el sitio de infección más frecuente, afectando a más de la mitad de los pacientes incluidos. Entre las infecciones abdominales se registraron: apendicitis, colecistitis, diverticulitis, pancreatitis y colitis.

El tracto gastrointestinal está colonizado por trillones de microorganismos que interactúan con el hospedero para mantener la organización estructural y funcional, siendo esencial la integridad de la capa de células epiteliales y de la barrera física de moco (que separa la microbiota de las células epiteliales) para limitar la migración de microorganismos (Albillos *et al.*, 2020). Además, la barrera formada por la mucosa intestinal se refuerza por las células inmunes, lo que es relevante considerando que el intestino es el órgano linfoide más grande del cuerpo, conteniendo las placas de Peyer, la lámina propia, los ganglios linfáticos mesentéricos y los linfocitos intraepiteliales. La integridad intestinal se compromete en los pacientes críticamente enfermos, que son aquellos que presentan una situación médica potencialmente mortal que requiere cuidados médicos intensivos y alimentación parenteral (Otani & Coopersmith, 2019). Asimismo, diversas condiciones, como el abuso de alcohol, infecciones entéricas, el uso de antibióticos y la ingesta de dietas bajas en fibra y ricas en grasa, también propician la translocación de bacterias y sus componentes a través de la barrera intestinal dañada (Martel *et al.*, 2022). Esto resulta en una respuesta inflamatoria con un aumento en el flujo sanguíneo y en la permeabilidad por un aumento del transporte paracelular, apoptosis o permeabilidad transcelular (Camilleri, 2019; Onaona & Boudourakis, 2020; Pérez-Hernández *et al.*, 2021). Estas alteraciones en la barrera intestinal favorecen la liberación de mediadores tóxicos en los ganglios linfáticos mesentéricos y en la circulación sistémica (Klingensmith & Coopersmith, 2016).

Inicialmente, la respuesta inflamatoria se sitúa en la cavidad peritoneal, pero con la evolución de la enfermedad y la progresión de la severidad de la sepsis, la respuesta llega a ser sistémica incrementando la probabilidad de muerte. Por lo que, el principal objetivo en el manejo de los pacientes con sepsis es controlar la infección mediante la administración de antibióticos. También, de acuerdo con la guía de la supervivencia de la sepsis, es crucial la reanimación cardiovascular con fluidos o agentes vasoactivos en las primeras horas, para mantener la perfusión tisular y prevenir falla en otros órganos (Boldingh *et al.*, 2017).

Sin un adecuado manejo, la persistencia de hipoxia tisular, disfunción mitocondrial y apoptosis, producen daño orgánico, aumentando la probabilidad de la progresión del paciente con sepsis a

choque séptico y el riesgo de muerte. Los pacientes con choque séptico tienen un puntaje Delta SOFA mayor a 2, con hiperlactatemia e hipotensión con requerimiento de vasopresores (Singer *et al.*, 2016). En este estado crítico, los pacientes tuvieron niveles más elevados de PCR, PCT, bilirrubina total, lactato y creatinina en plasma. La PCR actúa como parte de la reacción de fase aguda en sepsis y es capaz de unir LPS y favorecer su eliminación. Su síntesis se induce por IL-6, IL-1 β y TNF- α (Eschborn & Weitkamp, 2019). Mientras que la PCT es un péptido precursor de calcitonina cuyos niveles se incrementan en un proceso inflamatorio e infeccioso en respuesta a la presencia de endotoxina y citocinas proinflamatorias (Gregoriano *et al.*, 2020). De esta forma, además de inducir la producción de PCR y PCT, la presencia continua de LPS en el torrente sanguíneo contribuye a la inflamación crónica persistente que conduce a daño orgánico, observándose niveles elevados de creatinina y de bilirrubina total debido a alteraciones de la función renal y hepática, respectivamente (Chunzhi *et al.*, 2016; Engelmann *et al.*, 2019; Śmiechowicz, 2022). Ante este daño, los altos niveles de lactato son un reflejo de la presencia de hipoxia y de un metabolismo anaerobio, funcionando como un indicador fisiológico de la disponibilidad de oxígeno, que tiene un importante valor pronóstico de mortalidad en los pacientes con choque séptico (Khodashahi & Sarjamee, 2020).

Lo anterior destaca el hecho de que en presencia de una infección por bacterias Gram-negativas, es primordial la eliminación de los LPS del torrente sanguíneo, así como el neutralizar sus efectos sistémicos, para evitar la respuesta exacerbada que dificulte el regreso a la homeostasis. Algunos de los mecanismos de inactivación de los LPS presentes en el intestino incluyen a la fosfatasa alcalina, mucina-2, péptidos antimicrobianos, ácidos biliares, HDL intestinal, así como las proteínas LBP, BPI y ,recientemente, a CETPI (Luna-Reyes *et al.*, 2021; Pérez-Hernández *et al.*, 2021; Han *et al.*, 2021). Si dichos mecanismos son sobrepasados, en los ganglios linfáticos, los LPS unidos a quilomicrones son transportados a la circulación portal, mientras que los LPS que logran alcanzar la circulación sistémica son transportados en forma libre o en agregados con fragmentos de la membrana bacteriana, así como unidos a albúmina, sCD14 y a las proteínas PLTP, LBP, CETP y CETPI. Además, como se mencionó previamente, una fracción importante de LPS en circulación está unida a lipoproteínas, proponiéndose que la interacción rápida de LPS con las HDL representa una primera línea de defensa contra las infecciones (Cazita *et al.*, 2008). De esta manera, las HDL facilitan la eliminación de los LPS transportándolos al hígado para su posterior captación por las células de Kupffer y las ECs sinusoidales (Yao *et al.*, 2016; Pérez-Hernández *et al.*, 2021).

Las proteínas BPI y LBP contribuyen a atenuar los efectos de los LPS, al interactuar con su región inmunogénica: el lípido A. Sin embargo, en las infecciones bacterianas severas y ante un

aumento de LPS en el torrente sanguíneo se produce una liberación descontrolada de citocinas proinflamatorias, y una inadecuada activación de la respuesta inmune. En conjunto con BPI y LBP, la isoforma de CETP, CETPI, une LPS mediante interacciones electrostáticas entre su dominio carboxilo terminal y el lípido A. Los resultados de este trabajo muestran que la concentración de CETPI en plasma de pacientes con bacteriemia por Gram-negativos es mayor que en los sujetos sanos. Tomando en cuenta que CETPI es una proteína que une LPS, los niveles plasmáticos más altos en los pacientes sugieren que esta proteína podría estar participando en la respuesta protectora ante dichas moléculas. Distinto a las diferencias encontradas en la concentración de CETPI entre los sujetos sanos y los pacientes, no se observaron diferencias entre los pacientes con infección, sepsis o choque séptico, ni entre los sobrevivientes y los no sobrevivientes. Sin embargo, se encontró una correlación directa entre la concentración de CETPI y el puntaje SOFA medido durante las 12 horas de admisión a terapia intensiva, indicando una asociación con el grado de daño a órganos (Lambden *et al.*, 2019). Por lo que, a pesar de no haber una diferencia significativa entre la concentración de CETPI de pacientes con infección y sepsis, la medición de la concentración de CETPI podría ser útil para determinar la severidad de la enfermedad.

El análisis de la correlación entre el puntaje SOFA con los niveles de las principales citocinas producidas en respuesta a los LPS en circulación mostró una asociación directa entre dicho puntaje, indicador de la gravedad del paciente, con IL-6, TNF- α , IL-8 e IL-10. Las citocinas IL-6 y TNF- α están implicadas en daño endotelial y en el síndrome de disfunción orgánica múltiple, siendo empleadas como biomarcadores para sepsis (Miguel-Bayarri *et al.*, 2012; Molano Franco *et al.*, 2019; Grondman *et al.*, 2020). La IL-8 se ha propuesto como un factor pronóstico en pacientes con sepsis con un alto riesgo de mortalidad (Livaditi *et al.*, 2006; Anderson *et al.*, 2019), y la IL-10 es frecuentemente empleada como un indicador de un fenotipo hipoinflamatorio (Barichello *et al.*, 2022). La correlación negativa encontrada entre los niveles de IFN γ con el puntaje SOFA indica que la infección bacteriana no está siendo controlada. IFN γ es una citocina que aumenta la capacidad fagocítica y citotóxica de los macrófagos (Van Der Poll *et al.*, 2017). Sin embargo, la evidencia obtenida *in vitro* empleando esplenocitos y células T de pacientes con sepsis muestra una secreción disminuida de esta citocina, lo que contribuye a un peor pronóstico (Boomer *et al.*, 2011; Hotchkiss *et al.*, 2013). De esta manera, se ha propuesto que la administración de IFN γ puede revertir la inmunoparálisis (Leentjens *et al.*, 2012; Clinical trials: NCT01649921, NCT03332225). En conjunto, estos resultados muestran que tanto la presencia de una respuesta inflamatoria con altos niveles de IL-6, TNF- α e IL-8, como la inmunosupresión, observada por el aumento de los niveles de IL-10 y disminución de IFN γ , favorecen el daño celular y la disfunción orgánica en los pacientes.

Los pacientes con choque séptico tuvieron una mayor concentración plasmática de IL-6 e IL-8, y una menor concentración de IFN γ que los pacientes con infección, demostrando la presencia de una respuesta inmune desregulada que contribuye a un peor pronóstico. Los resultados también muestran una correlación positiva entre IL-10 y las citocinas proinflamatorias, cuya simultánea presencia se ha asociado con la patogénesis de la sepsis (Matsumoto *et al.*, 2018). La IL-10 es principalmente secretada por monocitos, macrófagos y células Th2. Es una citocina, con propiedades inmunosupresoras que desempeña diversas funciones, tales como la inhibición de la proliferación y actividad de las células T, la supresión de la liberación de citocinas proinflamatorias y promover la proliferación de células inmunosupresoras como Treg y MDSC (Liu *et al.*, 2022). En los linfocitos T la liberación de IL-10 se favorece por el incremento de IL-6 y el TGF β (McGeachy *et al.*, 2007), mientras que en los macrófagos la PCR promueve su liberación (Mold *et al.*, 2002). Por lo que durante la sepsis la inflamación e inmunosupresión pueden ocurrir secuencial o concurrentemente (Liu *et al.*, 2022).

Se han empleado distintas aproximaciones para controlar tanto la inflamación excesiva como la inmunosupresión en los pacientes con sepsis. Una de las más prometedoras es la administración de agentes neutralizadores de los LPS, tal como el péptido VSAK, que podría ser administrado en conjunto con el tratamiento con antibióticos. En experimentos *in vivo*, se administró a conejos previamente tratados con LPS el péptido VSAK, lo que resultó en una disminución en la concentración plasmática de moléculas proinflamatorias (Luna-Reyes *et al.*, 2021). Así que, en este trabajo, basados en los altos niveles de CETPI presentes en los pacientes, exploramos su relación con los niveles de citocinas. En los pacientes con choque séptico, se encontraron correlaciones negativas entre CETPI con IL-1 β , IL-8, e IL-10, lo que contribuye a considerar a CETPI como una proteína que amortigua los efectos sistémicos de los LPS.

Por otra parte, en un estudio *in vitro*, empleando células de intestino delgado y de colon, se reportó una clara correlación en el aumento de la concentración de CETPI en respuesta a la estimulación con LPS (García-González *et al.*, 2015). Puesto que numerosos estudios han reportado que los pacientes con daño hepático presentan altos niveles circulantes de LPS (Bode *et al.*, 1987; Parlesak *et al.*, 2000; Thuy *et al.*, 2008; Nier *et al.*, 2020), analizamos la concentración plasmática de LPS y CETPI en presencia de esta comorbilidad. De manera consistente, en los pacientes de este estudio con un daño hepático, se encontraron altos niveles de LPS, así como un aumento correspondiente de CETPI en plasma. Por lo que considerando que CETPI es sintetizada por células intestinales y que la cavidad abdominal fue

el principal sitio de infección en los pacientes incluidos en este estudio, los altos niveles de LPS en circulación podrían promover su producción como una respuesta protectora.

Se identificó a la CETPI mediante inmunotransferencia en el plasma de sujetos sanos y pacientes, mientras que la presencia de la banda de 67 kDa se asoció con proteólisis y con un aumento en la concentración de IL-6 en plasma. Esto es relevante considerando que los niveles de IL-6 se han asociado con indicadores de la severidad de la enfermedad, incluyendo la presencia de daño orgánico (Schulte *et al.*, 2013; Fan *et al.*, 2016).

La presencia de proteólisis sistémica se ha asociado con una alta tasa de mortalidad en pacientes con choque séptico (Bauzá-Martínez *et al.*, 2018). A pesar de la mayor actividad proteolítica en el plasma de los pacientes en comparación con los sujetos control, el no haber encontrado diferencias significativas entre los pacientes con infección, sepsis o choque séptico, podría deberse a la baja tasa de mortalidad (4.8 %) observada en este estudio. La proteólisis de CETPI es altamente probable considerando que el principal sitio de infección en los pacientes fue abdominal, que CETPI se expresa en las células intestinales (Alonso *et al.*, 2003), y el papel central de metaloproteinasas de matriz (MMPs, por sus siglas en inglés) y de proteasas de serina en la fisiopatología del choque séptico (Vanlaere & Libert, 2009). En este sentido, el análisis predictivo de los sitios susceptibles a proteólisis presentes en el carboxilo terminal de CETPI mostró sitios para quimi tripsina A, elastasa-2, MMP-9 y MMP-2, lo que originaría péptidos capaces de ser reconocidos por el anticuerpo anti-CETPI empleado. Estas MMPs degradan proteínas de la matriz extracelular promoviendo tanto la migración de células inmunes a los sitios de infección como la activación de citocinas y quimiocinas (Jordakieva *et al.*, 2021). En voluntarios sanos se observó que los LPS aumentan la secreción de MMP-9 por monocitos, macrófagos y neutrófilos (Pugin *et al.*, 1999; Albert *et al.*, 2003). En pacientes críticos, los niveles de MMP-9 en plasma están elevados (Yassen *et al.*, 2001; Duda *et al.*, 2020), mientras que los niveles aumentados de proMMP-9 y proMMP-2 en los pacientes con sepsis por Gram-negativas correlacionó con la severidad de la enfermedad (Pugin *et al.*, 1999; Elkington *et al.*, 2005). Por lo que pensamos que es muy probable que el dominio carboxilo terminal de CETPI sufra degradación proteolítica en los pacientes con sepsis o choque séptico. De esta forma, la mayor producción de CETPI y la liberación de péptidos derivados de su región carboxilo terminal por degradación proteolítica podrían representar un sistema de respuesta de emergencia, activado al inicio de la infección y posteriormente durante la sepsis y choque séptico.

11. CONCLUSIONES

La identificación de una nueva isoforma de CETP, denominada CETPI, que tiene la capacidad de interactuar con LPS, ha aumentado el interés por conocer su funcionalidad y contribución en los procesos infecciosos. Como una primera aproximación, en la presente tesis exploramos la presencia de CETPI en el plasma de pacientes con infección, sepsis o choque séptico debido a bacterias Gram-negativas. Considerando la complejidad del proceso fisiopatológico de la sepsis, se determinó la gravedad del paciente mediante la medición de los niveles de citocinas, proteínas de fase aguda, LPS, así como por el uso de la escala clínica SOFA, lo que nos permitió hacer correlaciones con la concentración de CETPI en plasma. De esta forma, a través del análisis de los resultados se concluye lo siguiente:

- CETPI está presente en el plasma de sujetos sanos y pacientes con infección, sepsis o choque séptico causados por bacterias Gram-negativas, encontrándose una mayor concentración de CETPI en los pacientes.
- El incremento en la concentración de CETPI se correlaciona con el daño orgánico del paciente evaluado por la escala SOFA.
- La correlación directa entre los niveles plasmáticos de LPS y los de CETPI, junto con la correlación negativa encontrada entre la concentración de CETPI con IL-1 β , IL-8, e IL-10, sugieren que CETPI es una proteína de respuesta ante la presencia de los LPS.
- En los pacientes con infección, sepsis o choque séptico con hemocultivo positivo para bacterias Gram-negativas y con altas concentraciones de IL-6 se observó una banda secundaria de 67 kDa, lo que aunado a la actividad proteolítica en plasma, podría deberse a la presencia de péptidos derivados del carboxilo terminal de CETPI unidos a albúmina.

12. PERSPECTIVAS

A pesar de que los resultados de este trabajo sugieren la participación de CETPI en el proceso de sepsis por bacterias Gram-negativas, aún hay aspectos importantes a estudiar respecto a su síntesis, estructura y funcionalidad, dentro de los cuales destacan:

- Determinar la vía por la cual CETPI ingresa al torrente sanguíneo después de su síntesis por las células intestinales.
- Sobreexpresar y purificar la proteína CETPI para describir los sitios que intervienen en su unión con los LPS, así como su posible uso para disminuir los efectos sistémicos de los LPS.
- Estudiar el efecto de las citocinas IL-1- β , IL-6, IL-8, e IL-10 sobre la expresión de CETPI a nivel de mRNA y proteína.
- Determinar si existe relación entre la concentración de CETP y CETPI considerando los niveles de lípidos y lipoproteínas en plasma.
- Demostrar la presencia de péptidos derivados del carboxilo terminal de CETPI en plasma de pacientes con sepsis.
- Determinar la presencia de CETPI en pacientes con sepsis debida a agentes etiológicos distintos a bacterias Gram-negativas.
- Evaluar el posible uso de CETPI como un biomarcador de severidad en los pacientes con sepsis.

13. REFERENCIAS

1. Adamik, B., Zielinski, S., Smiechowicz, J. & Kübler, A. Endotoxin Elimination in Patients with Septic Shock: An Observation Study. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* **63**, 475–483 (2015).
2. Albert, J. et al. Differential release of matrix metalloproteinase-9 and nitric oxide following infusion of endotoxin to human volunteers. *Acta Anaesthesiol Scand* **47**, 407–410 (2003).
3. Albillos, A., de Gottardi, A. & Rescigno, M. The gut-liver axis in liver disease: Pathophysiological basis for therapy. *J Hepatol* **72**, 558–577 (2020).
4. Alonso, A. L., Zentella-Dehesa, A. & Mas-Oliva, J. Characterization of a naturally occurring new version of the cholesterol ester transfer protein (CETP) from small intestine. *Mol Cell Biochem* **245**, 173–182 (2003).
5. Anderson, B. J. et al. Plasma sTNFR1 and IL8 for prognostic enrichment in sepsis trials: a prospective cohort study. *Crit Care* **23**, 400 (2019).
6. Arina, P. & Singer, M. Pathophysiology of sepsis. *Curr Opin Anaesthesiol* **34**, 77–84 (2021).
7. Balka, K. R. & De Nardo, D. Understanding early TLR signaling through the Myddosome. *J Leukoc Biol* **105**, 339–351 (2019).
8. Bally, R. W. & Gribnau, T. C. Some aspects of the chromogen 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine as hydrogen donor in a horseradish peroxidase assay. *J Clin Chem Clin Biochem* **27**, 791–796 (1989).
9. Barichello, T., Generoso, J. S., Singer, M. & Dal-Pizzol, F. Biomarkers for sepsis: more than just fever and leukocytosis—a narrative review. *Crit Care* **26**, 14 (2022).
10. Barker, G. et al. Lipid and Lipoprotein Dysregulation in Sepsis: Clinical and Mechanistic Insights into Chronic Critical Illness. *J Clin Med* **10**, 1693 (2021).
11. Barlage, S. et al. Changes in HDL-associated apolipoproteins relate to mortality in human sepsis and correlate to monocyte and platelet activation. *Intensive Care Med* **35**, 1877–1885 (2009).
12. Bauzá-Martínez, J. et al. Proteolysis in septic shock patients: plasma peptidomic patterns are associated with mortality. *Br J Anaesth* **121**, 1065–1074 (2018).
13. Beamer, L. J. Structure of human BPI (bactericidal/permeability-increasing protein) and implications for related proteins. *Biochem Soc Trans* **31**, 791–794 (2003).
14. Beamer, L. J., Fischer, D. & Eisenberg, D. Detecting distant relatives of mammalian LPS-binding and lipid transport proteins. *Protein Sci* **7**, 1643–1646 (1998).
15. Bernhofer, M. et al. PredictProtein - Predicting Protein Structure and Function for 29 Years. *Nucleic Acids Res* **49**, W535–W540 (2021).
16. Beutler, B. & Rietschel, E. T. Innate immune sensing and its roots: the story of endotoxin. *Nat Rev Immunol* **3**, 169–176 (2003).
17. Bhan, C., Dipankar, P., Chakraborty, P. & Sarangi, P. P. Role of cellular events in the pathophysiology of sepsis. *Inflamm Res* **65**, 853–868 (2016).

18. Blauw, L. L., Wang, Y., Willems van Dijk, K. & Rensen, P. C. N. A Novel Role for CETP as Immunological Gatekeeper: Raising HDL to Cure Sepsis? *Trends Endocrinol Metab* **31**, 334–343 (2020).
19. Bode, C., Kugler, V. & Bode, J. C. Endotoxemia in patients with alcoholic and non-alcoholic cirrhosis and in subjects with no evidence of chronic liver disease following acute alcohol excess. *J Hepatol* **4**, 8–14 (1987).
20. Boekholdt, S. M. et al. CETP gene variation: relation to lipid parameters and cardiovascular risk. *Curr Opin Lipidol* **15**, 393–398 (2004).
21. Boldingh, Q. J. J., De Vries, F. E. E. & Boermeester, M. A. Abdominal sepsis. *Curr Opin Crit Care* **23**, 159–166 (2017).
22. Boomer, J. S. et al. Immunosuppression in patients who die of sepsis and multiple organ failure. *JAMA* **306**, 2594–2605 (2011).
23. Camilleri, M. Leaky gut: mechanisms, measurement and clinical implications in humans. *Gut* **68**, 1516–1526 (2019).
24. Cao, H. & Huang, W. HDL and Sepsis. *Adv Exp Med Biol* **1377**, 129–139 (2022).
25. Carrillo Esper R. et al. Estudio epidemiológico de la sepsis en unidades de terapia intensiva mexicanas. *Cir Ciruj* **77**, 301–308 (2009).
26. Carrillo-Esper R, Peña Pérez CA, Sosa García JO, eds. Sepsis de las bases moleculares a la campaña Para incrementar la Supervivencia. Academia Nacional de Medicina, México, 2015.
27. Cazita, P. M., Barbeiro, D. F., Moretti, A. I. S., Quintão, E. C. R. & Soriano, F. G. Human cholesteryl ester transfer protein expression enhances the mouse survival rate in an experimental systemic inflammation model: A novel role for CETP. *Shock* **30**, 590–595 (2008).
28. Charles, M. A. & Kane, J. P. New molecular insights into CETP structure and function: a review. *J Lipid Res* **53**, 1451–1458 (2012).
29. Chien, J. Y., Jerng, J. S., Yu, C. J. & Yang, P. C. Low serum level of high-density lipoprotein cholesterol is a poor prognostic factor for severe sepsis. *Crit Care Med* **33**, 1688–1693 (2005).
30. Cho KH. The Current Status of Research on High-Density Lipoproteins (HDL): A Paradigm Shift from HDL Quantity to HDL Quality and HDL Functionality. *Int J Mol Sci* **23**, 3967 (2022).
31. Chunzhi, G., Zunfeng, L., Chengwei, Q., Xiangmei, B. & Jingui, Y. Hyperin protects against LPS-induced acute kidney injury by inhibiting TLR4 and NLRP3 signaling pathways. *Oncotarget* **7**, 82602–82608 (2016).
32. Clark, R. W. et al. Assessment of cholesteryl ester transfer protein inhibitors for interaction with proteins involved in the immune response to infection. *J Lipid Res* **51**, 967–974 (2010).
33. Clinical trial number NCT0164992: The Effects of Interferon-gamma on Sepsis-induced Immunoparalysis (2016).
34. Clinical trials number NCT03332225: A Trial of Validation and Restoration of Immune Dysfunction in Severe Infections and Sepsis (PROVIDE) (2019).
35. de Bont, C. M., Boelens, W. C. & Pruijn, G. J. M. NETosis, complement, and coagulation: a triangular relationship. *Cell Mol Immunol* **16**, 19–27 (2019).

36. de Lastours, V. et al. Mortality in Escherichia coli bloodstream infections: antibiotic resistance still does not make it. *J Antimicrob Chemother* **75**, 2334–2343 (2020).
37. Delano, M. J. & Ward, P. A. The immune system's role in sepsis progression, resolution, and long-term outcome. *Immunol Rev* **274**, 330–353 (2016).
38. Duda, I., Krzych, Ł., Jędrzejowska-Szypułka, H. & Lewin-Kowalik, J. Plasma matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 as prognostic biomarkers in critically ill patients. *Open Med (Wars)* **15**, 50–56 (2020).
39. Eckert, J. K. et al. The crystal structure of lipopolysaccharide binding protein reveals the location of a frequent mutation that impairs innate immunity. *Immunity* **39**, 647–660 (2013).
40. Elkington, P. T. G., O'Kane, C. M. & Friedland, J. S. The paradox of matrix metalloproteinases in infectious disease. *Clin Exp Immunol* **142**, 12–20 (2005).
41. Emr, B. M., Alcamo, A. M., Carcillo, J. A., Aneja, R. K. & Mollen, K. P. Pediatric Sepsis Update: How Are Children Different? *Surg Infect (Larchmt)* **19**, 176–183 (2018).
42. Engelmann, C. et al. Recombinant Alkaline Phosphatase Prevents Acute on Chronic Liver Failure. *Sci Rep* **10**, 389 (2020).
43. Eschborn, S. & Weitkamp, J. H. Procalcitonin versus C-reactive protein: review of kinetics and performance for diagnosis of neonatal sepsis. *J Perinatol* **39**, 893–903 (2019).
44. Fan, S. L., Miller, N. S., Lee, J. & Remick, D. G. Diagnosing sepsis – The role of laboratory medicine. *Clin Chim Acta* **460**, 203–210 (2016).
45. Fathi, M., Markazi-Moghaddam, N. & Ramezankhani, A. A systematic review on risk factors associated with sepsis in patients admitted to intensive care units. *Aust Crit Care* **32**, 155–164 (2019).
46. Font, M. D., Thyagarajan, B. & Khanna, A. K. Sepsis and Septic Shock - Basics of diagnosis, pathophysiology and clinical decision making. *Med Clin North Am* **104**, 573–585 (2020).
47. Gao, Y. L. et al. Regulatory T Cells: Angels or Demons in the Pathophysiology of Sepsis? *Front Immunol* **13**, 829210 (2022).
48. García-González, V. et al. Key structural arrangements at the C-terminus domain of CETP suggest a potential mechanism for lipid-transfer activity. *J Struct Biol* **186**, 19–27 (2014).
49. García-González, V., Gutiérrez-Quintanar, N. & Mas-Oliva, J. The C-terminal Domain Supports a Novel Function for CETPI as a New Plasma Lipopolysaccharide-Binding Protein. *Sci Rep* **5**, 16091 (2015).
50. Genga, K. R. et al. CETP genetic variant rs1800777 (allele A) is associated with abnormally low HDL-C levels and increased risk of AKI during sepsis. *Sci Rep* **8**, 16764 (2018).
51. Golucci, A. P. B. S., Marson, F. A. L., Ribeiro, A. F. & Nogueira, R. J. N. Lipid profile associated with the systemic inflammatory response syndrome and sepsis in critically ill patients. *Nutrition* **55–56**, 7–14 (2018).
52. Gorordo-Delsol, L. A. et al. Sepsis and septic shock in emergency departments of Mexico: a multicenter point prevalence study. *Gac Med Mex* **156**, 486–492 (2020).

53. Gregoriano, C., Heilmann, E., Molitor, A. & Schuetz, P. Role of procalcitonin use in the management of sepsis. *J Thorac Dis* **12**, S5–S15 (2020).
54. Grondman, I., Pirvu, A., Riza, A., Ioana, M. & Netea, M. G. Biomarkers of inflammation and the etiology of sepsis. *Biochem Soc Trans* **48**, 1–14 (2020).
55. Gudiol, C., Albasanz-Puig, A., Cuervo, G. & Carratalà, J. Understanding and Managing Sepsis in Patients with Cancer in the Era of Antimicrobial Resistance. *Front Med (Lausanne)* **8**, 636547 (2021).
56. Guo, Y., Patil, N. K., Luan, L., Bohannon, J. K. & Sherwood, E. R. The biology of natural killer cells during sepsis. *Immunology* **153**, 190–202 (2018).
57. Gutschmann, T. et al. Dual role of lipopolysaccharide (LPS)-binding protein in neutralization of LPS and enhancement of LPS-induced activation of mononuclear cells. *Infect Immun* **69**, 6942–6950 (2001).
58. Gyawali, B., Ramakrishna, K. & Dharmoon, A. S. Sepsis: The evolution in definition, pathophysiology, and management. *SAGE Open Med* **7**, 2050312119835043 (2019).
59. Han, Y. H. et al. Enterically derived high-density lipoprotein restrains liver injury through the portal vein. *Science* **373**, eabe6729 (2021).
60. Hollenberg, S. M. & Singer, M. Pathophysiology of sepsis-induced cardiomyopathy. *Nat Rev Cardiol* **18**, 424–434 (2021).
61. Holst O, Molinaro A. Core Region and Lipid A Components of Lipopolysaccharides. In: Moran A, Brennan P, Holst O, von Itzstein, eds. *Microbial Glycobiology: Structures Relevance and Applications*. Elsevier, USA, 2010, pp: 29–56.
62. Hotchkiss, R. S. & Opal, S. M. Activating Immunity to Fight a Foe - A New Path. *N Engl J Med* **382**, 1270–1272 (2020).
63. Hotchkiss, R. S., Monneret, G. & Payen, D. Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy. *Nat Rev Immunol* **13**, 862–874 (2013).
64. Inazu, A. et al. Alternative splicing of the mRNA encoding the human cholesteryl ester transfer protein. *Biochemistry* **31**, 2352–2358 (1992).
65. Izem, L., Liu, Y. & Morton, R. E. Exon 9-deleted CETP inhibits full length-CETP synthesis and promotes cellular triglyceride storage. *J Lipid Res* **61**, 422–431 (2020).
66. Jordakieva, G. et al. Plasma MMP-9 and TIMP-1 levels on ICU admission are associated with 30-day survival. *Wien Klin Wochenschr* **133**, 86–95 (2021).
67. Khodashahi, R. & Sarjamee, S. Early lactate area scores and serial blood lactate levels as prognostic markers for patients with septic shock: a systematic review. *Infect Dis (Lond)* **52**, 451–463 (2020).
68. Kim, S.Y. Seki, E. Toll-like Receptors in Liver Disease. In: I.M. Arias, H.J. Alter, J.L. Boyer, D.E. Cohen, D.A. Shafritz, S.S. Thorgeirsson and A.W. Wolkoff, eds. *The Liver*. John Wiley & Sons Ltd, USA, 2020, pp: 737–746.
69. Klingensmith, N. J. & Coopersmith, C. M. The Gut as the Motor of Multiple Organ Dysfunction in Critical Illness. *Crit Care Clin* **32**, 203–212 (2016).
70. Kosmas, C. E., Dejesus, E., Rosario, D. & Vittorio, T. J. CETP Inhibition: Past Failures and Future Hopes. *Clin Med Insights Cardiol* **10**, 37–42 (2016).

71. Krukonis, E. S. & Thomson, J. J. Complement evasion mechanisms of the systemic pathogens *Yersiniae* and *Salmonellae*. *FEBS Lett* **594**, 2598–2620 (2020).
72. Lambden, S., Laterre, P. F., Levy, M. M. & Francois, B. The SOFA score - Development, utility and challenges of accurate assessment in clinical trials. *Crit Care* **23**, 374 (2019).
73. Leentjens, J. et al. Reversal of immunoparalysis in humans in vivo: a double-blind, placebo-controlled, randomized pilot study. *Am J Respir Crit Care Med* **186**, 838–845 (2012).
74. Lelubre, C. & Vincent, J. L. Mechanisms and treatment of organ failure in sepsis. *Nat Rev Nephrol* **14**, 417–427 (2018).
75. Li, F. et al. Procleave: Predicting Protease-specific Substrate Cleavage Sites by Combining Sequence and Structural Information. *Genomics Proteomics Bioinformatics* **18**, 52–64 (2020).
76. Liu, D. et al. Sepsis-induced immunosuppression: mechanisms, diagnosis and current treatment options. *Mil Med Res* **9**, 56 (2022).
77. Livaditi, O. et al. Neutrophil CD64 expression and serum IL-8: Sensitive early markers of severity and outcome in sepsis. *Cytokine* **36**, 283–290 (2006).
78. Luna-Reyes, I., Pérez-Hernández, E. G., Delgado-Coello, B., Ávila-Rodríguez, M. Á. & Mas-Oliva, J. Peptide VSAK maintains tissue glucose uptake and attenuates pro-inflammatory responses caused by LPS in an experimental model of the systemic inflammatory response syndrome: a PET study. *Sci Rep* **11**, 14752 (2021).
79. Mannes, M., Schmidt, C. Q., Nilsson, B., Ekdahl, K. N. & Huber-Lang, M. Complement as driver of systemic inflammation and organ failure in trauma, burn, and sepsis. *Semin Immunopathol* **43**, 773–788 (2021).
80. Martel, J. et al. Gut barrier disruption and chronic disease. *Trends Endocrinol Metab* **33**, 247–265 (2022).
81. Matsumoto, H. et al. The clinical importance of a cytokine network in the acute phase of sepsis. *Sci Rep* **8**, 13995 (2018).
82. Mazgaen, L. & Gurung, P. Recent Advances in Lipopolysaccharide Recognition Systems. *Int J Mol Sci* **21**, 379 (2020).
83. McGeachy, M. J. et al. TGF-beta and IL-6 drive the production of IL-17 and IL-10 by T cells and restrain T(H)-17 cell-mediated pathology. *Nat Immunol* **8**, 1390–1397 (2007).
84. Medzhitov, R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* **454**, 428–435 (2008).
85. Meng, J., Lien, E., Golenbock, D.T. MD-2-mediated ionic interactions between lipid A and TLR4 are essential for receptor activation. *J Biol Chem* **285**, 8695–8702 (2010).
86. Miguel-Bayarri, V. et al. Prognostic value of the biomarkers procalcitonin, interleukin-6 and C-reactive protein in severe sepsis. *Med Intensiva* **36**, 556–562 (2012).
87. Molano Franco, D. et al. Plasma interleukin-6 concentration for the diagnosis of sepsis in critically ill adults. *Cochrane Database Syst Rev* **4**, CD011811 (2019).
88. Mold, C., Rodriguez, W., Rodic-Polic, B. & Du Clos, T. W. C-reactive protein mediates protection from lipopolysaccharide through interactions with Fc gamma R. *J Immunol* **169**, 7019–7025 (2002).

89. Mollnes, T. E. & Huber-Lang, M. Complement in sepsis-when science meets clinics. *FEBS Lett* **594**, 2621–2632 (2020).
90. Munford, R. S., Weiss, J. P. & Lu, M. Biochemical transformation of bacterial lipopolysaccharides by acyloxyacyl hydrolase reduces host injury and promotes recovery. *J Biol Chem* **295**, 17842–17851 (2020).
91. Murch, O., Collin, M., Hinds, C. J. & Thiemermann, C. Lipoproteins in inflammation and sepsis. I. Basic science. *Intensive Care Med* **33**, 13–24 (2007).
92. Nier, A. et al. Adipokines and endotoxemia correlate with hepatic steatosis in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Nutrients* **12**, 699 (2020).
93. Onaona U, Boudourakis. Acute Abdomen and abdominal sepsis. In: Mayer SA, Shapiro JM, Gidwani UK, Oropello JM, eds. *Critical Care*. Wiley Blackwell, US, 2020, pp: 321–325.
94. Otani, S. & Coopersmith, C. M. Gut integrity in critical illness. *J Intensive Care* **7**, 17 (2019).
95. Parlesak, A., Schäfer, C., Schütz, T., Bode, J. C. & Bode, C. Increased intestinal permeability to macromolecules and endotoxemia in patients with chronic alcohol abuse in different stages of alcohol-induced liver disease. *J Hepatol* **32**, 742–747 (2000).
96. Pérez-Hernández, E. G., Delgado-Coello, B., Luna-Reyes, I. & Mas-Oliva, J. New insights into lipopolysaccharide inactivation mechanisms in sepsis. *Biomed Pharmacother* **141**, 111890 (2021).
97. Pool, R., Gomez, H. & Kellum, J. A. Mechanisms of Organ Dysfunction in Sepsis. *Crit Care Clin* **34**, 63–80 (2018).
98. Pugin, J. et al. Human neutrophils secrete gelatinase B in vitro and in vivo in response to endotoxin and proinflammatory mediators. *Am J Respir Cell Mol Biol* **20**, 458–464 (1999).
99. Qiu, X. et al. Crystal structure of cholesteryl ester transfer protein reveals a long tunnel and four bound lipid molecules. *Nat Struct Mol Biol* **14**, 106–113 (2007).
100. Rosadini, C. V. & Kagan, J. C. Early innate immune responses to bacterial LPS. *Curr Opin Immunol* **44**, 14–19 (2017).
101. Rudd, K. E. et al. Global, regional, and national sepsis incidence and mortality, 1990–2017: analysis for the Global Burden of Disease Study. *The Lancet* **395**, 200–211 (2020).
102. Sakr, Y. et al. Sepsis in Intensive Care Unit Patients: Worldwide Data from the Intensive Care over Nations Audit. *Open Forum Infect Dis* **5**, ofy313 (2018).
103. Saud Al-Bagmi, M. et al. An efficient methodology for the purification of date palm peroxidase: Stability comparison with horseradish peroxidase (HRP). *Saudi J Biol Sci* **26**, 301–307 (2019).
104. Schumann, R. R. et al. Structure and function of lipopolysaccharide binding protein. *Science* **249**, 1429–1431 (1990).
105. Singer, M. et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA* **315**, 801–810 (2016).
106. Śmiechowicz, J. The Rationale and Current Status of Endotoxin Adsorption in the Treatment of Septic Shock. *J Clin Med* **11**, 619 (2022).
107. Tabas, I. & Glass, C. K. Anti-inflammatory therapy in chronic disease: challenges and opportunities. *Science* **339**, 166–172 (2013).

108. Tan, Y. & Kagan, J. C. A cross-disciplinary perspective on the innate immune responses to bacterial lipopolysaccharide. *Mol Cell* **54**, 212–223 (2014).
109. Tanaka, S. et al. High-density lipoproteins during sepsis: from bench to bedside. *Crit Care* **24**, 134 (2020).
110. Theprungsirikul, J., Skopelja-Gardner, S. & Rigby, W. F. C. Killing three birds with one BPI: Bactericidal, opsonic, and anti-inflammatory functions. *J Transl Autoimmun* **4**, 100105 (2021).
111. Thuy, S. et al. Nonalcoholic fatty liver disease in humans is associated with increased plasma endotoxin and plasminogen activator inhibitor 1 concentrations and with fructose intake. *J Nutr* **138**, 1452–1455 (2008).
112. Van Der Poll, T., Van De Veerdonk, F. L., Scicluna, B. P. & Netea, M. G. The immunopathology of sepsis and potential therapeutic targets. *Nat Rev Immunol* **17**, 407–420 (2017).
113. Vanlaere, I. & Libert, C. Matrix metalloproteinases as drug targets in infections caused by gram-negative bacteria and in septic shock. *Clin Microbiol Rev* **22**, 224–239 (2009).
114. Vesny, C. J., Kitchens, R. L., Wolfbauer, G., Albers, J. J. & Munford, R. S. Lipopolysaccharide-binding protein and phospholipid transfer protein release lipopolysaccharides from gram-negative bacterial membranes. *Infect Immun* **68**, 2410–2417 (2000).
115. Vincent, J. L. et al. International study of the prevalence and outcomes of infection in intensive care units. *JAMA* **302**, 2323–2329 (2009).
116. Vincent, J. L. et al. Reducing mortality in sepsis: new directions. *Crit Care* **6**, S1–S18 (2002).
117. von Eckardstein, A., Nordestgaard, B. G., Remaley, A. T. & Catapano, A. L. High-density lipoprotein revisited: biological functions and clinical relevance. *Eur Heart J* **44**, 1394–1407 (2023).
118. Vreugdenhil, A. C. E., Snoek, A. M. P., Van 'T Veer, C., Greve, J. W. M. & Buurman, W. A. LPS-binding protein circulates in association with apoB-containing lipoproteins and enhances endotoxin-LDL/VLDL interaction. *J Clin Invest* **107**, 225–234 (2001).
119. Wang X, Quinn P. Endotoxins: Lipopolysaccharides of Gram-Negative Bacteria. In: Wang X, Quinn P, eds. *Endotoxins: Structure, Function and Recognition*. Springer, Netherlands, 2010, pp: 3–25.
120. Ward, P. A. The dark side of C5a in sepsis. *Nat Rev Immunol* **4**, 133–142 (2004).
121. Woznica, E. A., Inglot, M., Woznica, R. K. & Lysenko, L. Liver dysfunction in sepsis. *Adv Clin Exp Med* **27**, 547–551 (2018).
122. Yao, Z. et al. Blood-Borne Lipopolysaccharide Is Rapidly Eliminated by Liver Sinusoidal Endothelial Cells via High-Density Lipoprotein. *J Immunol* **197**, 2390–2399 (2016).
123. Yassen, K. A., Galley, H. F. & Webster, N. R. Matrix metalloproteinase-9 concentrations in critically ill patients. *Anaesthesia* **56**, 729–732 (2001).
124. ySchulte, W., Bernhagen, J. & Bucala, R. Cytokines in sepsis: Potent immunoregulators and potential therapeutic targets - An updated view. *Mediators Inflamm* **2013**, 165974 (2013).
125. Zhou, X. et al. I-TASSER-MTD: a deep-learning-based platform for multi-domain protein structure and function prediction. *Nat Protoc* **17**, 2326–2353 (2022).

14. ANEXOS

14.1 Datos demográficos y clínicos de los sujetos controles y pacientes con infección, sepsis o choque séptico

	Controles (n=47)	Pacientes con infección (n=50)	Pacientes con sepsis (n=28)	Pacientes con choque séptico (n=27)	p	
Edad (años)	36.0 (30.0-45.0)	54.5 (39.0-58.0)	46.5 (38.3-55.0)	47.0 (33.0-56.0)	Control vs infección	0.0036
Género, masculino	22 (46.8 %)	27 (54.0 %)	12 (42.9 %)	16 (59.3 %)	0.576	
Género, femenino	25 (53.2 %)	23 (46.0 %)	16 (57.1 %)	11 (40.7 %)		
PCR (mg/L)	0.14 (0.08-0.21)	10.75 (4.80-16.87)	15.50 (8.33-23.80)	15.10 (10.95-19.89)	Control vs infección Control vs sepsis Control vs choque séptico	<0.001 <0.001 <0.001
PCT (ng/mL)	0.02 (0.02-0.03)	3.10 (1.33-8.58)	11.60 (3.53-36.05)	10.10 (4.93-18.10)	Control vs infección Control vs sepsis Control vs choque séptico	<0.001 <0.001 <0.001
CETPI (nM)	11.58 (8.05-14.71)	13.54 (9.99-26.65)	15.65 (9.73-25.57)	16.16 (11.30-26.11)	Control vs infección Control vs sepsis Control vs choque séptico	<0.05 <0.05 <0.01
IL-6 (pg/mL)	3.20 (3.20-9.31)	61.81 (21.56-370.50)	166.70 (56.98-1033.00)	319.00 (105.10-1870.00)	Control vs infección Control vs sepsis Control vs choque séptico	<0.001 <0.001 <0.001
IFN-γ (pg/mL)	1.28 (0.64-3.20)	8.58 (3.84-27.01)	3.91 (2.16-14.06)	3.20 (2.23-9.21)	Control vs infección Control vs sepsis Control vs choque séptico	<0.001 <0.001 <0.001
IL-10 (pg/mL)	9.86 (6.14-12.98)	93.60 (49.23-387.50)	229.40 (78.42-890.20)	251.90 (111.00-2239.00)	Control vs infección Control vs sepsis Control vs choque séptico	<0.001 <0.001 <0.001
IL-12p70 (pg/mL)	3.20 (0.64-3.20)	3.20 (1.64-5.29)	3.20 (2.43-4.41)	3.20 (2.32-4.93)	Control vs infección Control vs sepsis Control vs choque séptico	<0.05 0.052 <0.05
IL-1β (pg/mL)	1.26 (0.57-3.20)	1.59 (0.79-3.20)	3.20 (1.31-3.71)	2.89 (0.97-4.00)	Control vs infección Control vs sepsis Control vs choque séptico	0.299 <0.05 0.067
IL-8 (pg/mL)	3.59 (2.46-9.72)	55.40 (21.74-218.30)	131.40 (44.38-605.60)	182.60 (97.34-621.70)	Control vs infección Control vs sepsis Control vs choque séptico	<0.001 <0.001 <0.001
TNF-α (pg/mL)	18.86 (13.93-24.92)	87.74 (58.38-160.40)	126.10 (60.66-253.10)	139.70 (88.18-271.10)	Control vs infección Control vs sepsis Control vs choque séptico	<0.001 <0.001 <0.001

14.2 Lista de publicaciones generadas durante el programa de doctorado

Pérez-Hernández E.G., De la Puente-Díaz de León V., Luna-Reyes I., Delgado-Coello B., Sifuentes-Osornio J. & Mas-Oliva J. The cholesteryl-ester transfer protein isoform (CETPI) and derived peptides: new targets in the study of Gram-negative sepsis. *Mol Med* **28**, 157 (2022).

Pérez-Hernández, E. G., Delgado-Coello, B., Luna-Reyes, I. & Mas-Oliva, J. New insights into lipopolysaccharide inactivation mechanisms in sepsis. *Biomed Pharmacother* **141**, 111890 (2021).

14.3 Lista de publicaciones en colaboración

Luna-Reyes, I., **Pérez-Hernández, E. G.**, Delgado-Coello, B., Ávila-Rodríguez, M. Á. & Mas-Oliva, J. Peptide VSAK maintains tissue glucose uptake and attenuates pro-inflammatory responses caused by LPS in an experimental model of the systemic inflammatory response syndrome: a PET study. *Sci Rep* **11**, 14752 (2021).

Luna-Reyes, I., **Pérez-Hernández, E. G.**, Delgado-Coello, B. & Mas-Oliva, J. Peptides as Therapeutic Molecules to Neutralize Gram-negative Bacterial Lipopolysaccharides in Sepsis and Septic Shock. *Arch Med Res* **52**, 798-807 (2021).

Martínez-Cortés, F., Domínguez-Romero, A.N., **Pérez-Hernández, E.G.**, Orozco-Delgado, D. L., Avila, S., Odales, J., Guzman Valle, J., Gevorkian, G., & Manoutcharian, K. Tumor antigen-unbiased variable epitope library contains mimotopes with antitumor effect in a mouse model of breast cancer. *Mol Immunol* **157**, 91-100 (2023).

14.4 Artículo original: The cholesteryl-ester transfer protein isoform (CETPI) and derived peptides: new targets in the study of Gram-negative sepsis

Pérez-Hernández et al. *Molecular Medicine* (2022) 28:157
<https://doi.org/10.1186/s10020-022-00585-3>

Molecular Medicine

RESEARCH ARTICLE

Open Access



The cholesteryl-ester transfer protein isoform (CETPI) and derived peptides: new targets in the study of Gram-negative sepsis

Eréndira G. Pérez-Hernández¹, Víctor De la Puente-Díaz de León², Ismael Luna-Reyes¹, Blanca Delgado-Coello¹, José Sifuentes-Osornio³ and Jaime Mas-Oliva^{1*} 

Abstract

Background: Sepsis is a syndrome where the dysregulated host response to infection threatens the life of the patient. The isoform of the cholesteryl-ester transfer protein (CETPI) is synthesized in the small intestine, and it is present in human plasma. CETPI and peptides derived from its C-terminal sequence present the ability to bind and deactivate bacterial lipopolysaccharides (LPS). The present study establishes the relationship between the plasma levels of CETPI and disease severity of sepsis due to Gram-negative bacteria.

Methods: Plasma samples from healthy subjects and patients with positive blood culture for Gram-negative bacteria were collected at the Intensive Care Unit (ICU) of INCMNSZ (Mexico City). 47 healthy subjects, 50 patients with infection, and 55 patients with sepsis and septic shock, were enrolled in this study. CETPI plasma levels were measured by an enzyme-linked immunosorbent assay and its expression confirmed by Western Blot analysis. Plasma cytokines (IL-1 β , TNF α , IL-6, IL-8, IL-12p70, IFN γ , and IL-10) were measured in both, healthy subjects, and patients, and directly correlated with their CETPI plasma levels and severity of clinical parameters. Sequential Organ Failure Assessment (SOFA) scores were evaluated at ICU admission and within 24 h of admission. Plasma LPS and CETPI levels were also measured and studied in patients with liver dysfunction.

Results: The level of CETPI in plasma was found to be higher in patients with positive blood culture for Gram-negative bacteria than in control subjects, showing a direct correlation with their SOFA values. Accordingly, septic shock patients showing a high CETPI plasma concentration, presented a negative correlation with cytokines IL-8, IL-1 β , and IL-10. Also, in patients with liver dysfunction, since higher CETPI levels correlated with a high plasma LPS concentration, LPS neutralization carried out by CETPI might be considered a physiological response that will have to be studied in detail.

Conclusions: Elevated levels of plasma CETPI were associated with disease severity and organ failure in patients with Gram-negative bacteraemia, defining CETPI as a protein implicated in the systemic response to LPS.

Keywords: CETPI, LPS, Gram-negative bacteria, Sepsis, Septic shock, CETP

Background

Each year an elevated number of people worldwide experience an episode of sepsis, where millions die as a result of its associated complications (Singer et al. 2016; Reinhart et al. 2017). In low- and middle-income countries, the burden of sepsis is even higher and represents

*Correspondence: jmas@ifc.unam.mx

¹ Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 Ciudad de México, Mexico

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s) 2022. **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

one of the leading causes of death in the general population, where a complex interaction of factors such as the causative pathogen, timely diagnosis, host immunity, and access to quality care, determine lethality in sepsis (Cecconi et al. 2018; Rudd et al. 2020). Sepsis occurs when the host produces an unbalanced response to an infection, that if not diagnosed and treated early, can lead to profound circulatory and cellular dysfunction, progressing to septic shock (Cecconi et al. 2018). Gram-negative bacteria are the most frequent etiological agents of sepsis worldwide (Font et al. 2020), presenting in their outer membrane LPS. The physiological response to LPS is mediated by stimulation of the Toll-like receptor 4, that includes the release of pro-inflammatory cytokines and reactive oxygen species, causing endothelial damage and vasodilation, leading to hypo-perfusion and capillary fluid leakage. Additionally, cytokines activate the coagulation cascade, resulting in capillary microthrombi, and ultimately organ ischemia (Van Der Poll et al. 2017). LPS released into the circulation interact with lipoproteins, such as the High-Density Lipoproteins (HDL) and Low-Density Lipoproteins (LDL), but importantly with lipopolysaccharide-binding proteins (Vreugdenhil et al. 2001), which eventually promote LPS clearance through the hepatobiliary system (Pérez-Hernández et al. 2021). The LPS-binding protein and the bactericidal/permeability-increasing protein are closely related proteins that bind LPS, and present an important role in the host response to acute infections involving Gram-negative bacteria (Krasity et al. 2011). These proteins are members of the LTP/LPS-binding family of lipid binding and transfer proteins which also includes the cholesteryl-ester transfer protein (CETP), the phospholipid transfer protein (Beamer 2003), and now the cholesteryl-ester transfer protein isoform (CETPI), originally described by our research group years ago (Alonso et al. 2003; García-González et al. 2015).

CETPI was identified and found to be synthesized in the small intestine, and it is present in human plasma (Alonso et al. 2003). The only structural difference between CETP and CETPI resides in their C-terminal domain, where human CETPI presents a 41 C-terminal segment containing prolines, and a disordered conformation, instead of the normal 24 residues present as an α -helix in CETP (Alonso et al. 2003). Peptides derived from the C-terminal domain of CETPI bind LPS through electrostatic interactions, and the intravenous administration of one of these peptides, called VSAK, attenuates the harmful effects produced by LPS in a model of the systemic inflammatory response syndrome (Luna-Reyes et al. 2021). In addition, considering that the expression of CETPI in intestinal cells is upregulated in the presence of LPS (García-González et al. 2015), we aimed to

evaluate the relation of the CETPI plasma levels with disease severity in Gram-negative sepsis. For this purpose, during the present study we collected plasma samples along a period of two years at the ICU of Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán” (INCMNSZ), a tertiary care center located in Mexico City. In comparison to healthy subjects, we measured the plasma CETPI concentration in patients presenting infection, sepsis, and septic shock, and examined the correlation between CETPI with the plasma levels of LPS and a series of cytokines in all patients.

Our results suggest that an increased plasma level of CETPI in patients, associated to the presence of peptides derived from this protein, in correlation with their ability to bind and inactivate LPS, might be considered as a defense mechanism involved in the emergency host response to a Gram-negative infection, and therefore, also as indicators of disease severity.

Materials and methods

Study design

For this study, plasma samples from healthy subjects and patients with infection, sepsis, and septic shock with positive blood culture for Gram-negative bacteria were collected over a period of two years at the ICU of INCMNSZ (Mexico City). To quantify CETPI in plasma we employed an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The pro- and anti-inflammatory plasma cytokines were measured using the human cytokine magnetic bead panel Milliplex Map Kit. We determined the relationship between plasma levels of LPS and CETPI in patients with liver dysfunction. Also, the expression of CETPI in plasma was confirmed by Western Blot analysis, and the bands recognized by the anti-CETPI antibody identified by HPLC-mass spectrometry. Depletion of plasma albumin was used to determine the possible binding of peptides derived from the C-terminal domain of CETPI to this protein.

Study population

For the development of this study at INCMNSZ, 47 healthy subjects, and 105 patients with infection, sepsis, and septic shock between 18 and 65 years of age were enrolled. All subjects provided written informed consent prior to the participation in the study. As controls, a total of 47 samples were obtained from healthy volunteer blood donors at the blood bank of INCMNSZ. The inclusion criteria were body mass index < 30 kg per m², normal vital signs, oxygen saturation > 90%, with no evidence of infection or acute/chronic illnesses. Exclusion criteria included having consumed any drug seven days before sample collection, and the presence of an

infection, inflammatory, and traumatic process in the six weeks before the acceptance for inclusion in the study.

Patients were divided into three groups: infection, sepsis, and septic shock. Baseline values for SOFA scores were determined upon patient arrival at the ICU, and the Delta SOFA score was calculated as the change in total SOFA score between baseline values and values obtained 24 h after ICU admission. The infection group included 50 subjects without evidence of organ failure defined by the Delta SOFA score lower than 2 points. The sepsis group comprised 28 sepsis patients with infection and organ failure defined as Delta SOFA score of 2 points or more. The septic shock group included 27 patients with sepsis and persisting hypotension requiring vasopressors to maintain a mean arterial pressure of 65 mmHg or greater and having a serum lactate level greater than 2 mmol/L (>18 mg/dL) in the absence of hypovolemia. All patients had positive blood cultures for Gram-negative bacteria. Patients with trauma, renal replacement therapy, or patients that have received anti-inflammatory drugs 48 h prior to sample collection were excluded from the study.

Patients were clinically assessed by recording vital signs, mean arterial pressure, C-Reactive Protein (CRP), hemoglobin, albumin, procalcitonin (PCT), bilirubin, lactate, creatinine, HDL, leucocytes, platelets, and time of antibiotic treatment. Also, demographic data and baseline comorbidities (heart disease, lung disease, chronic liver dysfunction, immunosuppression, cancer, endocrinopathy, dyslipidemia, and autoimmune disease) were collected at the time of the patient's admission. Patients were considered immunocompromised if they had severe neutropenia, and/or received steroid treatment or cytotoxic drugs. The source of infection was categorized into eight groups: abdomen, lung, urinary tract, soft tissue, sinusitis, empyema, central nervous system, and intravenous catheter. The criteria employed to define patients with liver dysfunction were: patients with known liver disease, basal SOFA score ≥ 1 in liver and coagulation item, or a previous diagnosis of cirrhosis.

This study was reviewed and approved by the Ethics Committee of the INCMNSZ (Reference number: 2252).

Sample collection

All plasma samples were collected within 12 h of ICU admission, then samples were centrifuged for 10 min at 1500 rpm, and aliquots were immediately stored at -80°C . Blood cultures were taken in all patients upon arrival to the ICU. Only samples with positive blood culture for Gram-negative bacteria were included in the study.

Western blot analysis

Protein from plasma samples was measured using the DC Protein Assay (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). A total of 30 μg of protein were loaded and separated on 8% SDS-PAGE, and further transferred to PVDF membranes (Immobilon-P, Merck Millipore, Billerica, MA, USA). Membranes were blocked using 10% of Blotting-Grade Blocker (Bio-Rad), incubated with anti-CETPI (1:4000) overnight at 4°C , and washed six times with TBST. Anti-CETPI antibodies from Alpha Diagnostic International Inc. (San Antonio, TX, USA), consist of antibodies raised using a synthetic peptide that corresponds to the last 12 amino acids of the C-terminal segment of CETPI. Membranes were incubated with a rabbit peroxidase-conjugated anti-chicken IgY secondary antibody (1:30,000) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) for 60 min at room temperature (RT). Antibodies were diluted in a 5% of Blotting-Grade Blocker (Bio-Rad) solution. Protein bands were visualized using Immobilon[®] Western from Merck Millipore on X-OMAT autoradiographic plates (Kodak, Rochester, NY, USA).

Plasma cytokine measurements

For the measurement of cytokine levels in plasma, the human cytokine magnetic bead panel Milliplex[®] Map Kit (Merck Millipore) was used to assess the levels of IL-1 β , TNF α , IL-6, IL-8, IL-12 (p70), IFN γ , and IL-10. Plasma samples were analyzed in duplicate, and the procedure was carried out according to the manufacturer instructions. Briefly, 25 μL of control and patient plasmas were incubated with antibody-immobilized beads overnight at 4°C . Bead-complexes, after being rinsed, were incubated with 25 μL of biotinylated detection antibody for 1 h with agitation. Next, 25 μL of Streptavidin-Phycocerythrin were added and incubated for 30 min at RT with agitation. After washing the plate, 150 μL of Drive Fluid were added to all wells. Plates were read on a MAGPIX employing the xPONENT software, and the Median Fluorescent Intensity analyzed.

Plasma CETPI measured by ELISA

CETPI plasma levels were measured by an ELISA test employing 96-well Maxisorp plates (Thermo Fisher Scientific). 50 μL of dilutions of plasma samples were added into the appropriate wells and incubated overnight at 4°C , then the plate washed out one time with Phosphate-Buffered Saline (PBS). The plate was blocked for 2 h using 2.5% Bovine Serum Albumin plus 2.5% of Blotting-Grade Blocker (Bio-Rad), and then washed out three times with PBS. Next, anti-CETPI (1:5000) antibodies were added into each well and the plate incubated for 90 min at 37°C . The plate was washed out three times with PBS and

further incubated with a rabbit peroxidase-conjugated anti-chicken IgY secondary antibody (Thermo Fisher Scientific) for 30 min at 37 °C. Finally, the plate was washed with PBS, TMB substrate was added to each well, and incubated for 15 min at RT. To stop the reaction, 50 µL of 2 M H₂SO₄ were added and the absorbance of samples measured at 450 nm using the Synergy HT microplate reader (BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA). CETPI plasma concentration of all samples was determined using a standard curve.

Casein protease activity assay

Plasma protease activity was determined employing the Protease Activity Assay Kit (Abcam, Cambridge, UK), which uses FITC-Casein as a general protease substrate. Plasma samples were incubated with the protease substrate for 30 min at 25 °C, and fluorescence was measured at Ex/Em = 485/ 550 nm immediately after the protease substrate addition (R1) and at 30 min, after the incubation time (R2). Differences between both lectures (R2–R1), indicated the fluorescence of the unquenched FITC generated by the proteolytic digestion of the substrate. The plasma protease activity was reported as mU/mL. One unit was defined as the amount of protease that cleaves the substrate, to yield an amount of fluorescence equivalent to 1.0 µmol of unquenched FITC per minute at 25 °C.

Plasma LPS quantification

Plasma LPS was measured using a competitive inhibition enzyme immunoassay (Cloud-Clone Corp, Houston, TX, USA). This assay employs a monoclonal antibody specific to lipopolysaccharide pre-coated onto a microplate. 50 µL of dilutions of standard, blank, and samples were added into the appropriate wells. A competitive inhibition reaction was launched between biotin-labeled lipopolysaccharide and the unlabeled lipopolysaccharide present in the samples with the pre-coated antibody. After incubation for 1 h at 37 °C, the unbound conjugate is washed off, and then Avidin conjugated to HRP added to each well. The plates were incubated for 30 min at 37 °C and washed five times. The substrate solution was added to each well and after the incubation time (30 min at 37 °C), 50 µL of stop reaction solution were added. The absorbance was measured at 450 nm using a Synergy HT microplate reader (BioTek Instruments, Inc.). The intensity of color developed represents the amount of bound HRP that is inversely proportional to the concentration of LPS in the sample.

Albumin depletion

Albumin depletion of plasma samples was performed using the Pierce Albumin Depletion Kit (Thermo Fisher

Scientific). The kit consists of a high-capacity, immobilized Cibacron Blue dye agarose resin, which binds the albumin present in the plasma. Briefly, the resin was transferred into a spin column to be washed employing the Binding/Wash Buffer. After, the plasma sample was added and incubated for 1–2 min at RT. The spin column was centrifuged, and the flow-through was re-applied to the spin column and incubated for another 1–2 min at RT to ensure maximal albumin binding. After centrifugation, we stored the flow-through and placed the spin column in a new collection tube. The column was washed to release unbound proteins and albumin eluted with a solution of 20 mM sodium phosphate, 250 mM sodium thiocyanate, pH 7.2. The protein content was determined in the collected fractions and were further analyzed by SDS-PAGE.

Statistical analysis

Data are expressed as frequencies for categorical variables and as a mean with standard deviation (SD) or median with interquartile range (IQR) for continuous variables according to their distribution as assessed by Shapiro–Wilk normality test. When variables were not normally distributed, differences between groups were analyzed employing the Mann Whitney U-test, or the Kruskal–Wallis test with the Dunn's Multiple Comparison Test. In the case of variables with a normal distribution, the statistical analysis was performed using Student's t-tests.

The plasma values of CETPI and cytokines were transformed to logarithm (log 10) before performing the correlations analysis to normalize the distribution of data. Correlations between cytokines and CETPI plasma levels were assessed by the Pearson's correlation coefficient. Statistical test, significance level, n-numbers for each analysis are stated in figure legends. Differences were considered statistically significant at $p < 0.05$. The statistical analyses were performed employing the GraphPad Prism software (GraphPad Software, La Jolla, CA), and JMP 16.1.0 (SAS Institute, Cary NC, USA).

Results

Subjects and clinical parameters

Blood samples from 47 healthy subjects attending the blood bank at INCMNSZ for blood donation, were collected as controls, this group included 22 males and 25 females. Also, a total of 105 ICU patients were enrolled in this study; 50 patients with infection (Delta SOFA score < 2), and 55 patients with sepsis and septic shock (Delta SOFA score > 2), all patients with positive blood culture for Gram-negative bacteria (Table 1). The mean age in the overall population was 50.00 years

Table 1 Demographic, clinical and laboratory parameters of patients

	Total (n = 105)	Patients with Delta SOFA score < 2 (n = 50)	Patients with Delta SOFA score > 2 (n = 55)	p value
Gender, male	50 (47.62%)	27 (54.00%)	23 (41.82%)	0.24
Gender, female	55 (52.38%)	23 (46.00%)	32 (58.18%)	
Age (years)	50.00 (37.50–57.50)	54.50 (39.00–58.00)	47.00 (35.00–55.00)	0.17
Etiologic agent (%)				
<i>Escherichia coli</i>	61 (58.10%)	28 (56.00%)	33 (60.00%)	0.36
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	12 (11.43%)	7 (14.00%)	5 (9.09%)	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	12 (11.43%)	8 (16.00%)	4 (7.27%)	
Site of infection (%)				
Abdominal	71 (67.62%)	32 (64.00%)	39 (70.91%)	0.15
Urinary tract	20 (19.05%)	12 (24.00%)	8 (14.55%)	
Intravenous catheter	5 (4.76%)	3 (6.00%)	2 (3.64%)	
Pulmonary	4 (3.81%)	0 (0.00%)	4 (7.27%)	
Comorbidities				
Dyslipidemia	61 (58.10%)	32 (64.00%)	29 (52.73%)	0.89
Immunosuppression	55 (52.38%)	26 (52.00%)	29 (52.73%)	
Cancer	55 (52.38%)	28 (56.00%)	27 (49.09%)	
Liver dysfunction	27 (25.71%)	12 (24.00%)	15 (27.27%)	
Laboratory tests				
CRP (mg/L)	14.00 (7.30–19.80)	10.75 (4.80–16.87)	15.20 (9.47–21.50)	<0.05
PCT (ng/mL)	7.40 (1.80–17.90)	3.10 (1.33–8.58)	11.40 (3.90–24.33)	<0.01
Hemoglobin (g/dL)	10.27 ± 2.63	10.38 ± 2.62	10.17 ± 2.66	0.47
Serum Albumin (g/dL)	3.17 ± 0.73	3.26 ± 0.70	3.09 ± 0.76	0.23
Total bilirubin (mg/dL)	1.40 (0.62–4.90)	0.90 (0.60–2.93)	2.20 (0.90–7.40)	<0.01
Lactate (mmol/L)	2.40 (1.40–4.00)	1.65 (1.18–2.60)	3.45 (1.63–4.20)	<0.01
Creatinine (mg/dL)	0.90 (0.65–1.40)	0.80 (0.50–1.06)	1.00 (0.70–1.90)	<0.01
White blood cells (× 10 ⁹ /L)	6.95 (0.35–12.30)	7.25 (0.60–12.18)	6.65 (0.10–12.30)	0.87
Platelet (× 10 ³ /μL)	107.0 (21.00–243.00)	162.50 (26.25–265.00)	100.00 (16.00–216.00)	0.19
HDL (mg/dL)	35.19 ± 17.71	36.88 ± 17.57	33.65 ± 17.89	0.40
Total cholesterol (mg/dL)	138.50 (113.30–181.80)	139.50 (109.00–201.30)	136.00 (115.80–165.50)	0.56
LDL (mg/dL)	75.00 (48.25–109.30)	77.00 (48.75–118.30)	73.00 (47.50–101.50)	0.46
Delta SOFA score	0–11	0–1	2–11	

Data are reported as mean (± SD), median (IQR), and n (%). Comparisons were performed with Fisher's exact test or Pearson's Chi-squared test, and either Mann-Whitney U test or Student's t-test. C-reactive protein (CRP); procalcitonin (PCT); High-Density Lipoprotein (HDL); Low-Density Lipoprotein (LDL); sequential organ failure assessment (SOFA)

(37.50–57.50), of which 55 (52.38%) were female and 50 (47.62%) male.

In all patients, the most prevalent bacteria isolated from the bloodstream was *Escherichia coli* (58.10%), and the main sites of infection were the abdomen (67.62%), and the urinary tract (19.05%) (Table 1). In patients with Delta SOFA score < 2, the main comorbidities corresponded to dyslipidemia (64.00%), cancer (56.00%), immunosuppression (52.00%), and liver dysfunction (24.00%). In patients with Delta SOFA score > 2, dyslipidemia (52.73%), immunosuppression (52.73%), cancer (49.09%), and liver dysfunction (27.27%) were also the principal comorbidities (Table 1).

The main clinical parameters of patients are shown in Table 1, CRP levels were lower in patients with Delta SOFA score < 2 (10.75 [4.80–16.87]), than in patients with Delta SOFA score > 2 (15.20 [9.47–21.50], $p < 0.05$). PCT levels were also higher in patients with Delta SOFA score > 2 (11.40 [3.90–24.33]) compared to patients with Delta SOFA score < 2 (3.10 [1.33–8.58], $p < 0.01$). Also, significant differences were observed in the levels of total bilirubin, lactate, and creatinine between patients with Delta SOFA score > 2, and those with Delta SOFA score < 2 (Table 1).

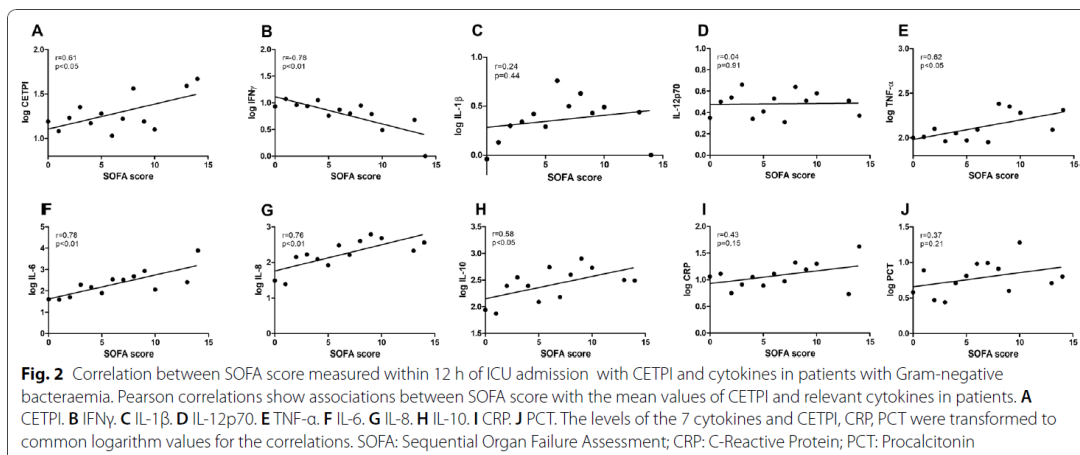
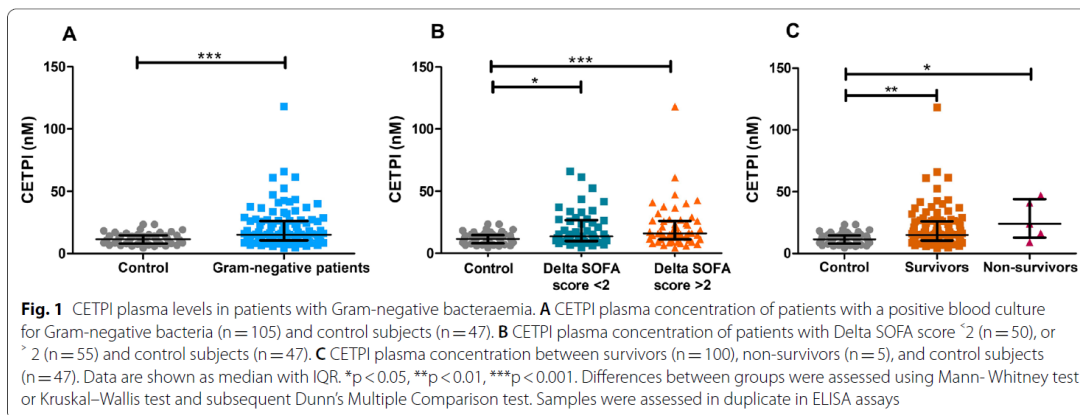
The concentration of CETPI in plasma is higher in patients with Gram-negative bacteraemia

To explore the relation between CETPI and disease severity in infections due to Gram-negative bacteria, circulating levels of CETPI were measured in the plasma from controls and patients with infection (Delta SOFA score <2), sepsis, and septic shock (Delta SOFA score >2) employing ELISA. We found that patients with an infectious process due to Gram-negative bacteria had elevated circulating levels of CETPI when compared to control subjects (15.21 nM [10.52–26.23] vs 11.58 nM [8.05–14.71], $p < 0.001$) (Fig. 1A), showing a clear difference in the distribution of the data between controls and patients above 18 nM (Additional file 1: Fig. S1). Although differences in CETPI plasma levels were found between control subjects and patients with Delta SOFA score <2 (11.58 nM [8.05–14.71] vs 13.54 nM [9.99–26.65],

$p < 0.05$), and with those with Delta SOFA score >2 (11.58 nM [8.05–14.71] vs 16.00 nM [11.30–26.11], $p < 0.001$), no differences were observed between patients grouped according with the Delta SOFA score greater or less than 2 (Fig. 1B). Patients who had a severe outcome (in-hospital death), did not have significantly differences in CETPI levels than those with a non-severe outcome (Fig. 1C).

CETPI and plasma cytokines correlate with SOFA score in patients with Gram-negative bacteraemia

In parallel to the determination of plasma levels of CETPI, plasma cytokine concentrations of IL-1 β , TNF α , IL-6, IL-8, IL-12 (p70), IFN γ , and IL-10 were also measured (Fig. 2). Given that higher CETPI levels were found in patients compared with healthy subjects, and considering its ability to bind LPS, a correlation between



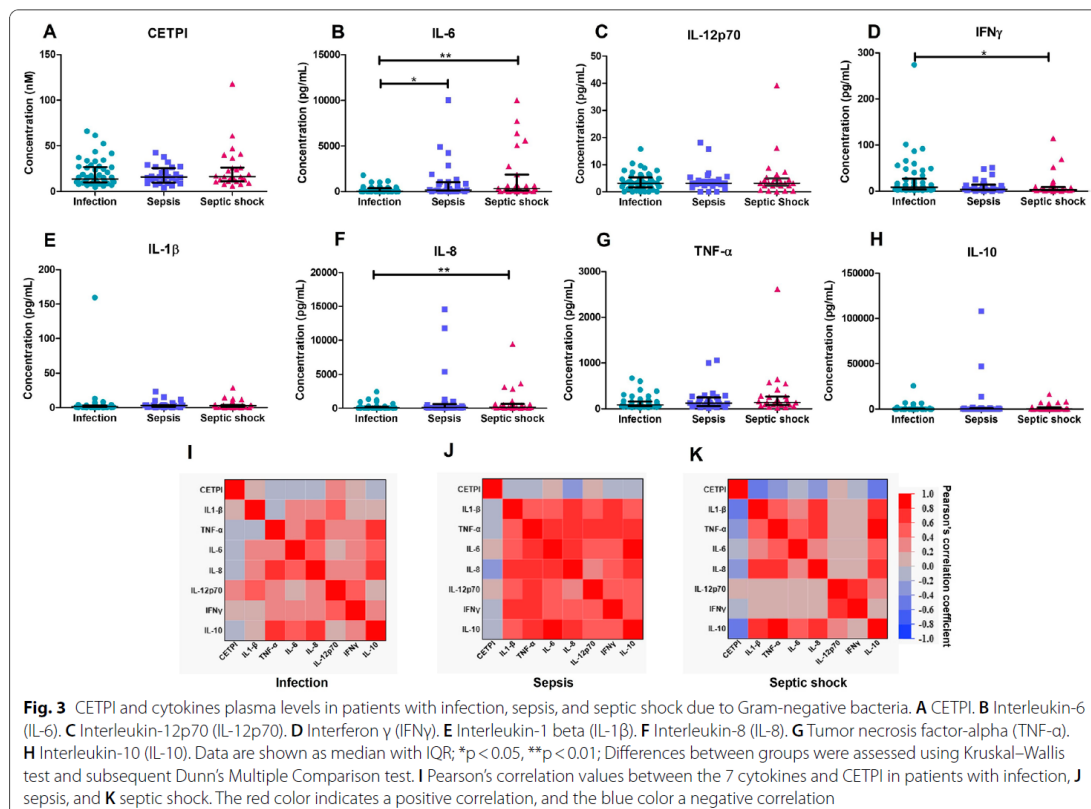
SOFA scores (measured within 12 h of ICU admission) with CETPI, and plasma cytokines were carried out. We found that SOFA scores positively correlate with CETPI ($r=0.61$, $p<0.05$), TNF- α ($r=0.62$, $p<0.05$), IL-6 ($r=0.78$, $p<0.01$), IL-8 ($r=0.76$, $p<0.01$), and IL-10 ($r=0.58$, $p<0.05$); whereas a negative correlation was found with IFN γ ($r=-0.78$, $p<0.01$) (Fig. 2A–J).

CETPI plasma levels negatively correlate with IL-1 β , IL-8, and IL-10 in septic shock patients

To explore the association between CETPI plasma levels with cytokines implicated in the pathophysiology of Gram-negative infections, a correlation was carried out. First, we analyzed CETPI and cytokine expression in patients with infection, sepsis, and septic shock (Fig. 3A–H). Although no differences in CETPI levels were found in the three patient groups, in septic shock patients CETPI levels tend to increase (Fig. 3A) (Additional file 1: Fig. S1); also, significant differences in the levels of IL-6, IFN γ , and IL-8 were found. IL-6 levels were found to be fivefold higher in septic shock patients, and 2.7-fold

higher in sepsis patients, compared with patients with infection (319.00 pg/mL [105.1–1870.00] and 166.70 pg/mL [56.98–1033.00] vs 61.81 pg/mL [21.56–370.5]; $p<0.01$ and $p<0.05$) (Fig. 3B). IFN γ levels were 2.7-fold lower in septic shock patients compared with patients with infection (3.2 pg/mL [2.23–9.21] vs 8.58 pg/mL [3.84–27.01], $p<0.05$) (Fig. 3D). IL-8 levels were 3.2-fold higher in septic shock patients compared with patients with infection (182.60 pg/mL [97.34–621.70] vs 55.40 pg/mL [21.74–218.30], $p<0.01$) (Fig. 3F).

We next assessed the correlation between the full set of cytokines and CETPI in patients with infection, sepsis, and septic shock through the Pearson correlation coefficient. There were positive correlations between the pro-inflammatory cytokines in infection patients, and more importantly, in sepsis patients (Fig. 3I, J) (Additional file 1: Table S1 and S2). However, in septic shock patients, the correlation between IFN γ and IL-12 (p70) with CETPI, IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-8, and IL-10, were not significant (Fig. 3K). IL-10 showed positive correlations with the other six cytokines studied in patients



with sepsis (Fig. 3J), and with IL-1 β , TNF- α , IL-6, and IL-8 in patients with septic shock (Fig. 3K) (Additional file 1: Table S2 and S3). Interestingly, there were negative correlations between CETPI with IL-1 β , IL-8, and IL-10 in septic shock patients (Fig. 3K) (Additional file 1: Table S3).

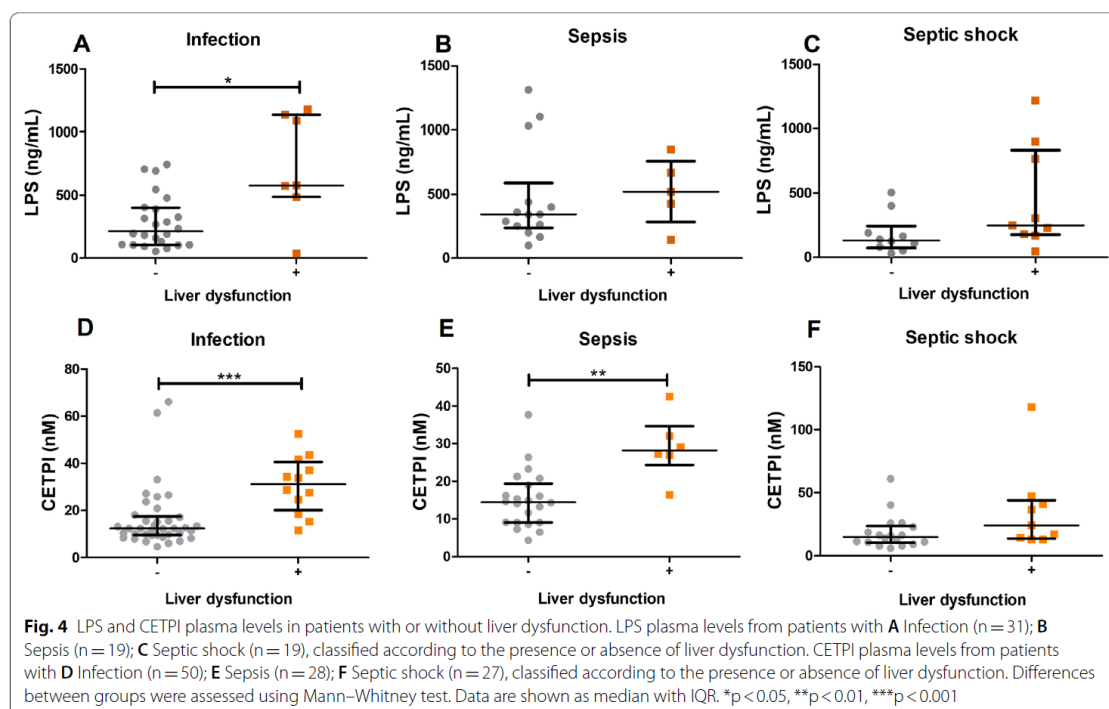
Patients with liver dysfunction present increased plasma concentrations of LPS and CETPI

Considering that the main site of infection in all patients studied corresponds to an intra-abdominal origin (Table 1), and that hepatic cells are involved in the clearance of LPS of intestinal origin, we analyzed the levels of LPS and CETPI in the plasma of patients with and without liver dysfunction (Fig. 4). Plasma LPS levels were higher in patients that presented liver dysfunction (Fig. 4A–C), with differences in patients with infection versus patients with infection but without liver dysfunction (577.90 pg/mL [487.20–1136.00] vs 214.90 pg/mL [105.90–400.70], $p < 0.05$) (Fig. 4A). Interestingly, the plasma concentration of CETPI was also found to be higher in infection (31.19.63 nM [20.07–40.58]), and sepsis patients (28.21 nM [24.34–34.65]) with liver dysfunction compared with patients with infection (12.35 nM [9.50–17.41]) and sepsis (14.45 nM [9.04–19.39]) without this comorbidity (Fig. 4D, E). Although the differences

showed not to be statistically significant, a similar increase in CETPI concentration was observed in septic shock patients (24.10 nM [13.54–44.07]) with respect to patients without liver dysfunction (14.84 nM [10.29–23.44]) (Fig. 4F). Besides, it is shown that a high plasma CETPI and LPS levels correlate in patients with infection and sepsis due to Gram-negative bacteria (Additional file 1: Fig. S2).

Proteolytic activity upon CETPI is associated with disease severity

We analyzed the CETPI expression employing a Western Blot analysis in plasma samples of both controls and patients (Fig. 5). In the plasma of controls, it was detected the expected band of 69 kDa (Fig. 5A), whereas, when plasma samples from patients were analyzed, together with the regular protein band corresponding to CETPI (69 kDa), a lower molecular weight protein band (~67 kDa) appeared (Fig. 5B). Although a basal level of CETPI was detected in control plasma samples, it did not show any type of correlation with the negligible concentration of inflammatory cytokines (Fig. 5C, D). However, when plasma samples from patients with infection were analyzed, the presence of the 67 kDa band was associated with the increased level of inflammatory cytokines, especially with IL-6 (Fig. 5E, F) (Additional file 1: Table S4).



Moreover, when plasma samples from patients with sepsis and septic shock were analyzed, this phenomenon was exacerbated showing a clear association with the presence of the ~67 kDa accessory protein band, and a marked increase in IL-6 and IL-10 (Fig. 5G, H) (Additional file 1: Table S4).

In order to find out the origin of the ~67 kDa band observed in the Western blot analysis, we employed HPLC-mass spectrometry. Interestingly, sequences directly related to the sequence for CETPI were found (Fig. 6A). However, the question arises, how an anti-CETPI antibody raised against the C-terminal sequence of CETPI, not present in CETP, permitted us to identify a second band in the western blot analysis? We found that the largest percentage of peptides identified by HPLC-mass spectrometry analysis of the ~67 kDa band, corresponds to sequences belonging to albumin, a well-known protein that readily binds peptides. Therefore, we decided to find out if contained in the plasma of sepsis and septic shock patients, albumin that normally shows an average molecular weight of 66.5 kDa, might contain bound-peptides derived from the C-terminal segment of CETPI. For this purpose, following a procedure to eliminate albumin from the plasma of sepsis and septic shock patients, samples were eluted through columns containing an albumin-binding resin. Interestingly, we do not detect the ~67 kDa in the albumin-depleted plasma samples (Fig. 6B). Considering that the elution of the albumin of the columns was done employing harsh conditions, peptides initially bound to albumin most probably became detached and eliminated, and therefore not detected in association with albumin (Fig. 6B). This set of experiments, confirm that peptides derived from the C-terminal region of CETPI, when bound to albumin are responsible for the positive Western blot signal found at ~67 kDa (Fig. 6B).

Overall, these results suggest the possibility that the activation of proteolytic enzymes might occur in the plasma of patients with sepsis and septic shock, therefore, the proteolytic activity upon CETPI could be generating peptides that eventually end up binding to albumin. In order to further explore this possibility, an analysis of the most susceptible sites for proteolytic cleavage at the C-terminal domain of CETPI was carried out. Interestingly, we found such positions where enzymes matrix-metalloproteinase-2 (MMP-2), elastase-2, chymotrypsin

A, and matrix-metalloproteinase-9 (MMP-9) might act (Fig. 6C). This analysis and the increased protease activity found in the plasma samples from all patient groups, in comparison with controls (Fig. 6D), support the hypothesis that the 67 kDa accessory protein band, corresponding to albumin, contains cleaved peptides derived from the C-terminal segment of CETPI, and therefore identified by the anti-CETPI antibody.

Discussion

Sepsis as a life-threatening syndrome with important variations in terms of incidence and mortality across the world, affects according to the World Health Organization, around 50 million people every year associated with 11 million deaths (WHO 2020). Therefore, this syndrome is responsible for approximately 20% of total deaths in the world in a single year (Rudd et al. 2020). Several pathophysiological alterations are present in sepsis, where a balanced response to the infection is essential to improve the survival rate. In this study, we describe the existing correlation between the severity of the disease, CETPI and LPS plasma levels during Gram-negative bacteraemia.

Our results show the presence of a high plasma CETPI concentration in the patients with an infectious process due to Gram-negative bacteria, in comparison to the control group. Since we have previously reported the presence of CETPI in the plasma of healthy subjects (Alonso et al. 2003), here as increased concentrations of CETPI have been found in patients with Gram-negative bacteraemia, we consider its role as a potential LPS-binding protein, and therefore as a participant in the physiological response to LPS. Although no direct differences were found in the concentration of CETPI between patients, an important correlation was found between CETPI concentrations and the SOFA score, indicating an association with the degree of organ dysfunction/failure (Lambden et al. 2019). A direct correlation between the SOFA score and IL-6, TNF- α , IL-8, and IL-10 was also observed. Interestingly, TNF- α and IL-6 as cytokines involved in endothelial damage, and multiple organ dysfunction syndrome, are often used as biomarkers for sepsis (Miguel-Bayarri et al. 2012; Molano Franco et al. 2019; Grondman et al. 2020). Whereas, IL-8 has been proposed as a prognostic factor in septic patients (Livaditi et al. 2006; Anderson et al. 2019), and IL-10 has been

(See figure on next page.)

Fig. 5 Association between cytokine plasma levels, and the presence of CETPI in the plasma of representative samples from control subjects and patients. **A** CETPI expression in plasma samples from control subjects. **B** Top: CETPI expression in plasma samples from control subjects and patients with infection. Down: CETPI expression in plasma samples from control subjects and patients with infection, sepsis, and septic shock. **C, D** Plasma samples obtained from control subjects; **E, F** patients with infection; **G** sepsis; and **H** septic shock. Left panels show the level of IL-1 β , TNF α , IL-6, IL-8, IL-12 (p70), IFN γ , and IL-10 (Data are presented as mean \pm SEM). At the right of each graph, the protein band that corresponds to CETPI (arrow tips) determined by western blot analysis, is shown. The same plasma samples were used for both measurements of plasma cytokines and CETPI

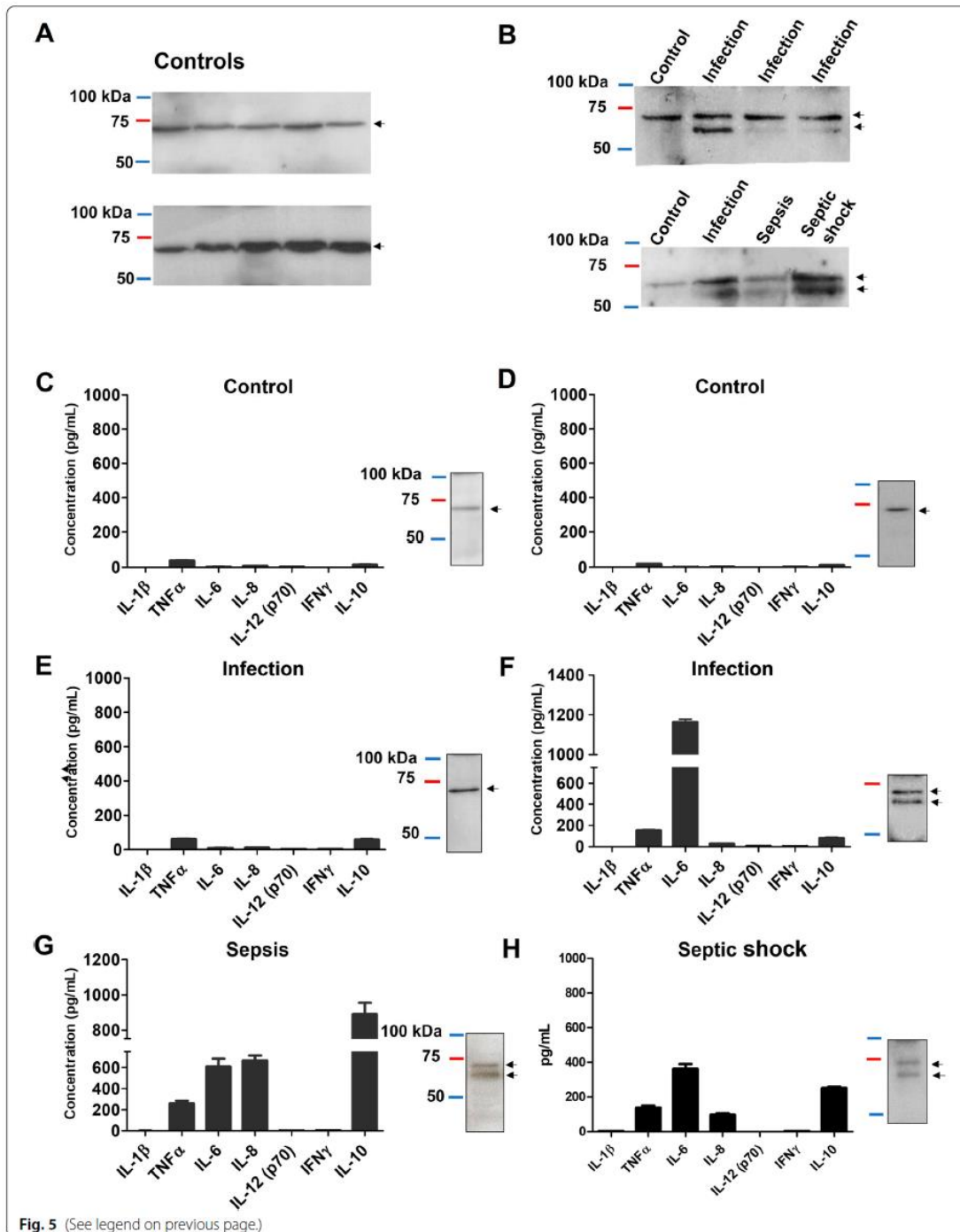
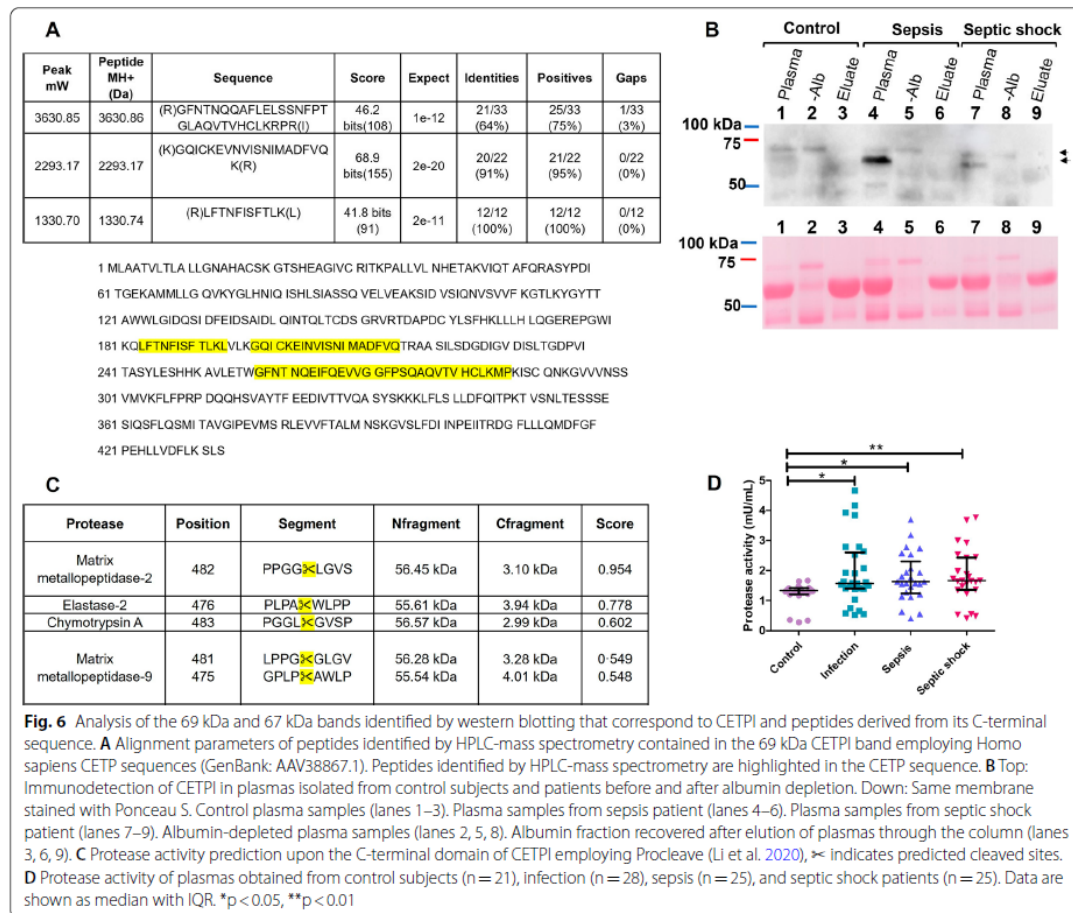


Fig. 5 (See legend on previous page.)



used as an indicator of a hypoinflammatory phenotype (Barichello et al. 2022). On the other hand, IFN γ that negatively correlates with the SOFA score, is known to be required during the host defense against pathogens, therefore contributing to a worse prognosis if the infection is not being controlled (Ono et al. 2018). Patients with septic shock present higher IL-6 and IL-8 plasma levels and lower levels of IFN γ than patients with infection, showing that an impaired immune response contributes to a worse prognosis. Our results also show a positive correlation between IL-10 and pro-inflammatory cytokines, whose simultaneous presence has been associated with the pathogenesis of sepsis (Matsumoto et al. 2018).

Experiments from our group where LPS-treated rabbits were administered with a peptide derived from the carboxy-end segment of CETPI, showed attenuated

circulating levels of pro-inflammatory molecules (Luna-Reyes et al. 2021). During the present investigation, based on the high levels of CETPI found in patients with Gram-negative bacteraemia, we explored its relationship with the cytokine plasma levels, and found negative correlations between CETPI with IL-1 β , IL-8, and IL-10. These results are consistent with the LPS-binding role of CETPI, showing an interesting correlation with the release of IL-8 by the gut (García-González, et al. 2015; Luna-Reyes et al. 2021; Liu et al. 2006; Angrisano et al. 2010).

An *in vitro* study carried out by our group several years ago, shows a clear correlation between an increase in CETPI expression by Caco-2 cells and small intestine cells, under LPS stimulation (García-González, et al. 2015). Considering that CETPI apparently is only synthesized by intestinal cells, the increased level of LPS in

circulation could promote the overexpression of CETPI in the intestinal epithelium as an early protective mechanism against the harmful action of LPS. Since LPS either entering the circulatory system from the intestinal tract through the portal circulation, or due to the antibiotic action upon bacteria, find their way to the liver, a key organ in the deactivation and clearance of LPS (Pérez-Hernández et al. 2021; Shao et al. 2007), our results are consistent with the fact that patients presenting liver dysfunction show an increased LPS plasma level (Bode et al. 1987; Parlesak et al. 2000; Thuy et al. 2008; Nier et al. 2020). This finding associated with the fact that patients showing liver dysfunction present even higher plasma CETPI levels, place CETPI as a promising biomarker of disease severity.

We consider this a clear response to infection and endotoxemia caused by the presence of LPS in the bloodstream following antimicrobial treatment, and/or when the intestinal epithelium starts to be compromised. Although endotoxemia might have other origins such as trauma, if we consider the gut as a major source of infection, the alteration of the intestinal barrier might be considered an important cause for this clinical condition (Pérez-Hernández et al. 2021).

The overexpression of CETPI associated with the formation of peptides secondary to proteolytic cleavage, seems to represent what it can be considered, a true emergency response system, switched-on at the start of an infection, and further developed in sepsis and septic shock. As consistently shown here with our western blot analysis of plasmas from all patient groups, the correlation between the appearance of the ~67 kDa electrophoretic band associated with the presence of proteolysis and generation of CETPI derived peptides, higher IL-6 levels, and organ failure, can be concurrent with other indicators of disease severity (Schulte et al. 2013; Fan et al. 2016).

Since the presence of systemic proteolysis has been associated with a high mortality rate in septic shock patients (Bauzá-Martínez et al. 2018), the fact that we did not find significant differences between infection, sepsis, and septic shock patients, seems to be related to the low mortality rate (4.8%) observed by us. Taking into account that CETPI is expressed in small intestine cells (Alonso et al. 2003), associated with the fact that the main source of infection in our patients is abdominal, proteolysis of CETPI by matrix metalloproteinases (MMPs) and serine proteases cannot be ruled out. In support of this possibility, the analysis for protease prediction performed by us shows that the C-terminal domain of CETPI presents potential cleavage sites for chymotrypsin A, elastase-2, MMP-9, and MMP-2.

Considering that CETPI might correspond to a protein that binds LPS *in vivo*, one of the limitations of this study is that we only included patients with positive blood cultures for Gram-negative bacteria. Therefore, it will be also of interest to explore the physiological role of CETPI in patients presenting other etiologies and a non-infectious systemic inflammatory response. Also, data presented here, corresponds to clinical data and plasma samples obtained within 12 h of ICU admission, thus, both the clinical information and the analysis of plasmas collected 48 h after admission, are currently being studied and should be reported soon.

Conclusion

This study provides new insights into the role of CETPI in sepsis due to Gram-negative bacteria. Given that a fine balance control given by diverse immune responses is essential in the prognosis of a septic patient, CETPI can be considered as a new LPS-binding protein, and therefore as a novel player in the pathophysiology of sepsis.

Abbreviations

CETPI: Isoform of the cholesteryl-ester transfer protein; LPS: Lipopolysaccharides; IL-1 β : Interleukin-1 beta; TNF α : Tumor necrosis factor-alpha; IL-6: Interleukin-6; IL-8: Interleukin-8; IL-12p70: Interleukin-12p70; IFN γ : Interferon γ ; IL-10: Interleukin-10; SOFA: Sequential Organ Failure Assessment; ICU: Intensive care unit; HDL: High-density lipoproteins; LDL: Low-density lipoproteins; CETP: Cholesteryl-ester transfer protein; ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay; INCMNSZ: Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán"; CRP: C-reactive protein; PCT: Procalcitonin; RT: Room temperature; PBS: Phosphate-Buffered Saline; SD: Standard deviation; IQR: Interquartile range; MMP-2: Matrix-metalloproteinase-2; MMP-9: Matrix-metalloproteinase-9; MMPs: Matrix metalloproteinases.

Supplementary Information

The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1186/s10020-022-00585-3>.

Additional file 1: Figure S1. Empirical cumulative distribution of the CETPI measurements. Empirical cumulative distribution of CETPI plasma concentration of controls (n = 47) and patients with infection (n = 50), sepsis (n = 28), and septic shock (n = 27), with a positive blood culture for Gram-negative bacteria. **Figure S2.** LPS correlates with CETPI plasma levels in patients with Gram-negative bacteraemia. Correlation between LPS with CETPI levels in patients with A infection (n = 31), B sepsis (n = 19), and C septic shock (n = 19). Spearman correlations show associations between LPS and CETPI in patients with infection and sepsis. **Table S1.** Probability of correlation between cytokines and CETPI in patients with infection shown in Fig. 3 I. **Table S2.** Probability of correlation between cytokines and CETPI in patients with sepsis shown in Fig. 3 J. **Table S3.** Probability of correlation between cytokines and CETPI in patients with septic shock shown in Fig. 3 K. **Table S4.** Clinical parameters of patients with E, F infection, G sepsis, and H septic shock shown in Fig. 5.

Acknowledgements

We would like to express a special thanks to Tzipe Govezensky for her expert advice in the statistical analysis of data. We also thank Georgina Díaz-Herrera, and Dra. Hilda Vázquez-López for experimental assistance. Also, Aurey Galván and Manuel Ortíz for technical support. Eréndira G. Pérez-Hernández

received a scholarship from CONACYT (465348) in support of her PhD studies. Ismael Luna-Reyes is currently receiving a scholarship from CONACYT (2019-000037-02NACF-25744) for the development of his PhD studies.

Author contributions

EGP-H performed experiments, contributed to analysis of results, and manuscript preparation. VP-D contributed to sample acquisition, clinical design, and analysis of results. IL-R performed experiments and contributed to the analysis of results. B.D-C. contributed to the analysis of results. JS-O contributed to the design and development of all clinical aspects of the study, and to the analysis of results. JM-O conceived the study and guided it throughout, contributed to the analysis of results, and wrote the paper. All authors read and approved the final manuscript.

Funding

This work was supported by grants UNAM-PAPIIT IN207121, UNAM-PAPIIT IN206619, and Estímulo a Investigaciones Médicas “Miguel Alemán Valdés”, Fundación Miguel Alemán A.C.

Availability of data and materials

All data generated or analyzed during this study are included in the paper and its supplementary information files. Also, relevant data are available from the authors upon reasonable request.

Declarations

Ethics approval and consent to participate

This study was approved by INCMNSZ's Research Ethics Committee (Reference number: 2252) and performed in accordance with the Declaration of Helsinki. Written informed consents were obtained from all participants before data and biological specimen collection.

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

JM-O. is inventor on patent application PCT/MX2014/00087 related to this study, “Peptides derived from the C-Terminal domain of CETPI as molecules blocking the lipopolysaccharide-induced effect in sepsis and septic shock”, submitted to the World Intellectual Property Organization and held by Universidad Nacional Autónoma de México. IL-R., E.G.P-H., V.P-D., B.D-C., JS-O declare no competing conflict of interest.

Author details

¹Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 Ciudad de Mexico, Mexico. ²Departamento de Medicina Interna, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”, 14080 Ciudad de Mexico, Mexico. ³Dirección de Medicina, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”, 14080 Ciudad de Mexico, Mexico.

Received: 7 June 2022 Accepted: 4 December 2022

Published online: 19 December 2022

References

- Alonso AL, Zentella-Dehesa A, Mas-Oliva J. Characterization of a naturally occurring new version of the cholesterol ester transfer protein (CETP) from small intestine. *Mol Cell Biochem*. 2003;245:173–82.
- Anderson BJ, Calfee CS, Liu KD, Reilly JP, Kangelaris KN, Shashaty MGS, et al. Plasma sTNFR1 and IL8 for prognostic enrichment in sepsis trials: a prospective cohort study. *Crit Care*. 2019;23:400.
- Angrisano T, Pero R, Peluso S, Keller S, Sacchetti S, Bruni CB, et al. LPS-induced IL-8 activation in human intestinal epithelial cells is accompanied by specific histone H3 acetylation and methylation changes. *BMC Microbiol*. 2010;10:172.
- Barichello T, Generoso JS, Singer M, Dal-Pizzol F. Biomarkers for sepsis: more than just fever and leukocytosis—a narrative review. *Crit Care*. 2022;26:14.
- Bauzá-Martínez J, Aletti F, Pinto BB, Ribas V, Odena MA, Díaz R, et al. Proteolysis in septic shock patients: plasma peptidomic patterns are associated with mortality. *Br J Anaesth*. 2018;121:1065–74.
- Beamer LJ. Structure of human BPI (bactericidal/permeability-increasing protein) and implications for related proteins. *Biochem Soc Trans*. 2003;31:791–4.
- Bode C, Kugler V, Bode JC. Endotoxemia in patients with alcoholic and non-alcoholic cirrhosis and in subjects with no evidence of chronic liver disease following acute alcohol excess. *J Hepatol*. 1987;4:8–14.
- Cecconi M, Evans L, Levy M, Rhodes A. Sepsis and septic shock. *The Lancet*. 2018;392:75–87.
- Fan SL, Miller NS, Lee J, Remick DG. Diagnosing sepsis—the role of laboratory medicine. *Clin Chim Acta*. 2016;460:203–10.
- Font MD, Thyagarajan B, Khanna AK. Sepsis and Septic Shock—basics of diagnosis, pathophysiology and clinical decision making. *Med Clin North Am*. 2020;104:573–85.
- García-González V, Gutiérrez-Quintanar N, Mas-Oliva J. The C-terminal domain supports a novel function for CETPI as a new plasma lipopolysaccharide-binding protein. *Sci Rep*. 2015;5:16091.
- Grondman I, Pirvu A, Riza A, Ioana M, Netea MG. Biomarkers of inflammation and the etiology of sepsis. *Biochem Soc Trans*. 2020;48:1–14.
- Krasity BC, Troll JV, Weiss JP, McFall-Ngai MJ. LBP/BPI proteins and their relatives: conservation over evolution and roles in mutualism. *Biochem Soc Trans*. 2011;39:1039–44.
- Lambden S, Laterre PF, Levy MM, Francois B. The SOFA score—development, utility and challenges of accurate assessment in clinical trials. *Crit Care*. 2019;23:374.
- Li F, Leier A, Liu Q, Wang Y, Xiang D, Akutsu T, et al. Procleave: predicting protease-specific substrate cleavage sites by combining sequence and structural information. *Genomics Proteomics Bioinformatics*. 2020;18:52–64.
- Liu YW, Chen CC, Tseng HP, Chang WC. Lipopolysaccharide-induced transcriptional activation of interleukin-10 is mediated by MAPK- and NF- κ B-induced CCAAT/enhancer-binding protein δ in mouse macrophages. *Cell Signal*. 2006;18:1492–500.
- Livaditi O, Kotanidou A, Psarra A, Dimopoulou I, Sotiropoulou C, Augustatou K, et al. Neutrophil CD64 expression and serum IL-8: sensitive early markers of severity and outcome in sepsis. *Cytokine*. 2006;36:283–90.
- Luna-Reyes I, Pérez-Hernández EG, Delgado-Coello B, Ávila-Rodríguez MA, Mas-Oliva J. Peptide VSAK maintains tissue glucose uptake and attenuates pro-inflammatory responses caused by LPS in an experimental model of the systemic inflammatory response syndrome: a PET study. *Sci Rep*. 2021;11:14752.
- Matsumoto H, Ogura H, Shimizu K, Ikeda M, Hirose T, Matsuura H, et al. The clinical importance of a cytokine network in the acute phase of sepsis. *Sci Rep*. 2018;8:13995.
- Miguel-Bayarri V, Casanoves-Laparra EB, Pallás-Beneyto L, Sancho-Chinesta S, Martín-Osorio LF, Tormo-Calandin C, et al. Prognostic value of the biomarkers procalcitonin, interleukin-6 and C-reactive protein in severe sepsis. *Med Intensive*. 2012;36:556–62.
- Molano Franco D, Arevalo-Rodríguez I, Roqué i Figuls M, Montero Oleas NG, Nuviols X, Zamora J. Plasma interleukin-6 concentration for the diagnosis of sepsis in critically ill adults. *Cochrane Database Syst Rev*. 2019;4:CD011811.
- Nier A, Huber Y, Labenz C, Michel M, Bergheim I, Schattenberg JM. Adipokines and endotoxemia correlate with hepatic steatosis in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Nutrients*. 2020;12:699.
- Ono S, Tsujimoto H, Hiraki S, Aosasa S. Mechanisms of sepsis-induced immunosuppression and immunological modification therapies for sepsis. *Ann Gastroenterol Surg*. 2018;2:351–8.
- Parlesak A, Schäfer C, Schütz T, Bode JC, Bode C. Increased intestinal permeability to macromolecules and endotoxemia in patients with chronic alcohol abuse in different stages of alcohol-induced liver disease. *J Hepatol*. 2000;32:742–7.
- Pérez-Hernández EG, Delgado-Coello B, Luna-Reyes I, Mas-Oliva J. New insights into lipopolysaccharide inactivation mechanisms in sepsis. *Biomed Pharmacother*. 2021;141: 111890.
- Reinhart K, Daniels R, Kisson N, Machado FR, Schachter RD, Finfer S. Recognizing sepsis as a global health priority—a WHO resolution. *N Engl J Med*. 2017;377:414–7.

- Rudd KE, Johnson SC, Agesa KM, Shackelford KA, Tsoi D, Kievlan DR, et al. Global, regional, and national sepsis incidence and mortality, 1990–2017: analysis for the Global Burden of Disease Study. *Lancet*. 2020;395:200–11.
- Schulte W, Bernhagen J, Bucala R. Cytokines in sepsis: potent immunoregulators and potential therapeutic targets—an updated view. *Mediators Inflamm*. 2013;2013: 165974.
- Shao B, Lu M, Katz SC, Varley AW, Hardwick J, Rogers TE, et al. A host lipase detoxifies bacterial lipopolysaccharides in the liver and spleen. *J Biol Chem*. 2007;282:13726–35.
- Singer M, Deutschman CS, Seymour C, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, et al. The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (sepsis-3). *JAMA*. 2016;315:801–10.
- Thuy S, Ladurner R, Volynets V, Wagner S, Strahl S, Königsrainer A, et al. Nonalcoholic fatty liver disease in humans is associated with increased plasma endotoxin and plasminogen activator inhibitor 1 concentrations and with fructose intake. *J Nutr*. 2008;138:1452–5.
- Van Der Poll T, Van De Veerdonk FL, Scicluna BP, Netea MG. The immunopathology of sepsis and potential therapeutic targets. *Nat Rev Immunol*. 2017;17:407–20.
- Vreugdenhil ACE, Snoek AMP, Van'T Veer C, Greve JWM, Buurman WA. LPS-binding protein circulates in association with apoB-containing lipoproteins and enhances endotoxin-LDL/VLDL interaction. *J Clin Invest*. 2001;107:225–34.
- WHO. Service delivery and safety: improving the prevention, diagnosis and clinical management of sepsis. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/sepsis> (2020). Accessed 23 May 2022.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more biomedcentral.com/submissions



14.5 Artículo de revisión: New insights into lipopolysaccharide inactivation mechanisms in sepsis

Biomedicine & Pharmacotherapy 141 (2021) 111890



Contents lists available at ScienceDirect

Biomedicine & Pharmacotherapy

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bioph



New insights into lipopolysaccharide inactivation mechanisms in sepsis

Eréndira Guadalupe Pérez-Hernández, Blanca Delgado-Coello, Ismael Luna-Reyes, Jaime Mas-Oliva

Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 Mexico City, Mexico

ARTICLE INFO

Keywords:
Sepsis
Lipopolysaccharide
Gut-liver axis
Dysbiosis
CETPI

ABSTRACT

The complex pathophysiology of sepsis makes it a syndrome with limited therapeutic options and a high mortality rate. Gram-negative bacteria containing lipopolysaccharides (LPS) in their outer membrane correspond to the most common cause of sepsis. Since the gut is considered an important source of LPS, intestinal damage has been considered a cause and a consequence of sepsis. Although important in the maintenance of the intestinal epithelial cell homeostasis, the microbiota has been considered a source of LPS. Recent studies have started to shed light on how sepsis is triggered by dysbiosis, and an increased inflammatory state of the intestinal epithelial cells, expanding the understanding of the gut-liver axis in sepsis. Here, we review the gut-liver interaction in Gram-negative sepsis, exploring the mechanisms of LPS inactivation, including the recently described contribution of an isoform of the cholesteryl-ester transfer protein (CETPI). Although several key questions remain to be answered when the pathophysiology of sepsis is reviewed, new contributions coming to light exploring the way LPS might be inactivated *in vivo*, suggest that new applications might soon reach the clinical setting.

1. Introduction

Sepsis, a syndrome where a dysregulated host response to infection conduces to physiological abnormalities, and eventually, to life-threatening organ dysfunction [1], corresponds to an important health problem accounting for 19.7% of global deaths [2]. Many cases of sepsis and septic shock have their origin in the abdominal cavity, where a series of intestine-related alterations have been considered a key factor in triggering sepsis and the multiple organ dysfunction syndrome (MODS) [3,4]. Since the intestine and the liver are closely related through the gut-liver axis composed of the portal vein, the biliary tract, and several systemic mediators [5], this review explores the contribution of the mechanisms known to be activated in these two organs that counteract the deleterious effects of LPS in sepsis.

The role of the gut as a key factor in triggering sepsis and multiple organ dysfunction is first presented, highlighting the contribution of the intestinal barrier disruption associated with the presence in plasma of gut-derived LPS. Later, we describe the recognition and processing of LPS by the liver. Finally, we focus on the gut and liver LPS-inactivation mechanisms, where the participation of proteins such as the bactericidal/permeability-increasing protein (BPI), the lipopolysaccharide-binding protein (LBP), and the cholesteryl-ester transfer protein (CETP) is discussed; including the newly described

CETP isoform (CETPI), proposed by our group to participate in the inactivation of LPS in the plasma of patients with sepsis and septic shock.

2. Intestinal barrier disruption and the role of microbiota in sepsis

LPS are the major component present in the outer membrane of Gram-negative bacteria, constituted by lipid A, core sugars, and the O-antigen [6]. Lipid A is the most conserved molecule, and the main responsible for LPS bioactivity [7]. The main source of endotoxin in sepsis is secondary to a Gram-negative bacterial infection, and in many cases directly related to a deficiency in the barrier function of the intestine [8]. The disruption of the intestinal barrier leads to increased intestinal permeability, gut-derived LPS translocation to the lymphatic system, transport of LPS to the liver by the portal vein (gut-liver axis), and the development of immune responses by hepatic cells [9].

Under normal conditions, the gut lumen hosts the microbiota, comprising bacteria, archaea, fungi, protozoa, and viruses [10]. Although important in the maintenance of intestinal epithelial cell (IECs) homeostasis, the microbiota has been considered a source of LPS [11,12]. The normal microbiota regulates the production of antimicrobial molecules, as well as mucins [11,13], components of the mucus layer, functioning as a physical barrier that separates the microbiota

* Corresponding author.

E-mail address: jmas@ifc.unam.mx (J. Mas-Oliva).

<https://doi.org/10.1016/j.bioph.2021.111890>

Received 8 March 2021; Received in revised form 3 June 2021; Accepted 28 June 2021

Available online 3 July 2021

0753-3322/© 2021 The Authors. Published by Elsevier Masson SAS. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license

(<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>)

from the IECs [14]. In the colon, the mucus layer is composed by an inner layer normally absent of bacteria, and an outer mucus layer colonized by anaerobic bacteria where the phyla *Firmicutes* and *Bacteroidetes* are the most abundant, followed by facultative species such as *Escherichia coli*, that can be present in low concentrations [15]. Pathogens and several commensal intestinal bacteria have mucolytic activity, but only facultative species can penetrate the inner mucus layer [13]. In an inflammatory microenvironment, there is an increase in the abundance of facultative anaerobic bacteria, whereas the proportion of strictly anaerobic decreases, altering the composition of the gut microbiota (dysbiosis) and promoting the accentuation of the inflammatory process [16]. This is evident in patients presenting the systemic inflammatory response syndrome, where a decrease of obligate anaerobes and an increase in pathogenic bacteria in the intestine has been observed [17].

Underneath the mucus layer, in the luminal surface of the small intestine protrude a series of structures called villi, separated between them by tubular invaginations known as crypts. At the base of the crypts, there are columnar stem cells that differentiate into diverse types of epithelial cells, comprising enterocytes, goblet cells, entero-endocrine cells, and Paneth cells (Fig. 1a). Considered as the main intestinal barrier to infection, the apical glycocalyx containing cell surface mucins, together with the presence of epithelial tight junctions, adherens junctions, and desmosomes [13,19], belong to a system of key defense structures. Among the causes that lead to the disruption of these structural components of the intestinal barrier; infection, trauma, ischemia/reperfusion events, and immune cell dysregulation, have been recognized as important ones [20,21]. Also, as a consequence of the damage caused by these cell disturbances, dysbiosis becomes present, as shown in patients with septic shock [22], in patients that receive antibiotic treatment [23,24], and in general, in critically ill patients [25,26].

Evidence showing an association between alterations of the microbiota and subsequent admission of patients to the hospital due to sepsis, mainly includes those with dysbiosis produced by infection-related hospitalization, and antibiotic administration [27,28]. When dysbiosis becomes present, among other alterations, an increase in the intestinal permeability is observed, most of the time associated with an alteration of cell-cell adhesion properties of IECs. Then, as a result of infection or dysbiosis, a pro-inflammatory environment is developed, and tight junctions become disrupted, turning the epithelial barrier leaky [29] (Fig. 1b).

This phenomenon explains the transmigration of bacteria, LPS, and other harmful metabolites from the lymphatic system and portal circulation to the systemic circulation and other organs causing MODS [30–32]. The mesenteric lymph vessel conducts pathogen-associated

molecular patterns (PAMPs), or intracellular molecules released from damaged or dying cells (called damage-associated molecular patterns or DAMPs). These molecules associated with gut-derived pathogens continue towards the systemic circulation and eventually the lungs producing the acute respiratory distress syndrome and distant organ injury [33–35].

Associated to the barrier function of IECs limiting the translocation of bacteria and therefore their contact with intestinal immune cells [36], the participation of the microbiota has been defined as an important line of defense against invading pathogens. The relationship between IECs and the normal bacteria present in the intestine contributes to the maintenance of the intestinal barrier function through the production of microbiota-derived inositol phosphate [37], and the fermentation of undigested carbohydrates, such as the end-products of high fiber diets, producing short-chain fatty acids (SCFAs), propionate, acetate, and butyrate. Butyrate, as the main energy source for epithelial cells, promotes cell survival, and proliferation [38]. In addition, SCFAs maintain the intestinal barrier after LPS exposure, through the stimulation of the mechanisms that overexpress tight-junction proteins such as claudin-1 and ZO-1, and also through the inhibition of the NLRP3 inflammasome, autophagy, and NF- κ B activation [39,40].

Since an important risk factor to develop sepsis correlates with the presence of low concentrations of butyrate-producing bacteria in the intestinal lumen [41], fecal microbiota transplantation to mice with sepsis has shown to promote a protective effect associated with the restoration of normal levels of butyrate [42]. Also, the relationship between the microenvironment promoted by the gut microbiota, and its effects on LPS production has been proven in atherosclerosis-prone mice, where LPS synthesis is reduced in mice treated with live *Bacteroides*, reducing the expression of the Toll-like receptor 4 (TLR4), and contributing to maintain the gut-barrier integrity [43]. Although the precise mechanisms by which microbiota contributes to the LPS fecal levels remains unclear, a lower abundance of *Bacteroides* is related to inflammatory diseases as in sepsis [44]. In addition, the gut microbiota and their metabolites reduce LPS-induced inflammation in distant organs like the lung and the liver. In this sense, the process of inflammation induced by LPS in the liver has been shown to decrease in mice when treated with molecules known to be synthesized by the gut microbiota, such as the aromatic heterocyclic compound indole [45]. Also, recent results indicate the protective effect of the intestinal microbiota in regulating immunity of LPS-induced acute lung injury, by modulating the TLR4/NF- κ B signaling pathway associated to the induction of inflammation and oxidative stress [46].

On the other hand, it has been established that high-fat diets enhance intestinal permeability contributing to LPS translocation from the gut to

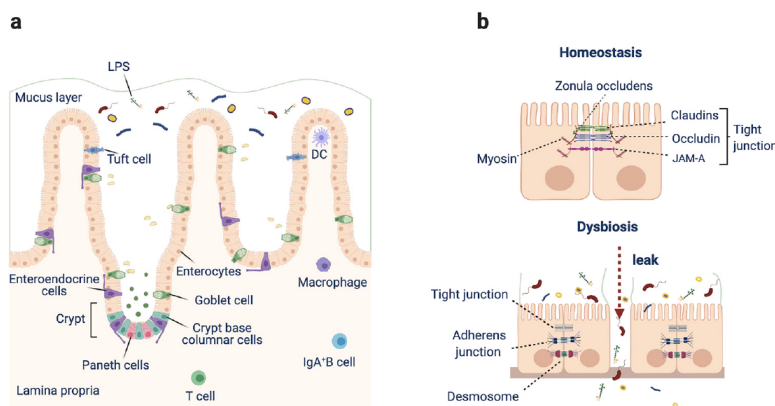


Fig. 1. Disruption of the intestinal barrier as a mechanism closely related to the development of sepsis. a) Under healthy conditions, the gut presents a single layer of intestinal epithelial cells (IECs) provided with microvilli, that act both, as a physical barrier, and as a cell system that transports nutrients and exchanges ions [18]. While IECs are covered with a dense layer of mucus synthesized by goblet cells, Paneth cells producing essential growth factors and antimicrobial peptides protect columnar stem cells. b) When the normal homeostatic equilibrium of the microbiota is altered, epithelial cells lose tight junctions, and dysbiosis occurs producing free routes for the migration of bacteria and their metabolites to the liver and other organs, starting the septic process. LPS, lipopolysaccharides; DC, dendritic cells; JAM-A, junctional adhesion molecule-A.

plasma, triggering the onset of low-grade inflammation [47]. Since during the postprandial period, dietary long-chain fats are absorbed following their incorporation into chylomicrons, LPS can be incorporated also, therefore facilitating their absorption and contributing to postprandial inflammation [48–50]. The administration of high-fat diets to mice has been also related to a reduced expression in IECs of genes coding for tight junction proteins, such as ZO-1 and occludin [51]. High-fat diets promote the release of inflammatory mediators, and activate mast cells in the intestinal mucosa, affecting the transcellular and paracellular intestinal permeability [52,53]. In absence of a pathogen agent, administration to mice of a fat-rich diet low in fiber, causes a high susceptibility to develop sepsis after antibiotic exposure and surgical injury [54]. Moreover, employing an LPS-induced sepsis model, it has been observed that mice fed with a western diet are susceptible to develop immunoparalysis [55].

3. The liver response to LPS

Although several of the main functions carried out by the liver comprise the metabolism of nutrients, the production of clotting factors, and detoxification; its immune function is critical to maintain tolerance and protection against pathogens carried via the portal system. As the first line of defense, this immune function is particularly important against systemic and intestine-derived pathogens. In this sense, it has been found that the concentration of LPS in the portal circulation is higher than the LPS concentration in the peripheral blood [56,57]. Therefore, the anatomical disposition of the liver and the intestine, reveals the critical connection role of these two organs in the process of detoxification of gut-derived LPS [57]. Hepatic cells participate in a network system designed to detect, capture, and prime the adequate immune response against circulating microorganisms. For this purpose and in association with hepatocytes, a large population of macrophages, neutrophils, natural killer cells, lymphocytes, dendritic cells, B cells, hepatic stellate cells (HSC), and liver sinusoidal endothelial cells (LSEC), contribute to the liver response in sepsis [58,59]. In septic patients, it has been shown that bacterial clearance by the liver is important to reduce plasma LPS levels, which in parallel lowers the severity of the immune response and improves the patient's outcome [58,60].

So far, the main molecules involved in LPS-sensing are LBP, CD14, MD-2, and TLR4 [61], which initiate the activation of intracellular signal transduction networks in subdomains of the plasma membrane rich in phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate [62]. The sorting adaptors, TRAP and TRAM, interact with these regions sensing dimerized TLR4 at the cell surface or on endosomes, inducing the myddosome formation or TRIF signaling, respectively [63,64]. (Fig. 2). The myddosome elicits the production of pro-inflammatory mediators by activating inflammatory transcription factors, such as NF- κ B and AP-1; whereas the TLR4 internalized in endosomes engage TRAM and TRIF, initiating IRF3-dependent type-I IFN production [61] (Fig. 2). On the other hand, several other cellular responses to LPS have been described, involving phagocytosis [65], autophagy [66], and mitochondrial reactive oxygen species production [67]. In the macrophage, intracellular LPS triggers the noncanonical inflammasome, well known to correspond to a TLR4-independent response (Fig. 2). During this cellular response, caspase-11 recognizes intracellular LPS, leading to the generation of IL-1 β , IL-18, and to pyroptosis, which further contributes to the severity of sepsis [68,69]. Therefore, it has been reported that the use of activation antagonists of human caspases 4 and 5 (the orthologs of mouse caspase-11), may result beneficial for septic patients [69,70].

Regarding the distribution of TLR4 as the main receptor mediating the LPS effect, TLR4 transcripts are abundantly expressed in Kupffer cells (KCs), followed by LSEC, and poorly expressed in hepatocytes, in both mouse and human liver [71]. In vivo, it is assumed that LPS interact first with KCs and LSEC in the sinusoid, and eventually, with HSC in the space of Disse. Given the key role that KCs and LSEC play in the recognition and clearance of LPS, they also contain the scavenger

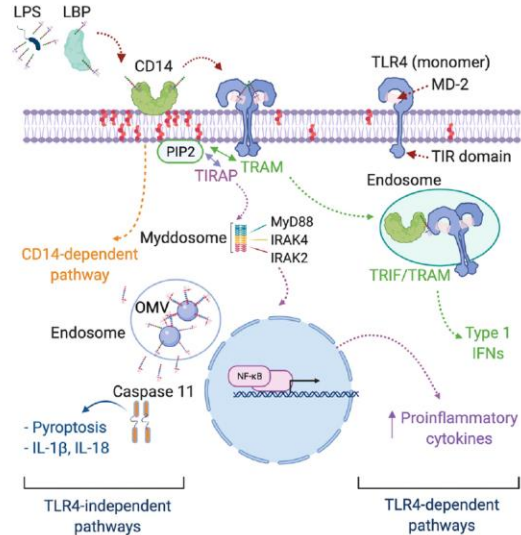


Fig. 2. Schematic diagram of the LPS/TLR4 signaling pathway. The cascade of cellular events mediated through the LPS/TLR4 signaling pathway initiates with the interaction of LPS with LBP and CD14, facilitating the subsequent signaling events by the TLR4-MD2 complex. The sorting adaptors TRAP and TRAM induce the myddosome formation or TRIF signaling, resulting in the production of pro-inflammatory cytokines and type 1 IFNs, respectively. An alternative mechanism mediated by caspase 11 has been also described, where outer membrane vesicles (OMV) produced by Gram-negative bacteria, are endocytosed, and LPS is delivered into the cytosol of host cells, conducting to IL-1 β and IL-18 production, and to pyroptosis. TLR4, Toll-like receptor 4; LPS, lipopolysaccharides; LBP, lipopolysaccharide-binding protein; IFNs, interferons.

receptor class B type 1 (SR-B1), and the activin receptor-like kinase (ALK-1), known to participate in the process (Fig. 3). SR-B1 corresponds to the high-density lipoprotein (HDL) receptor, considered to be highly expressed in hepatocytes being at least 5-fold more abundant in LSEC and poorly expressed in KCs and HSC [72]. In addition to the main role of SR-B1 in the reverse transport of cholesterol through the cell uptake of cholesteryl-esters from HDL, during the course of sepsis SR-B1 also contributes to LPS clearance in the liver [73].

Recent work has attracted attention to the role of the bone morphogenetic protein-9, a cytokine member of the TGF- β superfamily produced by HSC that binds ALK-1, showing a role as a modulator of the in vitro response of human LSEC evoked by LPS. Transcripts for ALK-1 are mainly expressed in LSEC and KCs, and very low levels are found in the hepatocytes of both mice and humans [71].

4. Mechanisms of lipopolysaccharide neutralization

The gut mucosa presents several mechanisms that participate in LPS inactivation, where besides being a physical barrier, prevents LPS from coming in close contact with the apical side of IECs. Among the molecules that participate, the following have been well studied: mucins, intestinal alkaline phosphatase (IAP), antimicrobial peptides (AMPs), IgA, bile acids, and a series of LPS binding proteins (Fig. 4a). Among the different secreted mucins, both in humans and mice, mucin 2 (Muc2) corresponds to the major component preventing the translocation of intestinal bacteria [74,75]. An investigation studying Muc2^{-/-} mice shows that when treated with sublethal doses of LPS, these experimental animals present a high mortality rate associated with impaired iron homeostasis, and an increased bacterial translocation [76]. IAP corresponds to a mucosal defense enzyme that, through the removal of

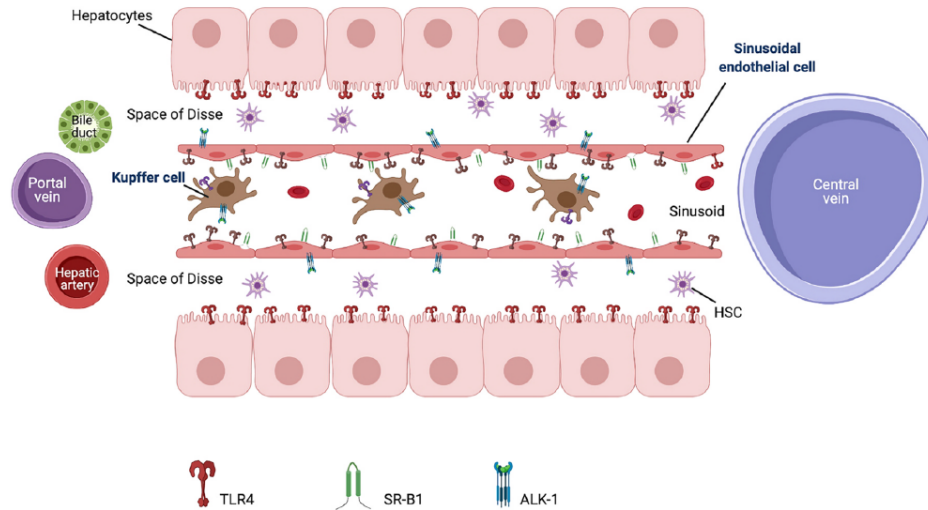


Fig. 3. Participation of different hepatic cell types in the recognition and clearance of LPS during sepsis. Although hepatocytes and non-parenchymal cells when exposed to LPS trigger an inflammatory response, Kupffer cells and liver sinusoidal endothelial cells, play an outstanding role in clearing LPS and the restoration of homeostasis. LPS, lipopolysaccharides; TLR4, Toll-like receptor 4; SR-B1, high-density lipoprotein receptor class B type 1; ALK-1, activating receptor-like kinase; HSC, hepatic stellate cells.

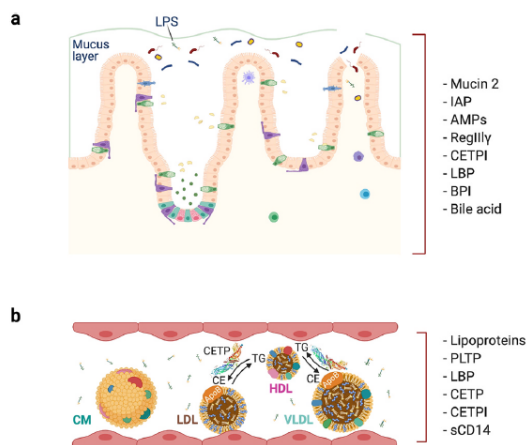


Fig. 4. Mechanisms of LPS inactivation present in the gut-liver axis. a) The intestine presents several mechanisms to limit the entrance of LPS to intestinal lymphatics and portal circulation. In the presence of an inflammatory micro-environment such as the one present during sepsis, these mechanisms are bypassed. b) LPS present in the intestinal lymphatics bind to chylomicrons (CM) being transporting to the portal circulation, whereas LPS in the blood bind to lipoproteins, which are constantly being restructured, and taken up by Kupffer cells (KCs) and liver sinusoidal endothelial cells (LSEC). TG, triglycerides; CE, cholesterol esters.

phosphate groups coupled to glucosamines, detoxifies LPS [77], promoting mucosal tolerance to resident bacteria, and protecting the host from sepsis during inflammatory conditions [78,79]. In animal models of sepsis and patients with sepsis, the administration of IAP attenuates LPS toxicity and prolongs survival time [80–83].

AMPs are secreted by Paneth cells in response to bacteria and LPS, and they spread into the mucus layer of the gut. Alpha-defensins, the

most abundant antimicrobial peptides in the human intestine, are secreted in response to LPS [11,84], and their interaction inhibits TLR-mediated inflammation. Also, Paneth cells detect gut bacteria through cell-autonomous MyD88 activation, triggering the expression of antimicrobial factors, such as RegIII γ , RegIII β , and RELM β , all expressed after oral administration of LPS to germ-free mice [85].

Five LPS-binding proteins belonging to the family of lipid transfer/LPS-binding proteins (LTP/LBP) have been described: the phospholipid transfer protein (PLTP), LBP, BPI, CETP [86], and a new isoform of CETP described by our group, named CETPI [87,88]. LBP is a component of the intestinal mucosal defense system secreted by intestinal epithelial cells [89], and it is present in the secretory granules of Paneth cells [90]. While CD14 has been recognized as the receptor for the complex formed between LBP/LPS [91], promoting an exacerbated inflammatory response mediated by TLR4, a high concentration of LBP also contributes to neutralizing LPS. BPI is present in neutrophils and expressed in human epithelial cells (oral, pulmonary, and intestinal) [92], where it shows a bactericidal action and a neutralizing activity against LPS. In the intestinal epithelium, BPI expression increases in response to changes in the levels of intracellular potassium caused by cell damage, whereas neither PAMPs, such as LPS nor cytokines, induce BPI expression [93,94]. These findings suggest that DAMPs regulate BPI expression instead of PAMPs, important in limiting the translocation of commensal bacteria during epithelial damage [94], and also protecting mucosal surfaces against the endotoxin of Gram-negative bacteria [93].

While gut-derived LPS molecules enter the bloodstream, proteins such as PLTP, LBP, and sCD14 promote their binding to lipoproteins, therefore facilitating their transport to the liver for further elimination (Fig. 4b). The liver as the main source of CETP also synthesizes acute-phase proteins, such as LBP and sCD14 [95]. The role of CETP in sepsis-like conditions has been evaluated by us studying small intestine cells in culture. We found that following incubation with LPS, these cells that normally do not synthesize CETP, start to produce the protein [88]. Moreover, the role of CETP as a mediator of the excessive inflammatory response to LPS has been described employing RAW 264.7 murine macrophages, where TNF- α production increases upon incubation with LPS, but decreases in a dose-dependent manner when human CETP is

added to the medium [96,97]. Since cholesterol esters are transferred between lipoproteins by CETP in exchange for triglycerides from HDL to LDL and very low-density lipoproteins (VLDL), the resulting triglyceride-enriched HDL are easily degraded by hepatic lipases decreasing the level of circulating HDL-cholesterol (HDL-C) (Fig. 4b). Considering that HDL-C plasma levels are inversely associated with the risk of cardiovascular disease, for some time it has been thought that the presence of a low HDL-C concentration mediated by a high plasma CETP concentration could be detrimental in those individuals affected with cardiovascular disease. In association with these findings, the clinical trial testing the CETP inhibitor torcetrapib, expected to lower the activity of CETP and therefore increase plasma HDL-C, was not concluded due to an unanticipated high mortality rate found associated with cardiovascular and non-cardiovascular complications. Interestingly, among the non-cardiovascular causes, the presence of infection was directly found to be established with the use of this inhibitor [98].

Soon after the clinical trials studying the effects of CETP inhibitors upon cardiovascular disease were interrupted, its potential interaction of torcetrapib with LBP and BPI was explored. It was shown that this inhibitor does not affect LPS binding ability to LBP and BPI, in the same way as LPS do not affect CETP function. It was also shown that LPS strongly induces the expression of TNF- α in ex vivo blood assays, even in the presence of torcetrapib [99]. These results suggest that HDL-remodeling mediated by CETP is a crucial component in the response to Gram-negative infections. Accordingly, a low HDL-C plasma concentration has been associated with an unfavorable outcome during the development of sepsis [100]. A recent meta-analysis shows the relation between low HDL plasma levels and a high mortality rate in patients with sepsis [101]. In support of these data, studying patients that present the CETP genetic variant rs1800777 (allele A), which is a gain-of-function variant of CETP associated with abnormally low HDL-C levels, it was observed that in the presence of sepsis these patients are not able to downregulate CETP, and therefore the transfer of cholesterol-esters from HDL to LDL and VLDL is increased. This condition leads patients to become more susceptible to organ failure associated to a low survival rate [102].

For some time, it has been considered that CETP is synthesized in the hepatocyte the predominant cell type in the liver, however, nowadays we know that CETP is mainly expressed in a specific population of resting KCs displaying surface proteins known as Clec4f and Vsig4 [104–106]. Apparently, as an early mechanism to counteract the harmful effects of LPS, the expression of these proteins is reduced when KCs are LPS-activated, in parallel with a decrease in CETP and an increase in plasma HDL-C [106] (Fig. 5). While the important inactivation

of LPS in plasma mediated by their association with lipoproteins such as HDL, is directly related to the insertion of lipid A into the outer phospholipid layer of this lipoprotein [107], lipoprotein-bound LPS are removed from the bloodstream by liver cells through the LDL receptor (LDLR), the LDLR-related protein-1 [108,109], and SR-B1 [73].

Since the uptake of LPS-HDL complexes by KCs, is slower than free LPS [110], LSEC are considered the main cell type involved in the clearance of these LPS-HDL complexes probably through the interaction with SR-B1 [111]. Nevertheless, the relevance of LPS clearance mediated by SR-B1 in patients with sepsis still shows inconsistent results [73, 112,113]. On the other hand, although TLR4 located in the hepatocyte membrane has been shown to contribute in sepsis to the clearance of LPS from circulation [60], due to the complex role of TLR4 in the septic process, the use in the clinic of TLR4 antagonist has ended with controversial results [114]. Finally, a key detoxification mechanism for LPS is carried out by the enzymes lipid A-phosphatase and acylglycerol-hydrolase present in KCs and LSEC, as a preliminary step for excretion into the bile [110,111].

Furthermore, the contribution of KCs in sepsis is relevant considering that in contrast to monocyte-derived macrophages, KCs have proliferative capacity, allowing them to regenerate themselves [115]. Besides, KCs having the capability to polarize specific activation states, perform diverse functions in different microenvironments with the ability to change from the M1 phenotype (classical activation) to the alternative M2 phenotype [116]. Since M1-polarized KCs predominate in sepsis producing a large amount of pro-inflammatory cytokines like TNF- α , and IL-6 (Fig. 5), new therapeutic approaches have been employed to inhibit M1 polarization with the use of mesenchymal stem cells and chromone derivatives [117,118].

5. CETPI a new lipopolysaccharide-binding protein

CETPI corresponds to a new protein described by our group, that apparently when studied in the rabbit as the experimental model, seems to be exclusively expressed in the small intestine [87]. Although it is present in human plasma, it is still not known if in the human, the intestine is the only organ that synthesizes CETPI. Nevertheless, the fact that under normal conditions CETPI is found in plasma is most probably related to its lipid binding properties, and therefore to the possibility that while being synthesized by the enterocyte, CETPI binds to the newly formed chylomicrons, following in association, a normal excretion pathway into the lacteal [119].

The main structural difference between CETP and CETPI resides in its C-terminal domain, where the last 24 C-terminal residues present in

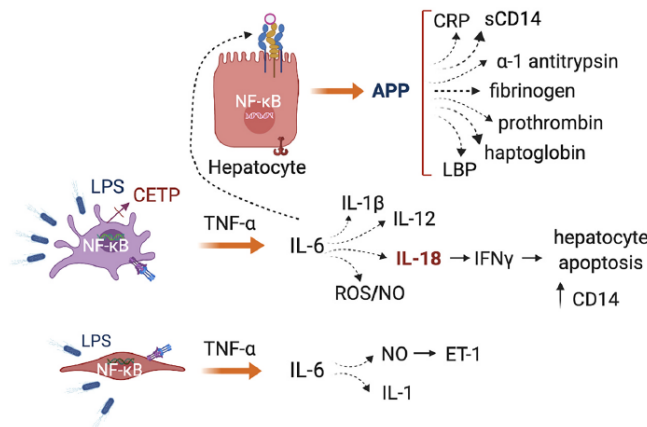


Fig. 5. Role of CETP in the liver's response to LPS. When LPS from Gram-negative bacteria activate KCs, they stop producing CETP, and therefore, circulating HDL levels increase. As a response to LPS, hepatic cells produce pro-inflammatory cytokines and trigger different signaling pathways. Among the interleukins produced by KCs, IL-18 seems to be the main factor provoking liver damage by stimulating the secretion of interferon-gamma (IFN- γ), which leads hepatocytes to apoptosis. Also, liver sinusoidal endothelial cells (LSEC) produce nitric oxide (NO) that induces the secretion of endothelin-1 (ET-1), known to be involved in the inflammatory response [103]. Moreover, hepatocytes respond to the TNF- α /IL-6 signal carried out by KCs and LSEC, by producing further inflammatory acute-phase proteins (APP).

CETP are substituted by 18 new ones. This new sequence in CETPI including prolines and positively charged amino acids, confer this domain with a disordered structure and a net positive electrostatic charge [87,88]. Peptide VSAK (for the first four aa of the 18 aa peptide V₄₇₄-P₄₉₁), derived from the C-terminal domain of CETPI interacts with LPS, protects macrophages against the cytotoxic effects of LPS, and in vitro prevents the generation of oxidative stress [88]. Interestingly, the stimulation of colon-derived cells (Caco-2) and small intestine cells (FHs74Int) with LPS, increases CETPI expression [88], indicating an important role of this protein in mediating the cytotoxic effects of LPS present in the intestine. The presence of CETPI in plasma reflects its key function in sepsis and septic shock, since plasma CETPI levels have been shown to be in parallel increased in intensive care unit patients presenting both conditions in comparison to healthy subjects [120]. While as mentioned above, the normal excretion of CETPI to circulation might be explained by its association with chylomicrons, under a pathological condition involving inflammation of the intestine, protein translocation is known to take place due to structural changes of the epithelial layer [121].

Since the heterogeneous response of patients to infection is one of the main obstacles for an early diagnosis and treatment of the disease, the use of biomarkers related to the diagnosis, disease severity, and prognostic aspects of sepsis represents a key point to improve the outcome of patients [122]. Although several biomarkers of the septic process have been reported, their use in clinical practice is still limited. Among the biomarkers frequently detected during the acute phase of sepsis, the C-reactive protein, procalcitonin, and IL-6, have been identified as important ones [123]. Interestingly, we have demonstrated that CETPI and peptides derived from the carboxy-end segment of this protein, such as peptide VSAK, might be also considered as a new set of biomarkers to define disease severity during the transition from infection, sepsis, to septic shock [120].

Recent results from our laboratory employing Positron Emission Tomography, have also shown that peptides derived from the carboxy-end segment of CETPI, including peptide VSAK, when injected intravenously reduce the detrimental effects produced by LPS in Dutch dwarf rabbits, used as an animal model to develop a systemic inflammatory response syndrome associated to septic shock [124]. Included in the same report, employing molecular dynamics, we have shown that peptide VSAK irreversibly binds to LPS, a process that most probably deactivates the endotoxin, preventing inflammation through activation of the TLR4/NF- κ B signaling pathway. Treatment with peptide VSAK prevented the onset of changes in serum levels of glucose and insulin associated with the establishment of an insulin resistance-like syndrome in all septic animals studied. Also, treatment with peptide VSAK showed an important attenuation in the circulating levels of pro-inflammatory molecules increased in LPS treated animals. As a whole, our data suggest that peptide VSAK might be considered not only as a new marker molecule of disease severity, but also as a candidate in the development and use of a new therapeutic strategy focused on mitigating the harmful effects produced by LPS during sepsis and septic shock. A better understanding of the way molecules such as CETPI and peptide VSAK are involved in the neutralization of LPS, will help to develop new and improved management schemes to control sepsis and septic shock in the setting of the Intensive Care Unit.

6. Outstanding questions

The disruption of the intestinal barrier in sepsis plays a key role by affecting the homeostasis established with the microbiota, the crosstalk between the gut and other organs such as the liver, and by promoting the presence of LPS in the bloodstream. Therefore, new knowledge is needed to clarify: (1) The contribution of the gut-liver and gut-lung axis in MODS, considering the contribution of DAMPs and PAMPs. (2) The use of probiotics, prebiotics, and fecal microbiota transplantation to counteract the effect of antibiotics administered to patients with sepsis. (3)

The participation of CETP in the equilibrium of lipoproteins in the pathophysiology of sepsis. (4) The possibility for the use of CETPI and peptides derived from CETPI as biomarkers of organ failure and disease severity in patients with sepsis and septic shock. (5) The potential therapeutic use of LPS-binding peptides that could restore immunodysregulation during the acute stages of sepsis.

6.1. Search strategy and selection criteria

References cited in this review were identified employing PubMed and Google Scholar. The search strategy included articles published in English from January 1977 to May 2021, using the terms: "gut microbiota", "gut-derived sepsis", "lipopolysaccharide inactivation", "gut-translocation", "liver injury", "Gram-negative sepsis", "multiple organ dysfunction" and "gut-liver axis". The selection criteria employed to include articles were originality and their impact in the field.

Funding

This work was supported by grants awarded to Jaime Mas-Oliva from Universidad Nacional Autónoma de México-PAPIIT México (IN205717 and IN206619).

Author contributions

Eréndira G. Pérez-Hernández and Jaime Mas-Oliva participated with conceptualization, literature search, writing, and critical review. Blanca Delgado-Coello contributed with literature search, figure design, and critical review. Ismael Luna-Reyes contributed with literature search, writing, and critical review.

Conflict of interest statement

The authors declare no competing conflict of interest.

Acknowledgments

Eréndira G. Pérez-Hernández received a scholarship from CONACYT (465348) in support of her Ph.D. studies. Ismael Luna-Reyes is receiving a scholarship from CONACYT (2019-000037-02NACF-25744) for the development of his Ph.D. studies.

Figures were created with Biorender.com.

References

- [1] M. Singer, C.S. Deutschman, C.W. Seymour, M. Shankar-Hari, D. Annane, M. Bauer, R. Bellomo, G.R. Bernard, J.D. Chiche, C.M. Coopersmith, R. S. Hotchkiss, M.M. Levy, J.C. Marshall, G.S. Martin, S.M. Opal, G.D. Rubenfeld, T. van der Poll, J.L. Vincent, D.C. Angus, The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (Sepsis-3), *JAMA* 315 (2016) 801–810.
- [2] K.E. Rudd, S.C. Johnson, K.M. Agesa, K.A. Shackelford, D. Tsoi, D.R. Kievan, D. V. Colombara, K.S. Ikuta, N. Kisson, S. Finfer, C. Fleischmann-Struzek, F. R. Machado, K.K. Reinhart, K. Rowan, C.W. Seymour, R.S. Watson, T.E. West, F. Marinho, S.I. Hay, R. Lozano, A.D. Lopez, D.C. Angus, C. Murray, M. Naghavi, Global, regional, and national sepsis incidence and mortality, 1990–2017: analysis for the global burden of disease study, *Lancet* 395 (2020) 200–211.
- [3] N.J. Klingensmith, C.M. Coopersmith, The gut as the motor of multiple organ dysfunction in critical illness, *Crit. Care Clin.* 32 (2016) 203–212.
- [4] S. Ahlawat, A.K. Sharma, Gut-organ axis: a microbial outreach and networking, *Lett. Appl. Microbiol.* 72 (2021) 636–668.
- [5] A. Tripathi, J. Debelius, D.A. Brenner, M. Karin, R. Loomba, B. Schnabl, R. Knight, The gut-liver axis and the intersection with the microbiome, *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 15 (2018) 397–411.
- [6] X. Wang, P. Quinn, Endotoxins: lipopolysaccharides of gram-negative bacteria, in: X. Wang, P. Quinn (Eds.), *Endotoxins: Structure, Function and Recognition*, Springer, 2010, pp. 3–25.
- [7] E.T. Rietschel, T. Kirikae, F.U. Schade, A.J. Ulmer, O. Holst, H. Brade, G. Schmidt, U. Mamat, H.D. Grimmecke, S. Kusumoto, The chemical structure of bacterial endotoxin in relation to bioactivity, *Immunobiology* 187 (1993) 169–190.
- [8] K. Buttenschoen, P. Radermacher, H. Bracht, Endotoxin elimination in sepsis: physiology and therapeutic application, *Lange Arch. Surg.* 395 (2010) 597–605.

- [9] S.Y. Kim, E. Seki, Toll-like receptors in liver disease, in: L.M. Arias, H.J. Alter, J. L. Boyer (Eds.), *The Liver: Biology and Pathobiology*, sixth ed., John Wiley & Sons, 2020, pp. 737–745.
- [10] X.V. Li, I. Leonardi, I.D. Iliev, Gut mycobiota in immunity and inflammatory disease, *Immunity* 50 (2019) 1365–1379.
- [11] C.L. Bevins, N.H. Salzman, Paneth cells, antimicrobial peptides and maintenance of intestinal homeostasis, *Nat. Rev. Microbiol.* 9 (2011) 356–368.
- [12] J.C. Clemente, L.K. Ursell, L.W. Parfrey, R. Knight, The impact of the gut microbiota on human health: an integrative view, *Cell* 148 (2012) 1258–1270.
- [13] M.A. McGuckin, S.K. Linden, P. Sutton, T.H. Florin, Mucin dynamics and enteric pathogens, *Nat. Rev. Microbiol.* 9 (2011) 265–278.
- [14] M.E. Johansson, H. Sjövall, G.C. Hansson, The gastrointestinal mucus system in health and disease, *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 10 (2013) 352–361.
- [15] P.B. Eckburg, E.M. Bik, C.N. Bernstein, E. Purdom, L. Dethlefsen, M. Sargent, S. R. Gill, K.E. Nelson, D.A. Relman, Diversity of the human intestinal microbial flora, *Science* 308 (2005) 1635–1638.
- [16] S.E. Winter, M.G. Winter, M.N. Xavier, P. Thiennimitr, V. Poon, A.M. Keestra, R. C. Laughlin, G. Gomez, J. Wu, S.D. Lawhorn, I.E. Popova, S.J. Parikh, L.G. Adams, R.M. Tsolis, V.J. Stewart, A.J. Bäuml, Host-derived nitrate boosts growth of *E. coli* in the inflamed gut, *Science* 339 (2013) 708–711.
- [17] K. Shimizu, H. Ogura, M. Goto, T. Asahara, K. Nomoto, M. Morotomi, K. Yoshiya, A. Matsushima, Y. Sumi, Y. Kuwagata, H. Tanaka, T. Shimazu, H. Sugimoto, Altered gut flora and environment in patients with severe SIRS, *J. Trauma* 60 (2006) 126–133.
- [18] T. Pelaseyed, G.C. Hansson, Membrane mucins of the intestine at a glance, *J. Cell Sci.* (2020) 133, jcs240929.
- [19] R. Okumura, K. Takeda, Roles of intestinal epithelial cells in the maintenance of gut homeostasis, *Exp. Mol. Med.* 49 (2017) 338.
- [20] L.A. Ding, J.S. Li, Y.S. Li, N.T. Zhu, F.N. Liu, L. Tan, Intestinal barrier damage caused by trauma and lipopolysaccharide, *World J. Gastroenterol.* 10 (2004) 2373–2378.
- [21] G. Son, M. Kremer, I.N. Hines, Contribution of gut bacteria to liver pathobiology, *Gastroenterol. Res. Pract.* 2010 (2010) 453–563.
- [22] Y.D. Wan, R.X. Zhu, Z.Q. Wu, S.Y. Lyu, L.X. Zhao, Z.J. Du, X.T. Pan, Gut microbiota disruption in septic shock patients: a pilot study, *Med. Sci. Monit.* 24 (2018) 8639–8646.
- [23] S. Kim, A. Covington, E.G. Pamer, The intestinal microbiota: antibiotics, colonization resistance, and enteric pathogens, *Immunol. Rev.* 279 (1) (2017) 90–105.
- [24] L. Liu, Q. Wang, H. Lin, R. Das, S. Wang, H. Qi, J. Yang, Y. Xue, D. Mao, Y. Luo, Amoxicillin increased functional pathway genes and beta-lactam resistance genes by pathogens bloomed in intestinal microbiota using a simulator of the human intestinal microbial ecosystem, *Front. Microbiol.* 11 (2020) 1213.
- [25] A. Yeh, M.B. Rogers, B. Firek, M.D. Neal, B.S. Zuckerbraun, M.J. Morowitz, Dysbiosis across multiple body sites in critically ill adult surgical patients, *Shock* 46 (2016) 649–654.
- [26] A. Reintam Blaser, J.C. Preiser, S. Fruhwald, A. Wilmer, J. Wernerman, C. Benstoem, M.P. Caser, J. Starkopf, A. van Zanten, O. Rooyackers, S.M. Jakob, C.I. Loudet, D.E. Bear, G. Elke, M. Kott, I. Lautenschläger, J. Schäper, J. Gunst, C. Stoppe, L. Nobile, V. Fuhrmann, M.M. Berger, H.M. Oudemans-van Straaten, Y. M. Arabi, A.M. Deane, E. Working Group on Gastrointestinal Function within the Section of Metabolism, Endocrinology and Nutrition (MEN Section) of, Gastrointestinal dysfunction in the critically ill: a systematic scoping review and research agenda proposed by the section of metabolism, endocrinology and nutrition of the European society of intensive care medicine, *Crit. Care* 24 (1) (2020) 224.
- [27] H.C. Prescott, R.P. Dickson, M.A. Rogers, K.M. Langa, T.J. Iwashyna, Hospitalization type and subsequent severe sepsis, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 192 (2015) 581–588.
- [28] J. Baggs, J.A. Jernigan, A.L. Halpin, L. Epstein, K.M. Hatfield, L.C. McDonald, Risk of subsequent sepsis within 90 days after a hospital stay by type of antibiotic exposure, *Clin. Infect. Dis.* 66 (2018) 1004–1012.
- [29] M.A. Odenwald, J.R. Turner, The intestinal epithelial barrier: a therapeutic target? *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 14 (2017) 9–21.
- [30] L. Wang, C. Llorente, P. Hartmann, A.M. Yang, P. Chen, B. Schnabl, Methods to determine intestinal permeability and bacterial translocation during liver disease, *J. Immunol. Methods* 421 (2015) 44–53.
- [31] F. Rainer, A. Horvath, T.D. Sandahl, B. Leber, B. Schmerboeck, A. Blesl, A. Groselj-Strele, R.E. Stauber, P. Fickert, P. Stiegler, H.J. Möller, H. Grynbaek, V. Stadlbauer, Soluble CD163 and soluble mannose receptor predict survival and decompensation in patients with liver cirrhosis, and correlate with gut permeability and bacterial translocation, *Aliment. Pharm. Ther.* 47 (2018) 657–664.
- [32] J. Yang, S.Y. Lim, Y.S. Ko, H.Y. Lee, S.W. Oh, M.G. Kim, W.Y. Cho, S.K. Jo, Intestinal barrier disruption and dysregulated mucosal immunity contribute to kidney fibrosis in chronic kidney disease, *Nephrol. Dial. Transpl.* 34 (3) (2019) 419–428.
- [33] E.A. Deitch, Gut-origin sepsis: evolution of a concept, *Surgeon* 10 (2012) 350–356.
- [34] S.F. Assimakopoulos, C. Triantos, K. Thomopoulos, F. Fligou, I. Maroulis, M. Marangos, C.A. Gogos, Gut-origin sepsis in the critically ill patient: pathophysiology and treatment, *Infection* 46 (2018) 751–760.
- [35] Y. Ma, X. Yang, V. Chatterjee, M.H. Wu, S.Y. Yuan, The gut-lung axis in systemic inflammation. Role of mesenteric lymph as a conduit, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 64 (2021) 19–28.
- [36] L.W. Peterson, D. Artis, Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis, *Nat. Rev. Immunol.* 14 (2014) 141–153.
- [37] S.E. Wu, S. Hashimoto-Hill, V. Woo, E.M. Eshleman, J. Whitt, L. Engleman, R. Kams, L.A. Denson, D.B. Haslam, T. Alenghat, Microbiota-derived metabolite promotes HDAC3 activity in the gut, *Nature* 586 (2020) 108–112.
- [38] G. Shen, J. Wu, B.C. Ye, N. Qi, Gut microbiota-derived metabolites in the development of diseases, *Can. J. Infect. Dis. Med. Microbiol.* 2021 (2021), 6658674.
- [39] Y. Feng, Y. Wang, P. Wang, Y. Huang, F. Wang, Short-chain fatty acids manifest stimulative and protective effects on intestinal barrier function through the inhibition of NLRP3 inflammasome and autophagy, *Cell Physiol. Biochem.* 49 (2018) 190–205.
- [40] J. Fu, G. Li, X. Wu, B. Zang, Sodium butyrate ameliorates intestinal injury and improves survival in a rat model of cecal ligation and puncture-induced sepsis, *Inflammation* 42 (2019) 1276–1286.
- [41] M.W. Adelman, M.H. Woodworth, C. Langelier, L.M. Busch, J.A. Kempker, C. S. Kraft, G.S. Martin, The gut microbiome's role in the development, maintenance, and outcomes of sepsis, *Crit. Care* 24 (2020) 278.
- [42] S.M. Kim, J.R. DeFazio, S.K. Hyoju, K. Sangani, R. Keskey, M.A. Krezalek, N. N. Khodarev, N. Sangwan, S. Christley, K.G. Harris, A. Malik, A. Zaborin, R. Bouziat, D.R. Ranoa, M. Wiegner, J.D. Ernest, B.A. Shakhsher, I. D. Fleming, R.R. Weichselbaum, D.A. Antonopoulos, J.A. Gilbert, L.B. Barreiro, O. Zaborina, B. Jabri, J.C. Alverdy, Fecal microbiota transplant rescues mice from human pathogen mediated sepsis by restoring systemic immunity, *Nat. Commun.* 11 (2020) 2354.
- [43] N. Yoshida, T. Emoto, T. Yamashita, H. Watanabe, T. Hayashi, T. Tabata, N. Hoshi, N. Hatano, G. Ozawa, N. Sasaki, T. Mizoguchi, H.Z. Amin, Y. Hirota, W. Ogawa, T. Yamada, K.I. Hirata, *Bacteroides vulgatus* and *Bacteroides dorei* reduce gut microbial lipopolysaccharide production and inhibit atherosclerosis, *Circulation* 138 (2018) 2486–2498.
- [44] N. Yoshida, T. Yamashita, S. Kishino, H. Watanabe, K. Sasaki, D. Sasaki, T. Tabata, Y. Sugiyama, N. Kitamura, Y. Saito, T. Emoto, T. Hayashi, T. Takahashi, M. Shinohara, R. Osawa, A. Kondo, T. Yamada, J. Ogawa, K. I. Hirata, A possible beneficial effect of *Bacteroides* on faecal lipopolysaccharide activity and cardiovascular diseases, *Sci. Rep.* 10 (2020) 13009.
- [45] M. Beaumont, A.M. Neyrinck, M. Olivares, F. Rodriguez, A. de Rocca Serra, M. Roumain, L.B. Bindels, P.D. Cani, P. Evenepoel, G.G. Muccioli, J.B. Demoulin, N.M. Delzenne, The gut microbiota metabolite indole alleviates liver inflammation in mice, *FASEB J.* 32 (2018), 201800544 f201800544.
- [46] J. Tang, L. Xu, Y. Zeng, F. Gong, Effect of gut microbiota on LPS-induced acute lung injury by regulating the TLR4/NF- κ B signaling pathway, *Int. Immunopharmacol.* 91 (2021), 107272.
- [47] P.D. Cani, A.M. Neyrinck, F. Fava, C. Knauf, R.G. Burcelin, K.M. Tuohy, G. R. Gibson, N.M. Delzenne, Selective increases of bifidobacteria in gut microflora improve high-fat-diet-induced diabetes in mice through a mechanism associated with endotoxaemia, *Diabetologia* 50 (2007) 2374–2383.
- [48] S. Ghoshal, J. Witta, J. Zhong, W. de Villiers, E. Eckhardt, Chylomicrons promote intestinal absorption of lipopolysaccharides, *J. Lipid Res.* 50 (2009) 90–97.
- [49] F. Laugerette, C. Vors, A. Geloën, M.A. Chauvin, C. Soulage, S. Lambert-Porcheron, N. Peretti, M. Alligier, R. Burcelin, M. Laville, H. Vidal, M. C. Michalski, Emulsified lipids increase endotoxaemia: possible role in early postprandial low-grade inflammation, *J. Nutr. Biochem.* 22 (2011) 53–59.
- [50] M. Clemente-Postigo, M.I. Queipo-Ortuño, M. Murrí, M. Boto-Ordóñez, P. Perez-Martinez, C. Andres-Lacueva, F. Cardona, F.J. Tinahones, Endotoxin increase after fat overload is related to postprandial hypertriglyceridemia in morbidly obese patients, *J. Lipid Res.* 53 (2012) 973–978.
- [51] P.D. Cani, R. Bibiloni, C. Knauf, A.M. Neyrinck, N.M. Delzenne, R. Burcelin, Changes in gut microbiota control metabolic endotoxaemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice, *Diabetes* 57 (2008) 1470–1481.
- [52] Y. Ji, Y. Sakata, P. Tso, Nutrient-induced inflammation in the intestine, *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* 14 (2011) 315–321.
- [53] T. Suzuki, Regulation of the intestinal barrier by nutrients: the role of tight junctions, *Anim. Sci. J.* 91 (2020) 13357.
- [54] S.K. Hyoju, A. Zaborin, R. Keskey, A. Sharma, W. Arnold, F. van den Berg, S. M. Kim, N. Gittel, C. Bethel, A. Charnot-Katsikas, P. Jianxin, C. Adriaensens, E. Papazian, J.A. Gilbert, O. Zaborina, J.C. Alverdy, Mice fed an obesogenic western diet, administered antibiotics, and subjected to a sterile surgical procedure develop lethal septicemia with multidrug-resistant pathogens, *mBio* 10 (2019) e00903–e00919.
- [55] B.A. Napier, M. Andres-Terre, L.M. Massis, A.J. Hryckowian, S.K. Higginbottom, K. Cunnock, K.M. Casey, B. Haileselassie, K.A. Lugo, D.S. Schneider, J. L. Sonnenburg, D.M. Monack, Western diet regulates immune status and the response to LPS-driven sepsis independent of diet-associated microbiome, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 116 (2019) 3698–3694.
- [56] A.I. Jacob, P.K. Goldberg, N. Bloom, G.A. Degenshein, P.J. Kozinn, Endotoxin and bacteria in portal blood, *Gastroenterology* 72 (1977) 1268–1270.
- [57] P. Kubec, C. Jenne, Immune responses in the liver, *Annu. Rev. Immunol.* 36 (2018) 247–277.
- [58] J. Yan, S. Li, S. Li, The role of the liver in sepsis, *Int. Rev. Immunol.* 33 (2014) 498–510.
- [59] P. Strnad, F. Tacke, A. Koch, C. Trautwein, Liver - guardian, modifier and target of sepsis, *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 14 (2017) 55–66.
- [60] M. Deng, M.J. Scott, P. Loughran, G. Gibson, C. Sodhi, S. Watkins, D. Hackam, T. R. Billiar, Lipopolysaccharide clearance, bacterial clearance, and systemic

- inflammatory responses are regulated by cell type-specific functions of TLR4 during sepsis, *J. Immunol.* 190 (2013) 5152–5160.
- [61] Y. Tan, J.C. Kagan, A cross-disciplinary perspective on the innate immune responses to bacterial lipopolysaccharide, *Mol. Cell* 54 (2014) 212–223.
- [62] J.C. Kagan, R. Medzhitov, Phosphoinositide-mediated adaptor recruitment controls Toll-like receptor signaling, *Cell* 125 (2006) 943–955.
- [63] M. Yamamoto, S. Sato, H. Hemmi, K. Hoshino, T. Kaisho, H. Sanjo, O. Takeuchi, M. Sugiyama, M. Okabe, K. Takeda, S. Akira, Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway, *Science* 301 (2003) 640–643.
- [64] K.S. Bonham, M.H. Orzalli, K. Hayashi, A.I. Wolf, C. Glanemann, W. Weninger, A. Iwasaki, D.M. Knipe, J.C. Kagan, A promiscuous lipid-binding protein diversifies the subcellular sites of toll-like receptor signal transduction, *Cell* 156 (2014) 705–716.
- [65] J.M. Blander, R. Medzhitov, Regulation of phagosome maturation by signals from toll-like receptors, *Science* 304 (2004) 1014–1018.
- [66] Y. Xu, C. Jagannath, X.D. Liu, A. Sharafkhan, K.E. Kolodziejska, N.T. Eissa, Toll-like receptor 4 is a sensor for autophagy associated with innate immunity, *Immunity* 27 (2007) 135–144.
- [67] A.P. West, I.E. Brodsky, C. Rahner, D.K. Woo, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, M.C. Walsh, Y. Choi, G.S. Shadel, S. Ghosh, TLR signalling augments macrophage bactericidal activity through mitochondrial ROS, *Nature* 472 (2011) 476–480.
- [68] J.A. Hagar, D.A. Powell, Y. Aachoui, R.K. Ernst, E.A. Miao, Cytoplasmic LPS activates caspase-11: implications in TLR4-independent endotoxic shock, *Science* 341 (2013) 1250–1253.
- [69] N. Kayagaki, M.T. Wong, I.B. Stowe, S.R. Ramani, L.C. Gonzalez, S. Akashi-Takamura, K. Miyake, J. Zhang, W.P. Lee, A. Muszyński, L.S. Forsberg, R. W. Carlson, V.M. Dixit, Noncanonical inflammasome activation by intracellular LPS independent of TLR4, *Science* 341 (2013) 1246–1249.
- [70] A. Pfalzgraf, G. Weindl, Intracellular lipopolysaccharide sensing as a potential therapeutic target for sepsis, *Trends Pharm. Sci.* 40 (2019) 187–197.
- [71] H. Gaitantzi, J. Karch, L. Germann, C. Cai, V. Rausch, E. Birgin, N. Rahbari, T. Seitz, C. Hellerbrand, C. König, H.G. Augustin, C. Mogler, C. de la Torre, N. Gretz, T. Itzel, A. Teufel, M. Ebert, K. Breitkopf-Heinlein, BMP-9 modulates the hepatic responses to LPS, *Cells* 9 (2020) 617.
- [72] L.P. Ganesan, J.M. Mates, A.M. Cheplowitz, C.L. Avila, J.M. Zimmerman, Z. Yao, A. Maiseyue, M.V. Rajaram, J.M. Robinson, C.L. Anderson, Scavenger receptor B1, the HDL receptor, is expressed abundantly in liver sinusoidal endothelial cells, *Sci. Rep.* 6 (2016) 20646.
- [73] L. Guo, Z. Zheng, J. Ai, B. Huang, X.A. Li, Hepatic scavenger receptor B1 protects against polymicrobial-induced sepsis through promoting LPS clearance in mice, *J. Biol. Chem.* 289 (2014) 14666–14673.
- [74] G.C. Hansson, Mucins and the microbiome, *Annu. Rev. Biochem.* 89 (2020) 769–793.
- [75] M.A. Borisova, K.M. Achasova, K.N. Morozova, E.N. Andreyeva, E.A. Litvinova, A. A. Ogienko, M.V. Morozova, M.B. Berkaeva, E. Kiseleva, E.N. Kozhevnikova, Mucin-2 knockout is a model of intercellular junction defects, mitochondrial damage and ATP depletion in the intestinal epithelium, *Sci. Rep.* 10 (2020) 21135.
- [76] M. Kumar, A. Leon Coria, S. Cornick, B. Petri, S. Mayengbam, H.B. Jijon, F. Moreau, J. Shearer, K. Chadee, Increased intestinal permeability exacerbates sepsis through reduced hepatic SCD-1 activity and dysregulated iron recycling, *Nat. Commun.* 11 (2020) 483.
- [77] J.M. Bates, J. Akerlund, E. Mitge, K. Guillemin, Intestinal alkaline phosphatase detoxifies lipopolysaccharide and prevents inflammation in zebrafish in response to the gut microbiota, *Cell Host Microbe* 2 (2007) 371–382.
- [78] K. Geldes, D.J. Philpott, A new role for intestinal alkaline phosphatase in gut barrier maintenance, *Gastroenterology* 135 (2008) 8–12.
- [79] S.B. Singh, A. Carroll-Portillo, C. Coffman, N.L. Ritz, H.C. Lin, Intestinal alkaline phosphatase exerts anti-inflammatory effects against lipopolysaccharide by inducing autophagy, *Sci. Rep.* 10 (2020) 3107.
- [80] F. Su, R. Brands, Z. Wang, C. Verdant, A. Bruhn, Y. Cai, W. Raaben, M. Wulferink, J.L. Vincent, Beneficial effects of alkaline phosphatase in septic shock, *Crit. Care Med.* 34 (2006) 2182–2187.
- [81] S. Heemsker, R. Masereeuw, O. Moesker, M.P. Bouw, J.G. van der Hoeven, W. H. Peters, F.G. Russel, P. Pickkers, G. APSEP Study, Alkaline phosphatase treatment improves renal function in severe sepsis or septic shock patients, *Crit. Care Med.* 37 (2009) 417–423, 417-e1.
- [82] P. Pickkers, S. Heemsker, J. Schouten, P.F. Laterre, J.L. Vincent, A. Beishuizen, P.G. Jorens, H. Spapen, M. Bulitta, W.H. Peters, J.G. van der Hoeven, Alkaline phosphatase for treatment of sepsis-induced acute kidney injury: a prospective randomized double-blind placebo-controlled trial, *Crit. Care* 16 (2012) 14.
- [83] F. Hümmeke-Oppers, P. Hemelaar, P. Pickkers, Innovative drugs to target renal inflammation in sepsis: alkaline phosphatase, *Front. Pharm.* 10 (2019) 919.
- [84] T. Ayabe, D.P. Satchell, C.L. Wilson, W.C. Parks, M.E. Selsted, A.J. Ouellette, Secretion of microbicidal alpha-defensins by intestinal Paneth cells in response to bacteria, *Nat. Immunol.* 1 (2000) 113–118.
- [85] S. Vaishnava, C.L. Behrendt, A.S. Ismail, L. Eckmann, L.V. Hooper, Paneth cells directly sense gut commensals and maintain homeostasis at the intestinal host-microbial interface, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105 (2008) 20858–20863.
- [86] L.J. Beamer, Structure of human BPI (bactericidal/permeability-increasing protein) and implications for related proteins, *Biochem. Soc. Trans.* 31 (2003) 791–794.
- [87] A.L. Alonso, A. Zentella-Dehesa, J. Mas-Oliva, Characterization of a naturally occurring new version of the cholesterol ester transfer protein (CETP) from small intestine, *Mol. Cell. Biochem.* 245 (2003) 173–182.
- [88] V. García-González, N. Gutiérrez-Quintanar, J. Mas-Oliva, The C-terminal domain supports a novel function for CETPI as a new plasma lipopolysaccharide-binding protein, *Sci. Rep.* 5 (2015) 16091.
- [89] A.C. Vreugdenhil, A.M. Snoek, J.W. Greve, W.A. Buurman, Lipopolysaccharide-binding protein is vectorially secreted and transported by cultured intestinal epithelial cells and is present in the intestinal mucus of mice, *J. Immunol.* 165 (2000) 4561–4566.
- [90] G.H. Hansen, K. Rasmussen, L.L. Niels-Christiansen, E.M. Danielsen, Lipopolysaccharide-binding protein: localization in secretory granules of Paneth cells in the mouse small intestine, *Histochem. Cell Biol.* 131 (2009) 727–732.
- [91] S.D. Wright, R.A. Ramos, P.S. Tobias, R.J. Ulevitch, J.C. Mathison, CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein, *Science* 249 (1990) 1431–1433.
- [92] G. Canny, O. Levy, G.T. Furuta, S. Narravala-Alipati, R.B. Sisson, C.N. Serhan, S. P. Colgan, Lipid mediator-induced expression of bactericidal/permeability-increasing protein (BPI) in human mucosal epithelia, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99 (2002) 3902–3907.
- [93] G. Canny, E. Cario, A. Lennartsson, U. Gullberg, C. Brennan, O. Levy, S.P. Colgan, Functional and biochemical characterization of epithelial bactericidal/permeability-increasing protein, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 290 (2006) G557–G567.
- [94] A. Balakrishnan, D. Chakravorty, Epithelial cell damage activates bactericidal/permeability increasing-protein (BPI) expression in intestinal epithelium, *Front. Microbiol.* 8 (2017) 1567.
- [95] S. Bas, B.R. Gauthier, U. Spenato, S. Stingelin, C. Gabay, CD14 is an acute-phase protein, *J. Immunol.* 172 (2004) 4470–4479.
- [96] P.M. Cazita, D.F. Barbeiro, A.I. Moretti, E.C. Quintão, F.G. Soriano, Human cholesteryl ester transfer protein expression enhances the mouse survival rate in an experimental systemic inflammation model: a novel role for CETP, *Shock* 30 (2008) 590–595.
- [97] T.M. Venancio, R.M. Machado, A. Castoldi, M.T. Amano, V.S. Nunes, E. C. Quintão, N.O. Camara, F.G. Soriano, P.M. Cazita, CETP lowers TLR4 expression which attenuates the inflammatory response induced by LPS and polymicrobial sepsis, *Mediat. Inflamm.* 2016 (2016), 1784014.
- [98] P.J. Barter, M. Caulfield, M. Eriksson, S.M. Grundy, J.J. Kastelein, M. Komajda, J. Lopez-Sendon, L. Mosca, J.C. Tardif, D.D. Waters, C.L. Shear, J.H. Revkin, K. A. Bühr, M.R. Fisher, A.R. Tall, B. Brewer, I. ILLUMINATE, Effects of torcetrapib in patients at high risk for coronary events, *New Engl. J. Med.* 357 (2007) 2109–2122.
- [99] R.W. Clark, D. Cunningham, Y. Cong, T.A. Subashi, G.T. Tkaleciv, D.B. Lloyd, J. G. Boyd, B.A. Chrunyk, G.A. Karam, X. Qiu, I.K. Wang, O.L. Francone, Assessment of cholesteryl ester transfer protein inhibitors for interaction with proteins involved in the immune response to infection, *J. Lipid Res.* 51 (2010) 967–974.
- [100] C.M. Grion, L.T. Cardoso, T.F. Perazolo, A.S. Garcia, D.S. Barbosa, H.K. Morimoto, T. Matsuo, A.J. Carrilho, Lipoproteins and CETP levels as risk factors for severe sepsis in hospitalized patients, *Eur. J. Clin. Investig.* 40 (2010) 330–338.
- [101] S.H. Liu, H.Y. Liang, H.Y. Li, X.F. Ding, T.W. Sun, J. Wang, Effect of low high-density lipoprotein levels on mortality of septic patients: a systematic review and meta-analysis of cohort studies, *World J. Emerg. Med.* 11 (2020) 109–116.
- [102] M. Trinder, K.R. Genga, H.J. Kong, L.L. Blauw, C. Lo, X. Li, M. Cirstea, Y. Wang, P. Rensen, J.A. Russell, K.R. Walley, J.H. Boyd, L.R. Brunham, Cholesteryl ester transfer protein influences high-density lipoprotein levels and survival in sepsis, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 199 (2019) 854–862.
- [103] E.A. Woźnica, M. Inglot, R.K. Woźnica, L. Łysenko, Liver dysfunction in sepsis, *Adv. Clin. Exp. Med.* 27 (2018) 547–551.
- [104] Z. Li, Y. Wang, R.J. van der Sluis, J.W. van der Hoorn, H.M. Princen, M. Van Eck, T.J. Van Berkel, P.C. Rensen, M. Hoekstra, Niacin reduces plasma CETP levels by diminishing liver macrophage content in CETP transgenic mice, *Biochem. Pharm.* 84 (2012) 821–829.
- [105] Y. Wang, S. van der Tuin, N. Tjeerdema, A.D. van Dam, S.S. Rensen, T. Hendrikx, J.F. Berbée, B. Atanasovska, J. Fu, M. Hoekstra, S. Bekkering, N.P. Riksen, W. A. Buurman, J.W. Greve, M.H. Hofker, R. Shiri-Sverdlov, O.C. Meijer, J.W. Smit, L.M. Havekes, K.W. van Dijk, P.C. Rensen, Plasma cholesteryl ester transfer protein is predominantly derived from Kupffer cells, *Hepatology* 62 (2015) 1710–1722.
- [106] S.J.L. van der Tuin, Z. Li, J.F.P. Berbée, I. Verkouter, L.E. Ringnald, A.E. Neele, J. B. van Klinken, S.S. Rensen, J. Fu, M. de Winther, A.K. Groen, P. Rensen, K. Willems van Dijk, Y. Wang, Lipopolysaccharide lowers cholesteryl ester transfer protein by activating F4/80⁺Clec4e⁺Vsig4⁺Ly6C⁺ Kupffer cell subsets, *J. Am. Heart Assoc.* 7 (2018), e008105.
- [107] L.L. Blauw, Y. Wang, K. Willems van Dijk, P.C.N. Rensen, A novel role for CETP as immunological gatekeeper: raising HDL to cure sepsis? *Trends Endocrinol. Metab.* 31 (2020) 334–343.
- [108] H.W. Harris, S.E. Brady, J.H. Rapp, Hepatic endosomal trafficking of lipoprotein-bound endotoxin in rats, *J. Surg. Res.* 106 (2002) 188–195.
- [109] P.M. Grin, D.J. Dwivedi, K.M. Chathely, B.L. Trigatti, A. Prat, N.G. Seidah, P. C. Liaw, A.E. Fox-Robichaud, Low-density lipoprotein (LDL)-dependent uptake of Gram-positive lipoteichoic acid and Gram-negative lipopolysaccharide occurs through LDL receptor, *Sci. Rep.* 8 (2018) 10496.
- [110] B. Shao, R.S. Munford, R. Kitchens, A.W. Varley, Hepatic uptake and deacylation of the LPS in bloodborne LPS-lipoprotein complexes, *Innate Immun.* 18 (2012) 825–833.
- [111] Z. Yao, J.M. Mates, A.M. Cheplowitz, L.P. Hammer, A. Maiseyue, G.S. Phillips, M. D. Wewers, M.V. Rajaram, J.M. Robinson, C.L. Anderson, L.P. Ganesan, Blood-borne lipopolysaccharide is rapidly eliminated by liver sinusoidal endothelial cells via high-density lipoprotein, *J. Immunol.* 197 (2016) 2390–2399.

- [112] J. Li, K. Xia, M. Xiong, X. Wang, N. Yan, Effects of sepsis on the metabolism of sphingomyelin and cholesterol in mice with liver dysfunction, *Exp. Ther. Med.* 14 (2017) 5635–5640.
- [113] E. Pandey, A.S. Nour, E.N. Harris, Prominent receptors of liver sinusoidal endothelial cells in liver homeostasis and disease, *Front. Physiol.* 11 (2020) 873.
- [114] N.N. Kuzmich, K.V. Sivak, V.N. Chubarev, Y.B. Porozov, T.N. Savateeva-Lyubimova, F. Peri, TLR4 signaling pathway modulators as potential therapeutics in inflammation and sepsis, *Vaccines* 5 (2017) 34.
- [115] Y. Wen, J. Lambrecht, C. Ju, F. Tacke, Hepatic macrophages in liver homeostasis and diseases-diversity, plasticity and therapeutic opportunities, *Cell. Mol. Immunol.* 18 (2021) 45–56.
- [116] A.T. Nguyen-Lefebvre, A. Horuzsko, Kupffer cell metabolism and function, *J. Enzym. Metab.* 1 (2015) 101.
- [117] X. Liang, T. Li, Q. Zhou, S. Pi, Y. Li, X. Chen, Z. Weng, H. Li, Y. Zhao, H. Wang, Y. Chen, Mesenchymal stem cells attenuate sepsis-induced liver injury via inhibiting M1 polarization of Kupffer cells, *Mol. Cell. Biochem.* 452 (2019) 187–197.
- [118] F. Xu, Y. Ma, W. Huang, J. Gao, M. Guo, J. Li, L. Kong, G. Liang, R. Du, Q. Xu, X. Wu, Typically inhibiting USP14 promotes autophagy in M1-like macrophages and alleviates CLP-induced sepsis, *Cell Death Dis.* 11 (2020) 666.
- [119] J.B. Dixon, Mechanisms of chylomicron uptake into lacteals, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1207 (2010) E52–E57.
- [120] E.G. Pérez-Hernández, V.M. De la Puente- Díaz de León, I. Luna-Reyes, J. Sifuentes-Osornio, J. Mas-Oliva, New Biomarkers in Sepsis and Septic Shock. CETPI and peptides derived from its C-terminal Segment as Defining Molecules of Disease Severity. (Submitted).
- [121] K.R. Groschwitz, S.P. Hogan, Intestinal barrier function: molecular regulation and disease pathogenesis, *J. Allergy Clin. Immunol.* 124 (2009) 3–22.
- [122] T.S.R. van Engelen, W.J. Wiersinga, B.P. Scicluna, T. van der Poll, Biomarkers in sepsis, *Crit. Care Clin.* 34 (2018) 139–152.
- [123] C. Pierrakos, D. Velissaris, M. Bislorff, J.C. Marshall, J.L. Vincent, Biomarkers of sepsis: time for a reappraisal, *Crit. Care* 24 (2020) 287.
- [124] I. Luna-Reyes, E.G. Pérez-Hernández, B. Delgado-Coello, M.A. Ávila-Rodríguez, J. Mas-Oliva. Peptide VSAK maintains tissue glucose uptake and attenuates pro-inflammatory responses caused by LPS in an experimental model of the Systemic Inflammatory Response Syndrome; a PET study. (Submitted).