

10



Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

LIPOPOLISACÁRIDOS Y LA ENFERMEDAD  
PERIODONTAL

T E S I N A

PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
CIRUJANA DENTISTA

P R E S E N T A :

YURIA NICTHE ALARCÓN HERNÁNDEZ

DIRECTORA:

DRA. GLORIA GUTIÉRREZ VENEGAS

México, D. F.

2002



TEJIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.



## JURADO ASIGNADO

Presidente: C. D. LUZ DEL CARMEN GONZÁLEZ GARCÍA. 

Vocal: C. D. GERARDO MARTÍNEZ ANAYA. 

Secretario: DRA. GLORIA GUTIÉRREZ VENEGAS.

1er. Suplente: M. C. JAIME ESQUIVEL SOTO. 

2do. Suplente: M. C. HECTOR GONZÁLEZ AGUILAR. 

Trabajo realizado en el Departamento de Bioquímica. Facultad de Odontología U.N.A.M Bajo la tutoría de la Dra. Gloria Gutiérrez Venegas.

Directora:

\_\_\_\_\_  
Dra. Gloria Gutiérrez Venegas

Sustentante:

  
\_\_\_\_\_  
Yuria Nicthe Alarcón Hernández

## **AGRADECIMIENTOS**

### **A MI QUERIDA:**

Universidad Nacional Autónoma de México  
por haberme brindado el honor  
de pertenecer a ella.

### **EN ESPECIAL A LA:**

Doctora Gloria Gutiérrez Venegas.  
Por haberme proporcionado  
sus conocimientos,  
su tiempo incondicional  
y su gran dedicación.

### **A PERLA KAWASAKI:**

Por su ayuda en la realización  
de esta investigación.

### **AL JURADO:**

Por la revisión y  
comentarios al trabajo.

### **A DIOS:**

Por darme la oportunidad  
de concluir una etapa  
más en mi vida.

### **A MIS FAMILIARES:**

Por todo su apoyo,  
cariño y amor.

### **A TODAS AQUELLAS PERSONAS:**

Que de alguna manera  
me han aportado su amor  
y ayuda incondicional.

## **DEDICATORIA**

Esta tesina va dedicada a las personas que siempre han estado conmigo  
alentándome en todo momento:

### **MIS PADRES:**

Pilar Hernández y Adalberto Alarcón.

Por su apoyo,  
por creer en mí

### **MIS HERMANAS:**

Verónica y Yunuen.

por su ayuda incondicional,  
su ejemplo.

***Gracias por su haberme enseñado el  
significado de la palabra amor.***

# ÍNDICE

1. Abreviaturas.....	1
2. Resumen.....	2
3. Introducción.....	4
4. Antecedentes.....	6
4.1 Historia.....	6
4.2 Estructura.....	26
4.3 Biosíntesis.....	28
4.3.1 Biosíntesis del O-polisacárido.....	28
4.3.2 Biosíntesis del lípido A.....	29
4.3.3 Biosíntesis del polisacárido central.....	31
4.4 Los LPS y la permeabilidad de la membrana externa bacterial.....	31
4.5 Heterogenicidad de los LPS.....	34
4.6 Liberación de endotoxinas inducida por antibióticos.....	36
4.6.1 Tipos de antibióticos que regulan la liberación de endotoxinas.....	39
4.6.2 La afinidad en la asociación PBP afecta la morfología bacteriana y la liberación de endotoxinas.....	40

4.7 Liberación de Lipopolisacáridos mediada por el complemento.....	42
4.7.1 Interacción de proteínas del complemento con LPS.....	47
4.7.1.1 C1.....	47
4.7.1.2 C3.....	48
4.7.1.3 MAC.....	49
4.7.2 Requerimientos estructurales de los LPS para la activación el complemento.....	51
4.7.3 El papel del complemento en la liberación del LPS.....	52
4.7.4 El papel del complemento en la depuración del LPS.....	54
4.7.5 El papel del complemento en la opsonización y activación de fagocitos.....	56
4.7.6 Efecto de los lipopolisacáridos en la producción del complemento.....	57
4.8 Aspectos Biofísicos en la función y actividad de los LPS.....	58
4.8.1 Función de las endotoxinas como constituyente de la membrana bacterial externa.....	63
4.8.2 Potencial de Membrana.....	63
4.8.3 Preparación de LPS en medios acuosos.....	65
4.8.4 Concentración micelar crítica y solubilidad.....	66
4.8.5 Efecto del pH en la solubilidad del LPS <sub>Re</sub> .....	66
4.8.5.1 Actividad de LPS- <sub>Re</sub> monoméricos.....	66
4.8.6 Implicación para estudios de laboratorio y patogénesis.....	67

4.8.7 LPS monomérico se requieren para la especificidad estructural.....	67
4.9 Proteínas de asociación a LPS.....	70
4.9.1 Ensayo.....	72
5. Lipopolisacáridos y la Enfermedad Periodontal.....	77
5.1 Composición y estructura de los lipopolisacáridos orales.....	79
5.2 Los LPS de las bacterias bucales y su composición química.....	79
5.3 Estructura del lípido A obtenido de bacterias orales.....	81
5.4 Región polisacárida de los LPS orales.....	82
5.5 Estimulación de mediadores inflamatorios por LPS orales.....	82
5.6 Los LPS modulan la respuesta del huésped.....	83
5.7 Efectos de los lipopolisacáridos sobre células del periodonto.....	83
5.8 Mecanismos de destrucción del hueso alveolar y del ligamento periodontal.....	87
6. Conclusión.....	88
7. Bibliografía.....	89

## **1. ABREVIATURAS**

**BPI:** Proteínas que incrementan la permeabilidad/bactericida.

**CETP:** Proteínas de transporte de ésteres de colesterol.

**CMC:** Concentración miselar crítica.

**Gal:** D-galactosa.

**Glc:** D-glucosa.

**GlcN:** D-glucosamina.

**HDL:** Lipoproteína de alta densidad.

**IFN- $\gamma$ :** Proteína producida por los leucocitos (interferón).

**ICI:** Creciente índice de citación.

**IgG:** Inmunoglobulina G.

**IgM:** Inmunoglobulina M.

**IL-1:** Interleucina 1.

**IL-6:** Interleucina 6.

**IL-8:** Interleucina 8.

**Kdo:** 2-ceto-3-desoxi-mano-octulosónico.

**LBP:** Proteína de asociación al lipopolisacárido.

**LDL:** Lipoproteína de baja densidad.

**LPS:** Lipopolisacárido.

**MCP-1:** Proteína quimiotáctica monocítica.

**MMP:** Metalo proteinasas.

**PBP:** Proteína de asociación a penicilina.

**PGE<sub>2</sub>:** Prostaglandina E<sub>2</sub>.

**PLTP:** Proteína que transporta fosfolípido.

**TGF- $\beta$ :** Regulador esencial en el control de la inflamación.

**TNF:** Factor de necrosis tumoral.

**VLDL:** Lipoproteínas de muy baja densidad.

## 2. RESUMEN

La composición de la membrana externa de las bacterias gram-negativas es extremadamente asimétrica con respecto a la estructura química y carga de los lípidos. De tal manera que la capa externa de la membrana externa está enriquecida en endotoxinas también llamados lipopolisacáridos (LPS) y la capa interna de fosfolípidos.

Las características más importantes que distinguen a los LPS de los otros lípidos de membrana son la presencia de tres grupos hidroxilo y la de grupos fosfato en el lípido A. El LPS es la región tóxica de las bacterias.

El estudio sobre la endotoxina ha atraído el interés de microbiólogos y genetistas bacterianos que quisieron entender su biosíntesis y la base molecular de su función vital para las bacterias. Incluso se han vuelto un asunto de mayor investigación en la inmunología e inmunoquímica. Éstas al igual parecen estar involucradas en el desarrollo normal del sistema de la defensa del organismo y de las bacterias entre la interacción fisiológicas y los organismos de los mamíferos.

En nuestra investigación presentamos algunos antecedentes históricos sobre los estudios logrados por algunos científicos y especialistas en este campo. Así mismo presentamos la estructura del lipopolisacárido con su biosíntesis y su relación con la cascada de complemento. Principalmente mostramos como los LPS influyen en la enfermedad periodontal.

Durante la investigación mencionamos que la placa dentobacteriana está compuesta por más de 300 diferentes especies de bacterias que conllevan a la enfermedad periodontal porque produce una inflamación crónica que implica la destrucción del hueso alveolar y la pérdida de tejido

conectivo presentando un incremento en el número de bacterias de  $10^5$  hasta  $10^8$  microorganismos. Y declaramos que este incremento se produce con una clara asociación de bacterias de tipo gram-negativas.

También mostramos que las endotoxinas actúan sobre los fibroblastos gingivales que sintetizan y liberan IL-8 y proteína quimotáctica monocítica (MCP-1). En este sentido los monocitos son capaces de responder a concentraciones muy bajas de LPS produciendo una amplia variedad de mediadores de procesos inflamatorios que estimulan a otros tipos celulares como son los linfocitos y los osteoclastos.

### 3. INTRODUCCIÓN

La fascinación hacia el lipopolisacárido bacteriano se relaciona a sus actividades biológicas multicopistas y diversas, su estructura química compleja, su estructura física, sus propiedades del serológicas, y su función fisiológica para las bacterias (1). Las endotoxinas (o lipopolisacáridos) son formadas por un cierto grupo de bacterias gram-negativas que difieren de otros microorganismos por la arquitectura de su pared celular. Las endotoxinas son componentes íntegros de estos microorganismos y es esencial para el crecimiento y viabilidad bacteriana. Por consiguiente, la endotoxina ha atraído el interés de microbiólogos y genetistas bacterianos que quisieron entender su biosíntesis y la base molecular de su función vital para las bacterias.

Por otro lado, las endotoxinas son toxinas potentes que, en organismos más evolucionados tienen un gran espectro de efectos dañinos y eso contribuye al potencial patogénico de las bacterias. Por lo tanto, investigadores clínicos y biológicos de las endotoxinas intrigados partieron en tratar de poner en claro su modo de acción y para inventar estrategias que apunten al mando de los efectos perjudiciales de las endotoxinas observadas durante la infección bacteriana y sepsis.

Las endotoxinas participan de manera activa en el sistema de la defensa mamífero. Ellas no sólo inducen la formación de anticuerpos contra LPS sino también a los antígenos de otras especies y activan células inmunes que producen la capacidad reforzada del cuerpo de cubrir con infecciones microbianas así como los tumores malignos. Por consiguiente, las endotoxinas se han vuelto un asunto de mayor investigación en la inmunología e inmunquímica. Ellas al igual parecen estar involucradas en el desarrollo normal del sistema de la defensa del organismo y de las

bacterias entre la interacción fisiológicas y los organismos de los mamíferos. Las endotoxinas se han encontrado en organismos que aparecieron antes de la ascensión de hombre, hace 2 mil millones años como ancestros de largas algas azul-verdes. También encontramos que se temen a menudo endotoxinas por investigadores en inmunología celular y los campos relacionados: las cantidades pequeñas de endotoxinas están presentes en la vida y pueden contaminar cristalería, proteínas recombinadas, los medios de cultivos y herramientas de la investigación o reactivos en general. La endotoxina se expresa bioactivamente en dosis sumamente pequeñas.

Finalmente, las endotoxinas que poseen una estructura primaria compleja y una arquitectura tridimensional compleja les han fascinado siempre a químicos y físicos que han tratado de aclarar esas estructuras que son responsable para la actividad de la endotoxina y función de modificar las estructuras de manera semejante que ellas sueltan sus propiedades tóxicas mientras desplegando todavía beneficioso, efectos immunoestimulados.

Muchos volúmenes excelentes y revisiones tempranas y recientes progresos científicos cubren en este campo de investigación de la endotoxina que ha llevado a reconocer que las endotoxinas no sólo representan venenos poderosos, sino también los O-antígenos de las bacterias gram-negativas, y que ellos constituyen químicamente lipopolisacáridos (1-5). Sin embargo, sólo de vez en cuando, la historia tiene descripciones de esos científicos y doctores abriendo camino que pavimentó la manera para el descubrimiento de endotoxinas y de su descripción química y biología (6-8). A continuación se realizará una investigación bibliográfica sobre el estudio de los lipopolisacáridos.

## 4. ANTECEDENTES

### 4.1. Historia

*"La investigación bacteriológica no puede adelantarse suficientemente sin el conocimiento de su desarrollo histórico. Un científico debe saber lo que se ha logrado y que información ha sido acumulada en su campo de trabajo. Que crítica habría expresado uno o el otro expresado con respecto a su propio trabajo, si él hubiera sido consciente de los desarrollos históricos en bacteriología. Quizá, los numerosos papeles nunca habrían sido publicados."*

*Friedrich Loeffler (1852-1915)*

La primera conferencia internacional dedicada principalmente al estudio de las endotoxinas bacterianas tuvo lugar en Nueva York en el año 1952, fue organizada por Florence Seibert (1897-1991) (Fig. 1), una pionera en el estudio de pirógenos, ella investigó e introdujo una prueba sensible para la pirogenicidad en conejos (9), en sus comentarios introductorios a la conferencia de 1952 mencionó que:

*"El aislamiento de un pirógeno puro y estable con buena definición química y las propiedades biológicas que podrían reproducirse fácilmente, proveería una valiosa norma para la evaluación de uso del pirógeno" (10).*

Obviamente, en ese tiempo no se conocía la naturaleza exacta de pirógenos, pero de uno de sus estudios ella concluyó: "El pirógeno es un

producto filtrable producido por una bacteria específica" (11). En sus esfuerzos por identificar el material pirogénico que contaminó drogas farmacéuticas y fluidos de infusión, ella terminó siempre con cantidades tan pequeñas de lo que pudo haber sido la sustancia pirogénica con lo que la caracterización del material era imposible. Florence Seibert llamó al material bioactivo su "pequeño demonio azul", mostrando ambos su afecto hacia y la frustración con el material que habría resultado más tarde ser endotoxina. Uno de sus estudiantes, Dennis W. Watson, trabajando con ella en 1939 en Filadelfia, identificó del principio bioactivo de la endotoxina.

La segunda conferencia de endotoxina, y la primera en Europa, fue organizada por Otto Westphal, en Freiburg, Alemania, en agosto de 1958. Estas conferencias del estudio de la endotoxina abriendo camino y fueron seguidas por muchas otras con frecuencia creciente (a intervalos casi anuales) con un número creciente de científicos de por el asistir mundial.

Debido a la iniciativa, entusiasmo, y paciencia de L. Joe Berry (1910-1987), profesor de microbiología en la Universidad de Texas, Austin, se fundó la Sociedad Internacional de Endotoxina (IES) en el año 1988 con Alois Nowotny (1922-1992), profesor de inmunología en la Universidad de Pennsylvania, Filadelfia, como el primer presidente. Esta Sociedad creció rápidamente y hoy representa con sus aproximadamente 600 miembros una de las organizaciones científicas internacionales más grandes. Como otro paso importante, en 1994 se fundó el *Journal of Endotoxin Research* (JER), con David C. Morrison, distinguido profesor de Investigación de Cáncer en el Centro Médico de la Universidad de Kansas, como el primer editor en jefe. Dentro de su corta vida, el Periódico ha ganado reconocimiento científico significativo por el que se expresa su notablemente el ICI creciente índice de citación.

Gracias al trabajo de Albrecht von Haller (1708-1777) y otros médicos y científicos, fue reconocida que la inyección intravenosa de fluidos podridos, como los obtenidos de materia orgánica descompuesta de pez o carne, en los animales experimentales evocó fiebre y otras manifestaciones de enfermedad (12), a diferencia de extractos de pez fresco o carne que no se produjeron reacciones febriles. François Magendie (1783-1855), director del servicio médico del hospital Parisiense más viejo, L'Hôtel-Dieu, apuntó sus frecuentes observaciones alrededor de las insuficiencias médicas de condiciones no higiénicas. Las masas de material de plantas y de origen animal sufrían deterioración y putrefacción y ocurrían enfermedades severas, incluso la plaga y cólera. Magendie hizo la pregunta fundamental, si allí pudiese existir una conexión entre la putrefacción, producción de la toxina, y la iniciación de fiebre o enfermedad (13).

El danés Peter L. Panum (1820-1885) (Fig. 2), entonces profesor asociado de fisiología y patología en Kiel, Alemania, intentó caracterizar el veneno podrido, trabajo que ahora puede ser considerado como la iniciación de investigación sistemática y científica de la endotoxina. En 1874, él publicó su trabajo que trata de sus esfuerzos más tempranos (alrededor de 1856) para purificar el principio activo del veneno podrido que él resumió de la siguiente manera (14):

- "El veneno del podrido no es volátil y no es un producto del extremo simple conocido de putrefacción de fermentación. Él diferenció de microorganismos vivientes que pueden ser la fuente pero no la causa".
- "La toxina se resiste al calor por lo que difiere de las enzimas típicas" (en ese momento llamado Fermente alemán).

- "Es insoluble en alcohol puro pero soluble en agua. La proteína como la substancia toxina se presenta más frecuentemente en fluidos podridos, que absorben condense la toxina en su superficie cuando esta se precipita. El principio tóxico puede ser, por lo menos parcialmente, atribuido a la precipitación".

Mirando los resultados de Panum se pone evidencia el hecho de que fue él quien dio una pizca de lo que es la endotoxina, un término que no se había acuñado todavía. Por consiguiente, Panum puede considerarse como el primer investigador de la endotoxina.



Fig. 1 Florence Seibert (1897-1991)  
Recibe un reconocimiento por  
Eleonore Roosevelt



Fig. 2 Peter L. Panum. (1820-1885)

El primer uso del material pirogénico, el crédito debe darse a Theodor Billroth (1829-1894) profesor de cirugía en Zurich, Suiza, y Viena, Austria, en su publicación de 1862 mencionó: "Observaciones de la fiebre por heridas y accidentes, causaron enfermedades en la herida," él declaró: "Las

substancias pirogénicas están igualmente presentes en material podrido secado y pus seco como en fluidos podridos y en pus fresco" (15). Independientemente, el término "substancia pirogénica" se usó en 1873 por Bernhard Naunyn (1839-1925), profesor de medicina interna en Dorpat, Berna, Suiza, Königsberg, la Rusia (ahora Kalininugrad), y Estrasburgo, Francia, para designar el principio productor de fiebre (16). Finalmente, Sir John Burdon-Sanderson (1828-1905), fisiólogo británico y eminente patólogo, declaró en una revisión de 1896: "En 1875 yo preparé una substancia del extracto podrido de carne que yo aventuré llamar pirógeno. Este producto estéril produjo fiebre" (17).

Burdon-Sanderson, siguiendo la tradición Panum y von Bergmann, intentó y aparentemente tuvo éxito de purificar su pirógeno del material podrido. Hoy no es posible decidir si las observaciones de las preparaciones eran endotoxinas o, quizás, eran concentrados de mediadores endógenos como interleucina 1 y 6 o factor de necrosis tumoral  $\alpha$ . En todo caso, también fue Burdon-Sanderson quien se preguntó en 1876 (18), si la substancia pirogénica era de origen endógeno y está presente en sangre o fluido del tejido. Alternativamente, él defendió que material pirogénico podría venir de las fuentes exógenas, como microbios.

Los años 1870-1905 comprenden el periodo en que el concepto de que las infecciones eran debidas a los microorganismos. Hasta entonces, se creía que las enfermedades ocurrían endémicamente o epidémicamente, como plaga y cólera, eran debido al miasma, un material volátil no visible que se origina de la tierra o en áreas debajo de la tierra. El miasma también se llamó "aire malo" (*inale d'ania*), de ahí el origen de la palabra malaria, se pensaba que las infecciones no tenía lugar de persona a persona sino a través de factores medioambiental del miasma. Así, se crearon dos escuelas: una que favorecía la idea de miasma y otra la del concepto de contagio.

En 1840 Jakob Helen (1809-1885), profesor para la patología y anatomía en Göttingen, Alemania, y maestro de Robert Koch, había señalado ese contagio y el miasma puede, de hecho, sea idéntico y represente materia viviente orgánica que posee la habilidad de multiplicar y crecer en el individuo enfermo y causa por eso irritación y enfermedad (19). Pero Helen no tenía ninguna prueba para su ingenioso concepto. Tomó casi 25 años para la idea de fermentación basado en microbios y putrefacción que producen enfermedad pudiera ser aceptada.

Fue Louis Pasteur (1822-1895), en París quien convincentemente mostró que las clases de enfermedades, a las que ahora nos referimos como enfermedades infecciosas, eran provocadas por pequeños microorganismos animados que, siendo asociado con polvo en el aire, podría transportarse por todas partes hasta alcanzar heridas, donde ellos se multiplicarían y causarían infecciones.

El bacteriólogo alemán Edwin Klebs (1834-1913) cuyo nombre se recuerda en el género de la enterobacteria *Klebsiella*, claramente declaró que las infecciones severas eran causadas por microorganismos que se originaron de las fuentes externas y podrían invadir tejidos saludables pero irritados. Durante la guerra de Franco-Prusiana, Klebs realizó 115 autopsias entre el 17 de agosto y el 17 de octubre de 1870, y no sólo comprendió que 75% de las muertes eran debidos a la septicemia, sino que también esa septicemia fue causada por microorganismos que él llamó *Microsporon septicum*. En uno de sus informes, él hizo la siguiente declaración notable:

"Durante el desarrollo de *Microsporon septicum* se genera una substancia productora de fiebre. La fiebre continua y es causada por el transporte continuo de esta substancia en el organismo"  
(20)

Klebs describió la acción de productos bacterianos que incluirían endotoxinas.

Robert Koch (1843-1910), al final de su carrera como director del Instituto de Berlín para Enfermedades Infecciosas caracterizó a los microorganismos como agentes causativos de enfermedades específicas. Koch basó sus conclusiones inicialmente en experimentos con animales, finalmente él contribuyó grandemente a la comprensión de la participación microbiana en infecciones de heridas de 1880 en adelante, utilizando miles de soldados heridos en tiempo de guerra de países como Egipto y la India que padecieron epidemias desastrosas como cólera y apoyando sus ideas con animales experimentales usando cultivos de bacterias como agentes infecciosos.

Ludwig Brieger (1849-1919) analizó bacilo de la tifoidea, que se había descubierto en 1880 por Joseph Eberth (1835-1926). Brieger demostró la generación de un material tóxico que él llamó tifotoxina (21 y 22), de hecho, fue Brieger quien por primera vez introdujo el término toxina. Durante las investigaciones en los cultivos de otros bacilos, de un peso molecular alto y substancia tóxica de naturaleza proteica podría enriquecerse y prepararse como un polvo estéril, los autores llamaron toxalbúmina. (Hoy se sabe que las toxalbúminas eran proteínas que son pizca del complejo de cantidades variables de endotoxinas.) Estas toxalbúminas o albumosas demostraron a menudo ser pirógeno y tóxico en experimentos con animales.

Hans Buchner (1850-1902) apuntó a la contestación leucocítica como una reacción de alarma de los mecanismos de defensa estimulados después de la inyección de toxalbuminas (23 y 24).

Sin embargo, Ludolf von Krehl (1861-1937), en investigaciones extendidas y cuidadosas, mostró esas albumosas era de pirogenicidad significativamente más baja que arranca el pirógeno principal por ser inadecuado.

En el año 1884. Robert Koch había identificado *Vibrio cholerae* como el agente microbiano causante de cólera, y estaba siguiendo en sus laboratorios la investigación activa para caracterizar los factores patógenos que dan estas bacterias. Estudios realizados principalmente en Francia, Alemania, y los Estados Unidos habían revelado que las bacterias patógenas producían sustancias tóxicas que, en forma aislada, indujeron muchas de las reacciones fatales vistas durante infecciones bacterianas severas. La toxina de la difteria que se aisló en 1888-1890 de filtrados de cultivos por Pierre Paul Emile Roux (1853-1933) y Alexander Yersin (1863-1943) en el Instituto Pasteur en París, demostró ser de naturaleza proteica.

Entre los colaboradores más importantes de Koch estaba Richard Pfeiffer (1858-1945) (Fig. 3). Pfeiffer observó como esos vibrios de cólera soltaron una toxina en el medio de cultivo. Él notó, sin embargo, que esos vibrios de cólera produjeron, además, una segunda, toxina bastante diferente que aparecía atarse firmemente a la célula bacteriana. En su primera publicación en la materia (25), Pfeiffer menciona:

"En condiciones aerobias en los cultivos de cólera creció una sustancia tóxica específica que ejerce extremadamente intensos efectos tóxicos. Esta toxina de cólera primero se ata estrechamente al cuerpo bacteriano. Por cloroformo, timol, o secando, los vibrios de cólera pueden matarse sin cualquier cambio perceptible de la toxina."

TELIS CON  
FALSA DE ORIGEN

Pfeiffer había descubierto la endotoxina y fue él quién introdujo el término endotoxina. Se puede concluir esto debido a una revisión de Alfred Wolff, médico en la Clínica Universitaria Médica en Munich, Alemania, resumiendo los conceptos pertinentes en toxinas bacterianas así como la inmunidad a las toxinas y las bacterias productoras de enfermedades como *V. cholerae* (26). En esta revisión de 1904, Wolff escribe:

"Richard Pfeiffer dio un nombre específico a la substancia bacteriana que ejerce una acción de la toxina que en definitivamente diferente de las toxinas ya conocidas. Él lo llamó la endotoxina. El creador de este nombre basó su concepto en la opinión correcta que su principio tóxico no se excreta de las bacterias vivientes, sino que es parte de los electores del cuerpo bacteriano. En contraste con las toxinas típicas, estas substancias venenosas no se secretan en el medio de cultivo, pero ellos se liberan, si las bacterias sufren lisis y bacteriolisis".

En el mismo artículo, Wolff da la siguiente definición biológica de endotoxina: "La toxina y endotoxina son substancias venenosas que en dosis definidas causan muerte de animales inyectados después de un cierto tiempo de incubación"(26).

Aproximadamente al mismo tiempo, se hizo un adelanto en la caracterización de la endotoxina por el italiano Eugenio Centanni (1863-1948), director del Instituto de Patología General en la Universidad de Bolonia. En 1894, él empezó a publicar una serie de artículos el primero de que se tituló: "las investigaciones en fiebre infecciosa -la toxina de fiebre bacterianas" (27-29) donde Centanni describe la preparación de lo que él llamó pirotoxina bacterica. En principio, él usó a largo plazo (al día 10) la auto-lisis de cultivos puros bacterianos, trabajando al filtrado estéril por alcohólico y otros procedimientos de fracción y terminando con un polvo blanco estéril. Él pudo producir más o menos el mismo material pirogénico de

una variedad grande de bacterias incluso de *E. coli*, *S. typhis*, y otros. Centanni obtuvo finalmente de las bacterias esencialmente la misma toxina, un veneno que depende del cuadro típico de las perturbaciones generales causante de infecciones bacterianas (30). Para esto se basó en datos de sus preparaciones pirogénicas, se puede asumir que él alcanzó un grado bastante alto de purificación de endotoxina.

El Médico dinamarqués Hans-Christian Gram (1853-1939), en 1884 determinó que las bacterias podrían ser divididas en dos grupos (31). A unas las llamó gram-negativas. Por consiguiente, las bacterias del segundo grupo las denominó gram-positivas como *Corynebacteria*, *Streptococo*, y *Staphylococcus* retuvieron el tinte y aparecían manchadas más a tintes azules. El grupo de bacterias gram-negativas comprende muchos patógenos importante tales como *V. cholerae*, *S. typhis*, *E. coli*, *Serratia marcescens*, además, *Yersinia pestis* (causantes de plaga), *Neisseria meningitidis*, y *Hemophilus influenzae* (causan gastritis y úlceras doudenal), *Klebsiella pneumoniae* (causante de neumonía), *Pseudomonas aeruginosa* (causando pulmonía e infecciones en heridas), entre otras.

Tomó varias décadas antes de los procedimientos del extracto selectivos se desarrolló permitiendo un examen más detallado de la toxina. Un gran pionero fue el microbiólogo francés André Boivin (1895-1949) quién, junto con la rumana Lydia Mesrobeanu (1908-1978) inventaron por primera vez en 1932 un procedimiento de aplicación para el extracto de la endotoxina de muchas bacterias gram-negativas: El método del ácido tricloroacético (TCA). Basándose sus análisis, Boivin y Mesrobeanu los llamaron antigénico, y el tóxico extraído glúcido-lipídicos de los antígenos, esos componentes principales eran lípido y polisacárido en naturaleza, con cantidades sólo pequeñas de proteína adicional (32-34). Pennel y Huddleson usaron TCA (0.25 N) para la preparación de fragmentos tóxicos

de las bacterias *Brucella*. Ellos nombraron el material bioactivo que contuvo lípido y reduciendo sustancias después de hidrólisis (azúcares) del endoantígeno (35).

Usando un método similar, Walter T. J. Morgan (36-38) en Londres y Walther F. Goebel (1899-1994) en Nueva York desarrollaron procedimientos de extractos extensos de mezclas de solventes orgánicos y agua. Sus sustancias purificadas, similares a Boivin y los productos de Mesrobeanu, estaban compuestas de polisacárido, lípido y proteína, el glicol dietileno de Morgan extraído de *Salmonella* y *Shigella* aparecía fisicoquímicamente como las sustancias homogéneas y uniformes. Morgan describió entonces métodos para la disociación del complejo en las subunidades estructurales como polisacárido no degradado o el polisacárido degradado en estudios sistemáticos, conjugó a la proteína simple y se limitó separadamente igual al lípido.

En los 1940's, Walther F. Goebel en Nueva York trabajó con *Shigella sonnei* y *Shigella flexneri* mostró que las preparaciones bioactivas contuvieron juntos a la pizca firmemente complementaria del límite que él llamó componente tóxico T (39). Por tratamiento ácido apacible él obtuvo un polisacárido O-específico (el polisacárido degradado de Morgan) y una proteína tóxica: proteína T (la proteína conjugada de Morgan), por tratamiento alcalino y fraccionación del alcohólico él pudo aislar un O-antigénico. En contraste, del polisacárido tóxico (polisacárido T) y proteína no tóxica (la proteína simple de Morgan). En el complejo de O-antigénico, por consiguiente, el componente T parecía formar el eslabón entre el O-antigénico polisacárido y proteína dependiendo del procedimiento de la disociación. Goebel obtuvo dos sustancias tóxicas diferentes en las que T se ligó al polisacárido adelante de la proteína. La naturaleza química del componente T, sin embargo, permaneció sin descubrirse y resultó, más tarde, ser idéntico al principio bioactivo de la endotoxina, es decir, el

componente del lípido A. Goebel y colaboradores determinaron el material bioactivo que obtuvo de *S. flexneri*, (40 y 41) el hidrato de carbono tóxico (CT) y aisló eso del lipocarbohidrato de *S. sonnei* (42).

Otro aspecto interesante de estos antígenos bacterianos se describió en 1934 por Gough y Frank M. Burnet (43). Estos autores habían aislado extractos bacterianos que consisten principalmente en polisacárido. Ellos mostraron que este fragmento del polisacárido no sólo era importante para sus propiedades serológicas sino también para la susceptibilidad del fago de bacterias.



Fig.3 Robert Koch (1843-1910)  
Sentado frente al microscopio con  
Richard Pfeiffer (1858-1945)



Fig.4 Otto Läderitz 1997

A principios de los años cuarenta, Murray Shear y colegas habían analizado los estudios de William Bradley Coley (1862-1936), un médico que trabajaba en Nueva York del que usó pirogénicamente la mezcla viva muy activa y, después, mató el *S. marcescens* y *Streptococo* (la toxina de Coley) para tratar a pacientes que padecen carcinomas y sarcomas (44 y 45). En

esfuerzos por aislar el factor de necrosis tumoral *S. marcescens*, el principio activo de la vacuna de Coley, un material fue obtenido por Shear, las figuras analíticas de que indicó la presencia de principalmente el polisacárido y material lipídico además de las cantidades pequeñas de proteína. Este compuesto fue designado, en 1943 por Shear y colaboradores el término lipopolisacárido (46 y 47).

Al final de los años cuarenta, Otto Westphal y Otto Lüderitz (Fig.4), que trabajan primero en el Instituto Vague Forschungs, (Säckingen, Alemania) y después en el Instituto Max Planck für Immunobiología (Freiburg, Alemania), empezaron su trabajo sistemático en la producción de fiebre y principio tóxico entéricos de *Salmonella*, *E. coli* y otra Enterobacteria. Ellos mostraron esa actividad pirogénica residía principalmente en el complejo O-antigénico probando todos los componentes característicos que fueron proporcionados por Walter Morgan. Polisacárido no degradado (polisacárido T de Goebel) era favorablemente pirogénico, la proteína conjugada (proteína T de Goebel), considerando que degradó el polisacárido y las proteínas simples estaban completamente desprovistas de actividad. Westphal y colegas desarrollaron un nuevo y eficaz procedimiento que era aplicable a una variedad de bacterias gram-negativas entonces y porque el material biológicamente activo podría extraerse en rendimiento alto y la pura forma: el método de extracto de agua caliente fenolada (48). El desarrollo de este método demostró ser un hito en investigación de la endotoxina. La aplicación del método clásico rindió preparaciones que estaban esencialmente libres de la proteína y consistieron en sólo hidrato de carbono, fósforo y ácidos grasos. Estas preparaciones exhibieron actividad biológica extrema con una dosis intravenosa tan pequeña como 1 ng/kg que causa fiebre en humanos. Para designar este bioactivo, Westphal y Lüderitz usaron el término lipopolisacárido (LPS).

El término lipopolisacárido tuvo dificultades para ser aceptado. Otros términos como liposacárido endotóxico, se propusieron después, pero no recibió la aceptación disfrutada por el término lipopolisacárido (49). Los estudios químicos, serológicos y biológicos del grupo Westphal-Lüderitz también establecieron que esa endotoxina, pirotoxina, O-antígeno, y lipopolisacárido (LPS) era uno y el mismo componente bacteriano y esos patógenos y bacterias no patógenas llevaron la molécula de LPS. La disponibilidad de LPS purificado permitió estudios acerca de la definición de esas regiones endotóxicas, pirogénicas responsables de las propiedades del O-antígeno del LPS a la explicación de sus estructuras químicas.

Estudios iniciales en la estructura química de la endotoxina fueron hechos en membranas de los grupos de bacterias gram-negativas que son parte de la flora normal del intestino o causante de enfermedades gastrointestinales. En base cualitativa -y después cuantitativa- los análisis de azúcar de una larga variedad de LPS de diferentes formas-S, el concepto surgió alrededor de 1960 estos lipopolisacáridos (o endotoxinas o O-antígenos) de diferente origen enterobacterial fue organizado de acuerdo a una estructura común por Otto Lüderitz, quien postuló (50) que esos LPS contienen tres regiones: Borde de la cadena O-específica, núcleo basal y lípido A. Para el análisis químico sobre 100 diferentes O-antígenos derivados de varios serotipos de *Salmonella* y *E. coli*, obviamente puede convertirse este O-antígeno contrayendo el complejo de los polisacáridos, que comprendieron de 5 a 8 monosacáridos diferentes (51-53). No obstante, preparó todos los LPS y contuvo 5 sustratos: tres hexosas; D-glucosa (Glc), D-galactosa (Gal) y D-glucosamina (GlcN), y dos componentes; glicosílicos inusuales, 2-Keto-3-ácido desoxioctónico (Kdo) su término correcto es; 3-desoxi-D-mano-octo-2-ácido ulosónico (dOclA), y L-glicerol-D-mano-heptosa (L,D-Hep). Estas heptosas fueron descritas por primera vez en 1952 por Jesaitis y Goebel (54) como un componente de LPS *Shigella sonnei*, la

correcta estereoquímica fue determinada en 1953 por Stein y Schnell (55) y en 1955 por Weidel (56). El Kdo fue descubierto más tarde como componente de LPS de *E. coli* en 1963 por Heard y Ghambor (57) y en el mismo año por Mary Jane Osborne el LPS de *Salmonella*. Estos azúcares fueron además cuatro derivados de material no complejo de lipopolisacáridos desde varias formas-R de bacterias que conformaron las principales formas-S.

Desde estos descubrimientos se concluyó que estas formas-S del LPS de *Salmonella* contenían una región común, lo cual fue mencionado por Lüderitz como la membrana nuclear común (o R- polisacárido). A este núcleo común está conectada la cadena específica compuesta de azúcares característicos de un serotipo. Por la designación de esta región el término O-específico de la cadena lateral fue inventado por Lüderitz, Staub y Westphal en 1966 (50). Fue también reconocida esta cadena lateral representando heteropolímeros compuestos de varios oligosacáridos idénticos, que fueron nombrados por Phil Robbins y colaboradores, trabajando con conversión lisogénica como unidades repetidas (58-61). Nalaido y colaboradores, introdujeron en 1966 el término S-específico de la cadena lateral -S significa "serotipo" (62). Aunque esta expresión parece apropiada, no fue aceptada en general, fue sustituida por el término unidad repetida.

Fritz Kauffmann (1898-1978) (Fig. 5), pionero en la investigación bacteriológica y director a cerca de estudios del Instituto Serum en Copenhagen, Dinamarca, definió los "serotipos" *Salmonella* y estableció un esquema de aglutinación serológica y clasificó aislados del género *Salmonella*, como se utiliza en medicina, veterinaria y microbiología vegetal hasta el día hoy (esquema de Kauffmann-White).



Fig.5 Fritz Kauffmann (1898-1978)

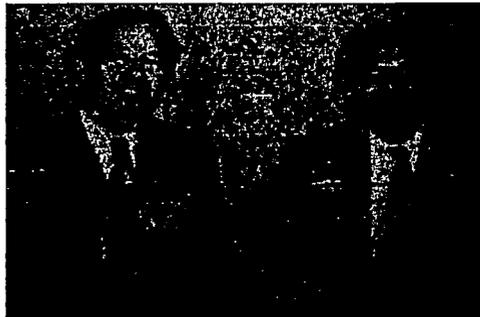


Fig 6. Tetsuo Shiba (derecha) y Shoichi Kusumoto (izquierda) 1997

Lüderitz y Westphal, cooperaron con Kauffmann, y en particular con Anne-Marie Staub en el Instituto Lois Pasteur en París, reconocieron con animales experimentales inoculados con bacterias gram-negativas producciones de anticuerpos específicos contra la cadena O-específica del LPS. Esto evidentemente convirtió este LPS los antígenos de la superficie constituidos de bacterias gram-negativas, la cadena O-específica que es responsable para las propiedades del O-antigénico de LPS. Después, la estructura final de esos determinantes, dentro de la cadena O-específica que reacciona con anticuerpos serotipos específicos, fue llamada primero por Staub motivos antigénicos, pero después, se conoció como O-factores (50 y 63-66). El término inmunodominante se acuñó en 1966 por Lüderitz y Staub después de una discusión extendida con Michael Heidelberger en Nueva York para definir el azúcar al que un anticuerpo exhibe la afinidad más fuerte, la mejor inhibición, la atadura de este anticuerpo (50). La primera síntesis de un azúcar de LPS inmunodominante (un O-factor), se realizó en 1960 por Lüderitz y colaboradores (67), quienes prepararon una proteína colitosa

conjugada que los anticuerpos induciendo un reactivo en cruz que contenía colitosa de bacterias o incluso su LPS de *E. coli* 0111 y 05.

El primer mutante de LPS en ser tratado fue el M-mutante (tipo-mutable) que se descubrió originalmente en 1959 por Murase (68) y bioquímicamente caracterizado por Nikaido (61, 69-71) a UDP-galactosa-4-epimerasa. Semejante al Rc-quimiotipo mutante derivado de *E. coli* 0111 y J5 (72) fue usado por los grupos de Braude (73) y Young (74 y 75) para engendrar anti-LPS humano y anticuerpos de monoclonal de murina que se esperaba una reacción en cruz con LPS de serotipos diferente y por los efectos de LPS creyeron para causar las manifestaciones tóxicas y desastrosas de sepsis bacteriana severa. Sin embargo, la repetición de ensayos clínicos reveló que los anticuerpos eran ineficaces para prevenir la letalidad que es el resultado de sepsis gram-negativa (76 y 77).

Probablemente los primeros científicos para reconocer un lipoidal precipitaron en el tratamiento de LPS (*Brucella melitensis*) con ácido mineral. Miles y Pirie en 1939 (78), por supuesto, no lo llamaron LPS -ellos usaron el término el antígeno nativo. No obstante, los estudios sistemáticos de los pioneros perseguían sólo estudiar los grupos de Morgan y Goebel reasumidos después de una década por Westphal y Lüderitz (79-82), quienes declararon en su revisión de 1954:

"El lípido A se obtiene, si el polisacárido es infradegradado (LPS) se trata por aproximadamente 30min a una temperatura un poco elevada N el ácido mineral. No es soluble en cloroformo y piridina" (82).

En Nueva York aparece Carl Niemann hacia el año 1958 quien fue el primero en describir a los electores principales de lípido A: D-GlicN, fósforo, y

(R)-3-ácido hidroximiriístico (83, 84). Posteriormente, Lüderitz y Westphal confirmaron estos datos y los extendieron, mostraron que el lípido A de *Salmonella* contuvo a los mismos electores. Las primeras estructuras proporcionadas que hicieron pensar en la presencia de un fofodiester polimérico se hicieron en 1961 -conteniendo arquitectura (85) o de ataduras glicosídicas entre los residuos de D-GlcN de posición desconocida (86).

Fue en 1969, cuando Jobst Gmeiner, trabajando entonces en el Instituto Max Planck en Freiburg y usando LPS de un *S. minnesota* Re-mutante, mostró por primera vez que el lípido A contenía un disacárido D-GlcN que son  $\beta(1-6)$  intereslabonado y lleva residuos de fosfato en posiciones 1 y 4' (86). Sumihiro, Hase y Rietschel que también trabajaron en el Instituto Max Planck mostraron que el  $\beta(1-6)$  biofosforilado se unió al disacárido de D-GlcN y fue determinado como estructura del lípido A también estaba presente en el lípido A de *E. coli*.

En 1954, Westphal y Lüderitz propusieron componentes del lípido A que representó el principio endotóxico del LPS (82). Ellos razonaron que los polisacáridos dividen llevando la especificidad O-antigénica diferida tan ampliamente en composición y estructura teóricamente que esta región de LPS no era probable que llevara entidades endotóxicas comunes. El lípido A, en ese momento, parecía ser un componente ambiguo. Después, complejando de LPS con proteínas inertes, como el pirógeno (el procedimiento de Goebel) llevó al polisacárido degradado y una proteína artificial, soluble, lípido A complejo (comparable a la proteína conjugada de Morgan) que era endotóxicamente activa.

Otra opinión muy diferente, fue expresada por Chandler A. Stetson quien postuló que la endotoxina no era de hecho en absoluto una toxina (87), sino que los efectos de la endotoxina como fiebre y letalidad podría

reproducirse por el complejos antígeno-anticuerpo. Así, las propiedades endotóxicas del LPS parecían ser basadas en su calidad como un antígeno, en otras palabras, la endotoxicidad era meramente un fenómeno inmunológico.

La hipótesis de que el lípido A era el portador de las propiedades tóxicas se apoyó fuertemente en 1968 cuando los mismos científicos mostraron que el LPS polisacárido-deficiente, derivado de las bacterias Re-mutantes y sólo Kdo y el lípido A, fueron endotóxicamente activos (88). En 1967, los datos similares fueron proporcionados por Kasai y Nowotny (89) después del informe original de Lüderitz y colaboradores en 1966 en las propiedades tóxicas del LPS de las bacterias de Re-mutante (90). El hallazgo de que la región Kdo podría modificarse químicamente fuera de la pérdida de bioactividad dio énfasis a la importancia del lípido A (91). La prueba final para el papel esencial del lípido A en endotoxicidad fue proporcionada por Galanos que demostró que el polisacárido libre completamente del lípido A podría ser soluble en agua (como la sal del trietil-amonio en electrodiálisis), y ese lípido A libre, exhibió cualitativamente en esta forma los pirogénicos fuertes y propiedades del tóxico y cuantitativamente comparable al LPS más activo (92).

El grupo de Tetsuo Shiba, Shoichi Kusumoto (Fig. 7) y sus socios en la Facultad de Ciencias de Universidad de Osaka a Toyonaka, Osaka, Japón que emprendieron la síntesis química total del lípido A. Los acercamientos sintéticos iniciales se basaron en una estructura del lípido A que era incorrecto con respecto al sitio de la atadura de Kdo. Así, los primeros productos sintéticos demostraron ser desilusionantemente de actividad biológica baja. Después de la elucidación de la estructura primaria correcta del lípido A, Kusomoto y Shiba en 1983, reasumieron su trabajo sintético siendo precursores del preparado de tetraacil (preparación 406).

Finalmente, como una culminación de los esfuerzos sintéticos, el 18 de junio de 1984, la primera síntesis química total del lípido A de *E. coli* se completó (93). La estructura del compuesto sintético (preparación 506 o LA-15-PP) correspondió a identificar previamente, el lípido A bacteriano. La identidad estructural del compuesto sintético y el fragmento dominante del lípido A libre bacteriano de *E. coli* fue demostrado por protón la resonancia magnética nuclear.

Finalmente hace sólo 7 años Richard Ulevitch y Peter Tobias en el Instituto de Investigación Scripps y Samuel Wright al Instituto Rockefeller demostraron cómo el LPS es reconocido específicamente por factores de suero y los sitios de ataduras celulares (94-97) llevando a la activación celular, señal de transducción y producción del mediador (los eventos importantes en acción de la endotoxina). También en los 80's se purificaron las primeras proteínas acordaron que para representar mediadores endógenos de acción de la endotoxina, secuenciado, y clonado, con interleusina 1 humana (98), el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  humano (99) siendo estos los prototipos de tales mediadores.

En esta retrospectiva se han cubierto aproximadamente 150 años de investigación de la endotoxina. El progreso descrito de extractos y filtrados bacterianos a las moléculas definidas y estructuras se hizo posible por las grandes mentes de médicos, investigadores y científicos que consagraron su vida experimental e intelectual a la investigación de infección, microbios y toxinas. Estos estudios fueron facilitados grandemente por el avance de metodología -en la clase de endotoxina en muchas disciplinas por ejemplo; farmacología, serología, química y física. Los últimos 150 años de investigación de la endotoxina han sido caracterizados por purificación, aislamiento, fragmentación y disección. El tiempo ha venido a reunir toda la información recogida para entender la importancia del lipopolisacárido.

La investigación futura podría concentrarse en el papel que puede jugar la endotoxina en el mantenimiento de la salud humana. No hay ninguna vida libre de endotoxina, cada humano lleva aproximadamente  $10^{14}$  bacterias que colonizan en la mucosa del tracto digestivo y en la piel. Así, nuestro cuerpo es potencialmente confrontado con gramos de endotoxina, aproximadamente 3-10pg/ml del suero que se encuentra continuamente en la circulación humana. Quizás 2 millones de pacientes se mueren anualmente del shock séptico basado en endotoxinas, pero 6 mil millones de personas ganan con las propiedades de la inmuoestimulación del LPS (100). Por consiguiente, las endotoxinas continuarán fascinando a científicos en numerosas disciplinas y muchas décadas pasarán antes de que la última revisión histórica de investigación de la endotoxina se escriba.

#### **4.2. ESTRUCTURA**

En el apartado anterior hemos presentado el antecedente histórico de las investigaciones hechas sobre el lipopolisacárido (LPS). En este punto nos proponemos mostrar la estructura química que se ha determinado en los estudios realizados acerca del LPS.

Desde hace 30 años se conoce la composición química básica de los lipopolisacárido. El LPS se localiza en la superficie de externa de la membrana externa de las bacterias gram-negativas. Es una molécula anfifílica con tres regiones: una región; interna hidrofóbica, llamada lípido A; un polisacárido central que contiene heptosa y, un polisacárido O-específico que actúa como antígeno serológicamente activo. La estructura mínima requerida de LPS para el crecimiento de *Escherichia coli* y otras bacterias gram-negativas, denominada Re-LPS, consiste en el lípido A y dos unidades

de la octoda 2-ceto-3-desoxioctonato (Kdo). La estructura interna del LPS está formada por Kdo y heptosa.

El lipopolisacárido es un componente estructural de la membrana externa de las bacterias gram-negativas (Fig. 8). Están formados por dos regiones: una región central, común a las formas rugosas y lisas; y otra región específica, construida por las cadenas laterales O-específicas del polisacárido que caracterizan a las formas lisas de estos bacilos. El componente lipídico del LPS, que es la región A, está unido a una estructura de sostén constituida por el polisacárido central.

El polisacárido central está ligado por una parte al lípido A y por la otra, a las cadenas laterales O-específicas. Consiste en una estructura básica de azúcares que tienen como sustituyente de otro azúcar, etanolamina y fosfato. El ácido 2-ceto-3-desoxi-D-mano-octulosónico (Kdo) es el único que aparece invariablemente en esta región mientras que pueden encontrarse un gran número de otros azúcares.

La posición química de las cadenas laterales de las regiones O-específicas varía mucho. Aunque pueden encontrarse un gran número de azúcares, los que aparecen más frecuentemente son manosa, fucosa, rhamnosa y galactosamina(101).

El lípido A, que proporciona la toxicidad al LPS, está constituido por D-glucosamina, fósforo y, como sustituyentes principales, diversos ácidos grasos, entre los cuales se encuentran el láurico, el palmírico, el mirístico y el  $\beta$ -hidroxi-mirístico. Salvo unas cuantas excepciones, el último parece ser un constituyente específico del lípido A (101, 102).

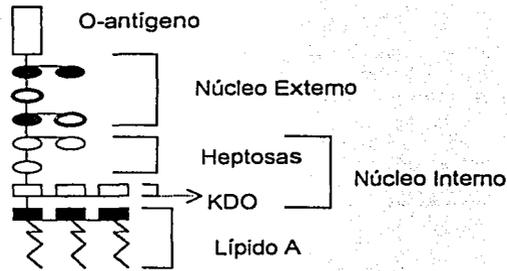


Fig. 8. Estructura del lipopolisacárido.

### 4.3. Biosíntesis

Hemos visto la estructura química del LPS, su localización y cómo se encuentra constituido. Abordaremos ahora la biosíntesis constituido en tres puntos primeramente, momento, del O-polisacárido, luego, del lípido A, y por último, del polisacárido central.

#### 4.3.1 Biosíntesis del O-Polisacárido

La especificidad antigénica de las bacterias y su LPS está determinada por el O-polisacárido. Entre las especies y aún entre cepas varían los constituyentes del polisacárido O-específico, pero los miembros de un serotipo tienen al menos uno de los determinantes O-antigénicos en común con miembros de un serogrupo distinto.

El estudio bioquímico del O-polisacárido ha revelado la existencia de una secuencia de 10 a 100 o más unidades de oligosacáridas repetitivas compuestas por 3 a 4 monosacáridos. Pueden darse cadenas cortas cuando las condiciones del medio son estresantes, como son temperaturas muy altas, bajo pH, bajos niveles de fosfato o magnesio o altos niveles de sales. Los monosacáridos que han sido aislados de distintas bacterias son: pentosas, a-aminopentosa, hexosas, 2-aminohexosas, 3,6-desoxihexosas, 6-desoxiazúcares, entre otros. Las bacterias entéricas que producen O-antígenos con un grupo amino altamente hidrofóbico, como didesoxiazúcares, tienden a ser más patógenos.

#### **4.3.2. Biosíntesis del Lípido A**

La mayoría de las actividades biológicas de los LPS se atribuyen a la región del lípido A, éste ancla al LPS a la membrana celular. La estructura básica el lípido A es común entre bacterias gram-negativas, incluyendo enterobacterias, *neisserias*, *pseudomonas* y otras que presentan propiedades endotoxinas.

Recientemente se descubrieron varias enzimas en *E. coli*, y enzimas similares entre varios gram-negativos, capaces de convertir a los precursores UDP-GlcNAc, R-3-hidroximiristoil-ACP, ATP, CMP-KDO, lauroil-ACP Y miristoil-ACP a Re LPS.

El primer paso en la acilación de la UDP-GlcNAc con R-3-hidroximiristato, catalizado por la proteína codificada en el gen *lpxA* (1). La UDP-GlcNAc se sitúa en el punto de bifurcación en el camino metabólico, ya que también se utiliza para la biosíntesis de peptidoglicano. El R-3-hidroximiristoil-ACP se localiza en otro punto de bifurcación, puede ser

elongado a palmitoil-ACP e incorporado a los glicerofosfolípidos. Se han observado al menos dos genes para la biosíntesis del Re LPS contenidos en un operón en el cromosoma de *E. coli*: *lpxA* y *lpxB*.

El precursor inmediato para la unidad no reductora de lípido A es UDP-2-3-diacilglucosamina, pero una parte está unida pirofosfatasa específica para generar una molécula demasiado inestable llamada lípido X, que es el productor directo del extremo reductor del lípido A. El producto del gen *lpxB* cataliza la formación de disacárido, y después, una cinasa específica incorporada al 4'-monofosfato, generando al lípido IVA, un intermediario que posee algo de bioactividad, por lo que tiene utilidad en la detección de proteínas receptoras de endotoxina en células animales.

Antes de que se complete el lípido A, la enzima codificada por el gen *kdtA* incorpora dos residuos de Kdo diferentes estereoquímicamente. Por último, se incorpora un residuo de laureato y uno de miristato al extremo no-reductor del lípido A.

Hasta ahora se desconoce el mecanismo, por el cual, el LPS se exporta desde su sitio de biosíntesis en la superficie interna de la membrana interna hacia la superficie externa de la membrana externa.

La menor variación en la estructura del lípido A modifica sus señales biológicas. La remoción de todos los ácidos grasos resulta en la pérdida completa de actividad biológica. Además, la ausencia de uno solo de los grupos fosfatos, ya sea en C1 y C4, resulta en una pérdida significativa de toxicidad.

### **4.3.3 Biosíntesis del polisacárido central**

El polisacárido central une al lípido A con el O-polisacárido. Es menos variable que el O-polisacáridos entre géneros y especies. Está compuesto por 5 azúcares: amino azúcar (N-acetilglucosamina), glucosa, galactosa, L-glicero-O-manoheptosa, y octosa 2-ceto-3-desoioctonato (Kdo). El polisacárido central se separa en un área externa y una interna. El área interna (Kdo) contiene heptosa, fosfato y ácido 2-ceto-3-desoioctulosónico, el cual, se une covalentemente al lípido A por uniones cetosídicas ácido-lébilis.

### **4.4. Los lipopolisacáridos y la permeabilidad de la membrana externa bacteriana.**

Tanto los grupos carboxilo del Kdo así como los grupos fosfato en el lípido A y las heptosas provocan que los LPS sean moléculas aniónicas. Por esta característica química que probablemente los cationes calcio y magnesio interactúen con los LPS mediante puentes iónicos. Esto ocasiona que se forme una estructura altamente ordenada. Sin embargo, parte del grupo fosfato, interactúa con los sustituyentes catiónicos, lo que reduce su tendencia a formar aniones.

La membrana externa es una barrera permeable sumamente efectiva contra agentes externos, los LPS son las moléculas clave para el funcionamiento de la membrana externa. Mientras que los canales de porina, que se encuentran en la membrana externa, permiten la difusión de compuestos hidrofílicos pequeños como mono y disacáridos, que las bacterias utilizan como nutrientes, y de igual forma, la difusión de compuestos hidrofóbicos. (104, 105-107)

Los LPS se ubican exclusivamente en la membrana externa en específico en la en la capa externa. Los glicerofosfolípidos exclusivamente en la capa interna. Mientras que la región de glicerofosfolípidos de naturaleza química fluida, la capa de LPS es una estructura sumamente ordenada con baja fluidez. Esta disminución en la fluidez es ocasionada por la interacción de los LPS con los cationes divalentes, lo que provoca que la membrana externa presente una baja afinidad para la difusión de compuestos hidrofóbicos. Y por este motivo, las bacterias gram-negativas sean menos susceptibles a antibióticos hidrofóbicos en comparación a las bacterias gram-positivas.

En los estudios realizados por Nikiado, Kuo y Stocker así como por Schlecht y Westphal, demostraron que las concentraciones inhibitorias mínimas de un gran número de antibióticos hidrofóbicos era de 10 a 1000 veces más elevadas en los tipos silvestres que *E.coli* y *Salmonella typhimurium* en comparación con mutantes de la membrana externa o bacterias gram-positivas. (104, 105 y 109-110) (Tabla I).

<b>Tabla I. Concentraciones inhibitorias mínimas de varios antibióticos hidrofóbicos y antibióticos hidrofílicos. ( <math>\mu\text{g} / \text{ml}</math> )</b>				
<b>Antibiótico</b>	<i>Escherichia coli</i> (silvestre)	<i>Escherichia coli</i> (mutante lpx A)	<i>Escherichia coli</i> (en presencia del nonapéptido de polimixina B)	<i>Micricoccus luteus.</i> (gram-positiva)
<b>Hidrofóbico</b>				
Rifampicina	10	0.03	0.1	0.03
Acido fusídico	300	1	10	0.25
Eritromicina	100	0.25	10	0.25
Novobiocina	30	4	3	0.125
Clindamicina	300	2	10	0.25
<b>Hidrofílicos</b>				
Vancomicina	300	8	8	0.5
Bacitracina	1000	2	2	1

Como se mencionó en líneas anteriores los LPS se asocian de cationes divalentes y es por este motivo que la membrana externa de las bacterias gram-negativas son susceptibles a la acción de agentes fuertemente catiónicos entre los que se incluyen antibióticos del grupo de polimixina, detergentes catiónicos, péptidos catiónicos y péptidos antibacteriales, presentes en neutrófilos y fagosomas de macrófagos (111 y 112). Polimixina se acopla con alta afinidad a los grupos aniónicos de LPS y lípido A lo que conlleva a la reducción de la estructura supramolecular altamente organizada de la capa de LPS, lo que desorganiza a la membrana externa de las bacterias gram-negativas (111). Estas acciones no son letales pero hacen permeable a la membrana externa hasta llegar al citoplasma. Por otra parte, agentes quelantes como el EDTA, que al calcio y magnesio, ocasiona efectos similares (104, 111).

Mutantes resistentes a polimixina han aportado una valiosa información para comprender el papel del LPS. El mutante *pmrA* de *S. typhimurium* (104, 109, 111, 113) tolera de 20 a 100 veces más altas concentraciones de polimixina B y se asocia 4 veces menos que las cepas silvestres. La membrana externa y LPS aislados de estos mutantes muestran una baja asociación a polimixina B en relación con las cepas silvestres. Los mutantes *pmrA* son resistentes a los efectos del EDTA, polilisinas, protamina, altas concentraciones de Tris, sodio y magnesio, a la proteína incrementadora de la permeabilidad así como a azuricidina pero no a defensina, taquiplesinas, cecropina, octapeptina y detergentes catiónicos (112, 114, 115). Por otra parte, los mutantes *pmrA* contienen de cuatro a seis veces más 4-aminoarabinosa y etanolamina que el LPS de las cepas silvestres (106). Estos compuestos amino se esterifican a los grupos fosfato de los LPS y provocan que las mutantes sean menos ácidas. El éster de

fosfato de la posición 4' es substituido por 4-aminoarabinosa en las mutantes *pmrA*.

En conclusión, los LPS participan de manera preponderante en conferir a la membrana externa impermeabilidad a agentes hidrofóbicos inclusive de agentes eficientes contra bacterias gram-positivas, si se desorganizan a los LPS las bacterias gram-negativas provoca que las bacterias sean susceptibles a los fármacos hidrofóbicos. Es por este motivo que se realiza un gran número de investigaciones encaminadas a inhibir la síntesis o desorganizar a los LPS y en la inhibición de la síntesis del lípido A (117).

#### ***4.5 Heterogenicidad de los LPS***

En fechas recientes se han realizado un sin número de estudios con el propósito de comprender la virulencia bacteriana. Estas investigaciones se han abocado a comprender la biología de los LPS, inclusive con mayor hincapié que con el microorganismo en sí. La función de los LPS en la arquitectura y función de la membrana externa y en la interacción de los patógenos con el huésped ha llevado a que se estudien los diferentes componentes de los LPS, en algunos trabajos se ha demostrado que la pérdida de la estructura O-antígeno resulta en una severa disminución de la virulencia y susceptibilidad a las acciones del complemento.

Algunos patógenos del tracto respiratorio presentan moléculas de LPS que carecen de las extensiones del O-antígeno lo que les confiere susceptibilidad a antibióticos y péptidos catiónicos bactericidas. El papel de los LPS durante cada estado de la infección no ha sido del todo definido pero, por ejemplo, la estructura del LPS de *Haemophilus influenzae*, ha

mostrado que es importante en cada etapa de la patogénesis de infecciones sistémicas (118). Mutantes de esta bacteria ha mostrado que los LPS participan en la colonización, adherencia e invasión (119 y 220), evasión del huésped (121) e inducción de las respuestas del huésped (122). La reducción progresiva en el tamaño, talla y complejidad del LPS ocasiona una disminución en sus efectos tóxicos. (122, 123)

La variación de los LPS es resultado del proceso biosintético que repercute en la compleja estructura terciaria de la molécula. La biosíntesis del LPS involucra numerosas proteínas funcionales que se requieren para activar y sintetizar lípidos y azúcares con una organización específica, adicionalmente los LPS presentan gran heterogeneidad como la presencia de grupos fosfato, fosfoetanolamina, pirofosfoetanolamina y O-acetil o fosfocolina. La heterogeneidad en la estructura final de los LPS puede ser ocasionada por diversos estímulos que a continuación se enlistan:

- Microheterogeneidad ocasionada por el proceso biosintético de los azúcares posibles, no estequiométricos en ausencia de función verficadora.
- Microheterogeneidad por la competencia entre las diferentes enzimas que participan en la síntesis de los LPS y que se altera por las necesidades metabólicas de las bacterias.
- Microheterogenicidad como resultado de la expresión génica en respuesta a los estímulos de medio ambiente, cambios en el crecimiento, condiciones específicas y señales del medio ambiente.
- Microheterogenicidad por mecanismos genéticos específicos que promueven antigenicidad o variación de fase a través del gene de

contingencia. La variación de fase se define como de alta frecuencia (1 en 100 a 1000 bacterias/generación) lo que conduce a una pérdida o ganancia de epítopes específicos. La importancia funcional de este evento es que ocurre rápida y azarosamente con el tiempo.

El desarrollo de los anticuerpos monoclonales ha sido de gran utilidad para la detección de variaciones en la estructura de los LPS y ha sido usada para caracterizar la variabilidad y reacción cruzada de la estructura de los LPS de diferentes organismos. Aunque la naturaleza química de estos mecanismos no ha sido comprendida del todo (118, 125).

#### ***4.6 Liberación de endotoxinas inducida por antibióticos***

Cuando se utilizan antibióticos para matar a la bacteria se ha mostrado que la liberación de la endotoxina por la bacteria se intensifica, normalmente las bacterias que son sumamente sensibles a los antibióticos y rápidamente destruidas por la acción del antibiótico con una mínima liberación de endotoxina. Sin embargo, estos organismos más patogénicos cuando el huésped está inmuno-comprometido, o bien cuando la terapia con antibióticos se retarda o es inadecuada. La terapia retardada o inadecuada permite un incremento en la masa de bacteriana. Cuando la biomasa bacteriana o la concentración de LPS alcanza los límites potencialmente nocivos, la cantidad no puede ser rápidamente disminuida por las defensas naturales del huésped, por lo que, la elección del antibiótico así como la concentración, periodo y duración del tratamiento son cruciales en el control de la enfermedad.

A pesar de los resultados optimistas obtenidos a partir de estudios con animales, las estrategias terapéuticas designadas con el objetivo de eliminar

los niveles tóxicos de LPS provenientes de bacterias gram-negativas infecciosas de la circulación hasta la fecha han fallado (126). Estas estrategias poco exitosas han llevado a cuestionarse el papel de los antibióticos liberadores de LPS sobre la tasa de supervivencia de los pacientes.

Aunado a estos efectos existen casos que no muestran correlación entre la presencia de bacterias gram-negativas y los niveles de LPS/citocinas detectados en el plasma de los pacientes. En teoría al menos, dos factores contribuyen en la falla del efecto sobre la liberación de LPS y citocinas por parte del huésped. El primer factor está asociado con la interpretación de resultados que involucra la falta de consenso sobre la predicción del daño o de los niveles de LPS/citocinas o con los resultados en el paciente. El segundo factor influye más directamente en el deficiente resultado que obtiene el paciente y la falta de consideración prospectiva para el potencial liberador de endotoxinas de antibióticos específicos. En apoyo a estos conceptos la eficacia de los antibióticos liberadores de endotoxinas de acuerdo a los componentes principales del proceso infeccioso entre los que se encuentran el organismo infectante, la elección del antibiótico específico y la sensibilidad a endotoxinas del huésped.

Resultados de datos experimentales sugieren que las cantidades únicas de las especies bacterianas pueden diferencialmente regular los niveles detectables de endotoxinas encontrados en el plasma de los pacientes. Tres factores relacionados con la bacteria participan entre los que se cuentan la capacidad del microorganismo en liberar endotoxinas, los tipos o propiedades fisicoquímicas de las endotoxinas liberadas y la concentración de endotoxina producida y liberada.

Las bacterias gram-negativas difieren cuantitativa y cualitativamente en la producción y liberación espontánea de endotoxinas. De hecho, algunas bacterias no son liberadoras de LPS y estos organismos son menos patogénicos que los liberadores de endotoxinas (127). Sin embargo, estos organismos serán sumamente patógenos en pacientes inmunocomprometidos. Sería importante determinar el potencial relativo de bacterias gram-negativas liberadoras de endotoxinas aisladas de pacientes con las que no muestran niveles detectables de endotoxina/citosina y realizar estudios comparativos. Cuando las bacterias liberan LPS (serotipo inmunotipo, suave, rugoso) las propiedades fisicoquímicas de la endotoxina liberada así como la cantidad producida, pueden influenciar la habilidad e modular las respuestas anti y pro-inflamatorias importantes en la respuesta natural de huésped. La cantidad de LPS espontáneamente liberado puede variar entre las especies bacterianas y también diferir en la cantidad relativa de endotoxina producida. Por ejemplo, *Escherichia coli* liberadora de LPS produce y libera de forma espontánea más LPS que *Pseudomonas aeruginosa* y *Klebsiella pneumoniae* (128). La síntesis y liberación del factor de necrosis tumoral (TNF) por parte de los macrófagos se debe en parte a las diferentes cantidades de endotoxina liberada por cada organismo (129).

Hay un gran número de factores que afectan la liberación de endotoxinas como: la síntesis de endotoxinas por las bacterias, así como la virulencia bacteriana (infectividad/invasividad); sensibilidad de suero (niveles de complemento, anticuerpos específicos); sensibilidad a diferentes anticuerpos; disponibilidad de antibióticos y el tamaño del inóculo. La mayoría de los antibióticos dirigidos contra bacterias gram-negativas son poco efectivos en penetrar y acumularse en el citoplasma de células infectadas como en los macrófagos infectados con *Salmonella typhimurium* que se puede localizar intracelularmente. Por otra parte, inóculos superiores a  $1 \times 10^8$  unidades formadoras de colonias puede reducir las acciones

filamentosa durante esta modificación morfológica las bacterias continúan produciendo endotoxinas y concluye con la lisis bacteriana.

Los carbapenemos (imipenem y meropenem) se asocian a PBP-2 lo que provoca que los bacilos adquieran una forma redonda. Las células ovales denominadas también esferoplastos no se dividen ni continúan sintetizando endotoxina.

Las variaciones morfológicas y la liberación de LPS están asociada con cambios en la concentración del antibiótico específicamente a niveles de antibiótico sub-inhbitorios y a estas dosis se liberan grandes concentraciones de endotoxina (131-139).

Se ha establecido así mismo que la dosis de antibiótico utilizada tiene efectos sobre la liberación de endotoxinas. Por ejemplo, los efectos de meropenem varían de acuerdo a la especie bacteriana en específico cuando *E.coli* se expone a este antibiótico no provoca estructuras filamentosas a diferentes dosis, sin embargo a estas dosis a *P.aeruginosa* si forma estas estructuras. Por otra parte, el tratamiento con meropenem en *E.coli* presenta alta afinidad tanto por PBP-2 como por PBP-3 y en *P.aeruginosa* por PBP-3.

Las variaciones morfológicas y la liberación de LPS esta asociada con cambios en la concentración de antibióticos especialmente a la concentración subinhibitoria en donde se liberan grandes concentraciones de endotoxina.

Por otra parte, es importante tener en consideración que dosis elevadas de antibiótico contribuyen a disminuir la masa bacteriana. Sin embargo, a estas dosis se libera endotoxina cuya depuración depende de la susceptibilidad del paciente.

Otros parámetros importantes son el número de tratamientos con antibiótico (sencillo o múltiple), la ruta de administración (local o sistémico), el método administración (bolo contra infusión continua), tiempo de tratamiento (temprano o intervención tardía) y la longitud y los intervalos de duración (+6, +8 o +24 hr.) entre tratamiento con antibióticos.

La administración local puede resultar en la liberación local de LPS/citocinas debido a la compartimentalización. La administración sistémica de drogas puede resultar en la liberación de altas concentraciones de LPS/citocinas. La infusión continua de antibióticos conduce a una más rápida reducción de la masa bacteriana. La acción temprana de los antibióticos manifiesta un efecto similar al observado en la infusión continua. La longitud y duración del tratamiento con antibióticos no solo afecta la masa celular sino también apoya la liberación de endotoxinas, lo cual a su vez, promueve la producción de altos niveles de citocinas.

El número de tratamiento con antibióticos no solo afecta la reducción de la masa bacteriana sino también regula la detección de citocinas y LPS en el plasma. La farmacocinética es una herramienta muy valiosa para decidir la frecuencia y dosis del tratamiento con antibióticos, que puede diferir dramáticamente entre las especies animales con respecto a un antibiótico en específico. Sin embargo, hasta el momento no existen estudios del amplio número de antibióticos usados en diferentes especies. Existen reportes de tratamientos sencillos y múltiples que muestran que los tratamientos múltiples protegen con mejor a los especímenes estudiados que el tratamiento sencillo.

Por otra parte, diferentes especies animales varía ampliamente en la sensibilidad a endotoxinas y en la producción de citocinas en respuesta a LPS. Los humanos son la especie más sensible a LPS mientras que los

roedores son más resistentes a LPS. La cronología de una variedad de especies animales, listados en aumento de sensibilidad a LPS es la siguiente: humanos, caballos, conejos, perros, cerdos, hamsters, monos, ratón y rata.

Las ratas son los organismos más resistentes a los efectos letales de los LPS y así mismo producen menos TNF en respuesta a LPS (140). Esta variación podría deberse a la afinidad de los antibióticos que son los subtipos de PBP por ejemplo, las cefalosporinas al asociarse a PBP-3 libera grandes cantidades de endotoxinas que cuando se trata con carbapenems que se una a PBP-2.

En resumen, la elección de antibióticos puede influir en los niveles detectables de endotoxinas y citocinas lo que influye en los resultados obtenidos por el paciente.

#### ***4.7. Liberación de Lipopolisacáridos mediada por el complemento***

El complemento es un sistema que comprende una de glicoproteínas presente en el torrente sanguíneo como precursores inactivos. La activación del complemento involucra una casacada secuencial de reacciones enzimáticas (principalmente proteolíticas) que producen formas activas de las proteínas del complemento. La iniciación de la cascada del complemento requiere la presencia de una superficie activadora que conduce a la formación de complejos enzimáticos estables denominada convertasas C3 y C5. La deposición estable de complejos enzimáticos multicomponentes en la superficie de las bacterias puede desencadenar el ensamblaje de del complejo de ataque a la membrana (MAC) compuesto de componentes

terminales del complemento C5b hasta C9 (141, 142). MAC es capaz de matar algunas bacterias, el mecanismo que emplea es la formación de poros en la membrana y efectos similares a los ocasionados por detergentes (143 y 144). Las superficies activadas requieren de cubrir previamente la superficie con anticuerpos a fin de activar el complemento o directamente fijar o unir proteínas del complemento a la superficie, como los lipopolisacáridos.

La activación del complemento se efectúa a través de dos mecanismos distintos. (Fig. 8). El mecanismo clásico utiliza proteínas del complemento: complejo C1 (C1q<sub>r</sub>2S<sub>2</sub>), C2, C3 y C4. El mecanismo clásico dependiente de anticuerpos requiere de C1q subunidad de C1 que reconoce y asocia múltiples regiones Fc de antígenos unidos a moléculas IgG o a unión sencilla de antígenos con moléculas IgM pentaméricas. C1q también se asocia directamente a bacterias gram-negativas en la ausencia de anticuerpos, particularmente a bacterias que expresan LPS. La asociación a C1q resulta en la activación de dos complejos C1 que son serin-proteasas, C1r y C1s. Estas proteasas rompen a C4 y C2. Un fragmento de C4, designado C4b, se une covalentemente para a la superficie activante y C2a, un producto de C2 que es también una serin-proteasa, se asocia a C4b. El complejo macromolecular C4b2a es una convertasa C3 saturable. La ruptura catalítica de moléculas de C3 y su conversión en C3b se asocia a la superficie. Formando el complejo C4b2a3b todos estos eventos activan el mecanismo de activación del complemento clásico.

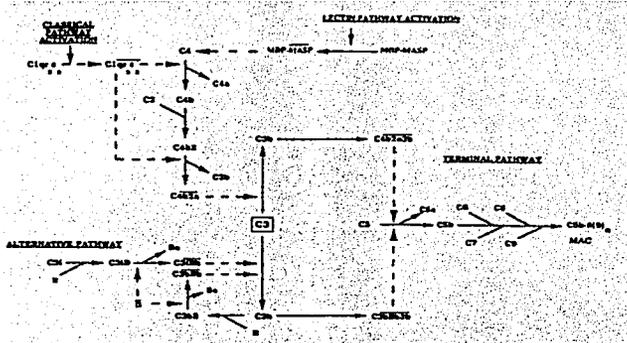


Fig. 8 Pasos en la activación clásica y alternativa de la cascada del complemento.

El mecanismo alternativo de la activación del complemento (Fig. 9) involucra la interacción de C3 con el factor B, factor D y properdina. La proteína C3 es la más abundante en la sangre y de forma espontánea se recambia por cambios conformacionales mediante una unión tioléster entre residuos de cisteína y glutamina, esta unión es muy lábil que oscila en el rango de microsegundos y es sujeta a ataque nucleofílico para formar C3bi. El factor B se asocia a esta proteína y posteriormente se rompe el factor B por el factor D. Sin embargo, este complejo es susceptible a ser inactivado por los factores I y H. El factor H acelera el ensamblaje de C3Bb y actúa como cofactor para el Factor I (serin-proteasa) que rompe a C3b y de esta forma inactiva al complemento. En presencia de moléculas como los LPS, C3Bb forma uniones amida, éster con grupos amino o hidroxilo de las cadenas laterales de la superficie activadora.

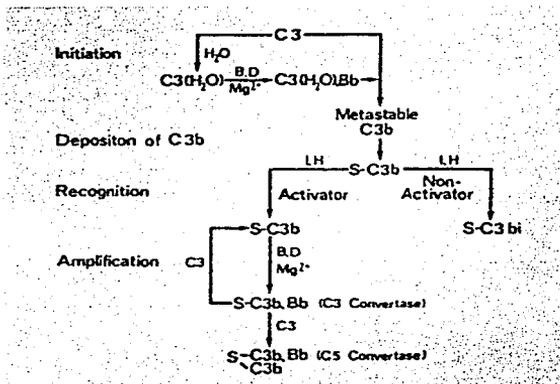


Fig. 9 Iniciación de la vía del complemento alternativa.

La unión covalente de C3b a la superficie favorece la interacción de C3b con el factor B y properdina (una proteína estabilizadora de C3bB) y prohíbe la asociación del factor H. La subsecuente ruptura de C3b-unido al factor B por el factor D produce el complejo C3bBb, a una convertasa estable designada C3 y produce millones de moléculas C3b asociadas a las membranas (141, 142 y 145). La activación del mecanismo alternativo por anticuerpos involucra la asociación de C3b a carbohidratos de la porción Fab de ciertas subclases de IgG.

En esta etapa la cascada del complemento, los mecanismos clásicos y alternativos a partir de C4b2a3b y C3bBbC3b poseen actividad convertasa de C5. Las moléculas unidas a la superficie C3b y C4b actúan como ligandos para C5, la hidrólisis de C5 en C5b sirve de iniciador del ensamblaje de MAC (146).

La habilidad de C3b de unirse covalentemente a bacterias gram-negativas es un paso crucial para la activación del complemento en los que C3b actúa sobre la bacteria matándola por MAC o células fagocíticas.

Los hepatocitos son el aporte principal de la mayoría de las proteínas séricas del complemento (147). Otros tipos celulares también sintetizan otras proteínas del complemento como células epiteliales, fibroblastos, monocitos y macrófagos que sintetizan C1q (Fig. 10). Los monocitos producen C1r, C1s, properdina y C7. Y los adipocitos sintetizan el factor D.

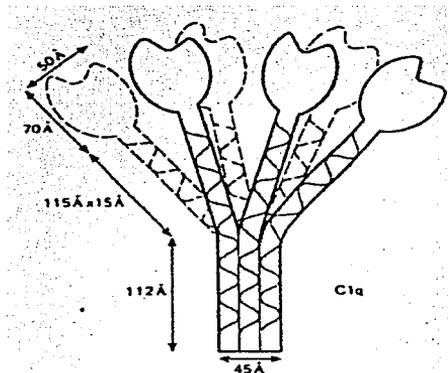


Fig. 10 Estructura de C1q. La macromolécula de 18 cadenas polipeptídicas (6 cadenas-A, 6 cadenas-B y 6 cadenas-C). Cada cadena nuclear es atada a una triple hélice afín a la colágena dominante.

La activación del complemento facilita la extravasación de fagocitos mononucleares en las áreas de infección, destruye microorganismos invasivos por opsonización o por daño directo a la membrana mediado por MAC y despeja de la sangre antígenos como bacterias o fragmentos

bacterianos por la unión a C3b al hígado o bazo por la ingestión de macrófagos hepáticos y del bazo. (Tabla II)

<b>Tabla II. Consecuencias biológicas de la activación del complemento</b>	
<b>Actividad Biológica</b>	<b>Efecto mediado por proteínas del complemento.</b>
Degranulación de mastocitos, basófilos, eosinófilos.	C3a, C4a, C5a.
Extravasación de neutrófilos y quimiotaxis.	C5a.
Agregación plaquetaria	C3a, C5a
Opsonización de partículas cubiertas	C3b, C4b, iC3b, C1q, MBP
Solubilización y limpiar LPS/complejos inmunes.	C3b, iC3b
Activación de fagocitos	C1q, C3b, MAC
Liberación de LPS	MAC, C5b8
Exportación de proteínas del huésped que carecen de secuencias señal	MAC
Bacteriolisis y neutralización de virus	MAC

#### **4.7.1 Interacción de proteínas del complemento con LPS:**

##### **4.7.1.1 C1**

Se ha demostrado que C1 se asocia a lípido A y LPS de manera independiente de anticuerpos (148, 149). Tenner (150) demostró que niveles bajos de C1q se une a cepas lisas de *E.coli* (Fig. 11) pero la asociación no activa el mecanismo clásico del complemento. La unión de C1q a LPS se efectúa por la unión al inhibidor C1. Se ha observado que las cepas rugosas de *E.coli* promueven la activación de la proteína C1 mediante el mecanismo

del complemento clásico y lo conduce a la formación de MAC y la muerte bacteriana. (151, 152).



Fig. 11 Micrografía electrónica de *E. Coli* k12 tratado con (A) calor activado por camino alternativo de proteínas; (B, C) camino alternativo de proteínas purificadas; y (D) camino alternativo de proteínas más lisozima. Note la prominente vesícula en las células tratadas por el complemento.

#### 4.7.1.2 C3

Pillemer y colaboradores establecieron que las bacterias gram-negativas presentan efecto bactericida en ausencia de anticuerpos (153). Y posteriormente, Schreiber (154) demostró que la proteína C3 del mecanismo del complemento alternativo induce la muerte de bacterias *E. coli* K12. La proteína C3b se une covalentemente a la membrana mediante uniones amida o éster. Lo que ocasiona en la membrana sea un eficiente activador de la vía del complemento alternativo no ha sido esclarecido con certeza pero

los resultados sugieren que las superficies polianiónicas inhiben la interacción de C3b con los componentes regulatorios del factor H (155). Y por lo general, las bacterias patogénicas poseen LPS modificados covalentemente o cápsulas que los convierte en moléculas deficientes en activar la vía alternativa.

#### **4.7.1.3 MAC**

Como resultado de la asociación covalente de los mecanismos clásico o alternativo la convertasa C5 sobre la superficie bacteriana. Se escinde y C5b se asocia con C3b de manera no covalente. La asociación a la superficie puede inducir un cambio conformacional en la molécula C5b, mostrando un dominio de asociación hidrofóbica para dos proteínas fuertemente relacionadas la C6 y C7. El complejo C5b-7 se disocia de la convertasa C5 y sobreviene una transición de hidrofílica a anfifílica, permitiendo que el complejo se integre en la membrana externa de la bacteria.

Después de la asociación C8, el complejo C5b-8 sirve como un vínculo de asociación para C9. El MAC contiene de 1 a 18 moléculas de C9 insertadas en la bicapa lipídica mediante regiones del carboxilo termina hidrofóbicas de las proteínas. Cuando más de seis moléculas C9 se encuentran en MA, lesiones características en forma de anillo se forman en la membrana bacteriana, mientras que la presencia de pocas moléculas C9 se depositan en agregados sobre las membranas (141, 142, 146). Sin embargo, el daño en la membrana puede ocurrir en ausencia de la formación de cilindros poliméricos de C9 (156). Aunque poli-C9 son depositados en la membrana externa de bacterias gram-negativas, para la muerte de bacterias se cree que se requiere la disipación de potencial de membrana de la membrana interna (146). El mecanismo preciso de la muerte bacteriana

mediada por MAC no se comprende aún con extensión pero se ha mostrado que la formación de poli-C9 permite el acceso al espacio periplásmico de compuestos de bajo peso molecular como [<sup>3</sup>H] prolina. Tomlison (157) demostró que la transferencia de MAC en la superficie de *Salmonella minnesota* o *E.coli* no resultan en una disminución de la viabilidad, mientras que la exposición de estas bacterias a suero libre de lisozima mata al 99% de las bacterias. Estudios recientes sugieren que la deposición de MAC en células huésped homólogas puede provocar una transitoria liberación de citocinas y factores de crecimiento (158). Estos datos sugieren que los eventos de señalización intracelular pueden ocurrir durante la polimerización de C9 en la bacteria y las membranas del huésped contribuyen en la muerte celular.

Otros hallazgos muestran que los elementos del complemento sobre la muerte bacteriana provienen de los estudios de determinantes de virulencia expresado en bacterias gram-negativas resistentes a suero. Las enterobacterias resistentes al suero expresan moléculas de LPS ricas en O-antígenos resistentes ocasionan que MAC se coloque en sitios distales a la membrana externa ocasionando su desprendimiento (159).

Por otra parte, Rck es una proteína de 17kDa, resistente al complemento, que se encuentra en la membrana externa y codificada en un plásmido de *Salmonella typhimurium*. La transformación de plásmidos que contiene el gene *rck* en cepas lisas o rugosas de *E. coli* le confiere resistencia al complemento (160).

#### **4.7.2. Requerimientos estructurales de los LPS para la activación del complemento**

Vukajlovich (161) ha estudiado ampliamente la especificidad de la activación del mecanismo clásico independiente de anticuerpo por LPA. La activación del mecanismo clásico del complemento por LPS de *Salmonella minnesota* fue estudiada en suero humano depletado del factor D. Adicionalmente, para asegurar que la activación del mecanismo clásico no es mediada por complejos inmunes, Vukajlovich absorbe del suero el factor D con eritrocitos de conejo formalizados, este tratamiento remueve anticuerpos del suero reactivos contra el LPS. Solamente el lípido A y el LPS quimiotipo Re son capaces de activar el mecanismo clásico independiente de anticuerpo. La adición de un solo residuo de L-glicero-D-manoheptosa es suficiente para inhibir la activación del mecanismo clásico. En contraste la activación del mecanismo clásico por LPS quimiotipo Rd y LPS con núcleos polisacáridos extensos y O-antígenos fueron importantes activadores del mecanismo alternativo (162). La presencia de polisacáridos O-antigénicos facilita la activación del mecanismo alternativo mediante la restricción de la interacción LPS- C3 con el factor H e I (163).

Otros resultados muestran que la conformación de LPS purificados afecta la activación del complemento. Galanos y Lüderitz (164) compararon la anticomplementaridad de preparaciones de LPS suave que en solución acuosa forman agregados de alto peso molecular contra formas más solubles en trietanolamina. Usando el ensayo hemolítico de eritrocitos de borrego cubiertos de anticuerpo encontraron que los agregados de LPS de alto peso molecular poseen la mayor actividad anticomplementaria. Wilson y Morrison (165) utilizando la extracción fenol-agua obtuvieron preparaciones de LPS de *Serratia marcescens* de alto peso molecular (coeficientes de sedimentación = 22S - 89S) y la preparación respectiva solubilizada en trietanolamina

(coeficientes de sedimentación = 3S-7S) con eritrocitos de borrego (activa el mecanismo clásico) o eritrocitos de conejo (activación del mecanismo alternativo) para demostrar que la activación del mecanismo alternativo fue marcadamente menos dependiente en el estado de agregación física del LPS. Entonces el estado físico del LPS en solución influye de manera diferencial en la activación del mecanismo clásico que del alternativo. Seguida de la deposición de las proteínas del complemento en las membranas de las bacterias gram-negativas, se liberan formas micelares de alto peso molecular de LPS (166). La capacidad de liberar LPS y rápidamente asociarse a proteínas del suero puede regular la respuesta inflamatoria.

#### **4.7.3. El papel del complemento en la liberación del LPS**

Estudios de microscopía electrónica y bioquímicos han revelado que durante el crecimiento en medio enriquecidos las bacterias entéricas liberan LPS, fosfolípidos y proteínas membranales en forma de vesículas al medio. Sin embargo, la liberación de LPS puede marcadamente incrementarse cuando la bacteria es incubada en presencia de suero humano. Cuando *E. coli* en la que se ha marcado radiactivamente el LPS con [<sup>3</sup>H]-galactosa es expuesta a suero humano la bacteria muere rápidamente y la fracción que posee el [3H] LPS representa el 30% del LPS total liberado al suero (167).

Ambos mecanismos del complemento clásico y alternativo contribuyen a la muerte bacteriana y a la liberación de LPS.

También la muerte o liberación de LPS no se detecta cuando *E. coli* se incuba en presencia de suero humano deficiente en C7. Por otra parte, para la liberación de LPS se requiere que bacteria se encuentre en la mitad de la

fase de crecimiento logarítmico para que se efectúe la máxima liberación de LPS, así como el tratamiento con el quelante EDTA.

En otros ensayos se encuentra que al mezclar LPS de *E. coli* 0111:B4 con suero de rata se forma un precipitado entre las proteínas del suero y el LPS. Se encontró que los niveles de LPS declinaban con el tiempo, cuando los precipitados se analizaron en geles PAGE-SDS y las bandas fueron analizadas se encontró a la albúmina, C3b, iC3b y IgM y IgG comprendían el 90% de las proteínas del suero unidas a LPS. Así mismo, otras proteínas minoritarias como fibronectina, complejo C1, C2, C4, C5, C6, C8, factores H y B, transferina, properdina, proteínas de asociación a manosa y lipoproteínas de alta densidad (168, 169, 170). Posiblemente las proteínas del suero previenen de la agregación de LPS libres de proteína y de micelas de alto peso molecular que tienen la capacidad de activar cascadas biológicas.

Por otra parte, se sabe que existe una relación entre el estatus inmunitario del paciente con los efectos del LPS. Por ejemplo, el riesgo de recurrencia de meningitis meningococcal y aproximadamente 5000 veces mayor con deficiencia en componentes del complemento que en pacientes inmunocompetentes. Paradójicamente tasa de mortandad en pacientes con meningitis es menos en pacientes con deficiencia en el complemento (171). Platonov (172) a realizado un sin número de estudios comparativos entre pacientes inmunocompetentes con los que presentan deficiencias en el complemento, no encontró diferencias en el número total de linfocitos, en CD4+, CD8+, células T, células B o células NK. Así mismo, la concentración de C4 y de complejos inmunes fue similar. Sin embargo, en los pacientes con deficiencias en el complemento mostraron una significativa reducción e IgM, IgG y de IgA de igual forma una reducción en el número de neutrófilos. Estas investigaciones sugieren que la capacidad del complemento en mediar la

liberación del LPS puede ser un importante determinante en arrollar la sepsis y el shock asociado con la meningitis.

#### ***4.7.4. El papel del complemento en la depuración del LPS***

La inyección de antígenos en una variedad de especies ha sido utilizada para estudiar el papel de complemento en la depuración de antígenos. La inyección del LPS ha sido una estrategia ampliamente utilizada en determinar el papel del complemento en la remoción de LPS, estos estudios han mostrado que los LPS disminuyen rápidamente y se localizan en hepatocitos, células Kupper y macrófagos. La inyección del LPS también se ha utilizado en estudiar el papel del complemento en promover la disminución de estas endotoxinas.

En diversos estudios se ha mostrado que la proteína C3 (173, 174) es importante aunque no existe una clara correlación entre la letalidad y el consumo de C3. Por otra parte, participación de C3 no es suficiente para inducir letalidad en el ratón.

Por otra parte, ratones deficientes en C5 no desarrollaron necrosis hemorrágica en la piel cuando se les inyecta subcutáneamente TNF y LPS. La administración de plasma de ratón, pero no el inactivado por calor (56°C por 30 min) restaura la capacidad del TNF y del LPS en ocasionar hemorragia. Ratones deficientes congénitamente a C5 son protegidos de desarrollar hipotensión y necrosis intestinal cuando son tratados con bajas dosis de TNF y LPS (174, 175).

En contraste a los ratones, los conejos deficientes en C6 son más susceptibles a la letalidad cuando se inyecta intravenosamente LPS de *E.coli*.

En estudios realizados en perros se encontró que al depletar a la proteína C3 y tratar a estos animales con LPS mostraron una pronunciada endotoxemia, hipotensión, síndrome de filtración vascular y daño hepático y pulmonar que los animales normales (176).

En los estudios clínicos realizado por McCabe no se encontraron diferencias significativas entre los niveles en el suero de pacientes control contra los pacientes con bacteria gram-negativa (177). En humanos el consumo de C3 es un pronóstico que indicativo de shock y de resultados fatales.

Estudios recientes en los que se utiliza el ensayo de microscopia confocal o de inmunofluorescencia (178) a fin de identificar la localización de bacterias o del LPS después de inyectar ratas con la bacteria *E.coli* O111 o con LPS purificado de *E.coli* O111:B4, encontraron que se presentaban en diferentes sitios localización, las bacterias se localizaban en células Kupffer y hepatocitos mientras que los LPS en macrófagos.

Posteriormente Freudenberg, (144) utilizando *Salmonella* viva y biotilnada, mostró que aproximadamente 15% del LPS bacterial se liberaba después de incubarlo con suero humano. Una fracción de LPS liberado se encontraba asociada a la membrana externa de la bacteria y esta fracción así misma no se encontraba asociada a lipoproteínas. Estos hallazgos sugieren que LPS purificados con el propósito de conocer como los depura el organismo no reproduce las propiedades biológicas de los LPS liberados por la bacteria *in vivo*.

Un gran número de investigaciones muestra que el tratamiento con suero de *E.coli* lisa y con compuestos que inhiben la biosíntesis del LPS, muestran que la bacteria es más susceptible a los componentes del complemento y los neutrófilos captan un mayor número de bacterias después de inyectarla en ratones (179 y 180).

Algunos investigadores (181) muestran que los monocitos no internalizan los LPS de *E. Coli* O111:B4 y que el tratamiento con anti-CR1 no altera la captura de LPS por parte de los monocitos. Sin embargo, la captura de LPS disminuye cuando se utilizan anticuerpos anti-Antígeno-O, estos resultados sugieren que el anticuerpo bloquea la interacción del LPS con las proteínas del suero que facilitan la asociación a las membranas de los monocitos. La propiedad que tienen los anticuerpos anti-Antígeno-O de bloquear la interacción del LPS con el monocito se reduce cuando se lisa a los eritrocitos lo que sugiere que los eritrocitos son el recurso principal de receptores de asociación a C3b. La capacidad de los eritrocitos para orientar a los LPS con los macrófagos en el hígado y el bazo es un determinante crítico en regular la activación de monocitos y la concomitante producción de citocinas inflamatorias.

#### ***4.7.5. El papel del complemento en la opsonización y activación de fagocitos***

La fagocitosis de bacterias gram-negativas es ampliamente favorecida cuando las bacterias son cubiertas, opsonizadas, con inmunoglobulinas y proteínas del complemento. La captura de la bacteria es mediada por opsoninas con receptores específicos de fagocitos para la porción Fc de inmunoglobulinas y para proteínas de asociación a membrana C1a, C4b, C3b y productos de degradación de C3b la proteína iC3b y C3d. Estudios en

modelos animal en donde se disminuye la funcionalidad del complemento así como en humanos con deficiencias en el complemento han arrojado resultados muy importantes que muestran que el complemento es de suma importancia en la ingestión de bacterias por las células fagocíticas (181). La proteína C1q se asocia al LPS de bacterias gram-negativas y de esta manera se favorece la ingestión bacteriana y la activación del estrés oxidativo (182 y 183).

#### ***4.7.6. Efecto de los lipopolisacáridos en la producción del complemento***

Los efectos bactericidas del complemento y el potencial del complemento en la liberación de LPS a la circulación, han sido de gran interés desde hace algunos años. La interacción complemento-LPS ocasiona la retroalimentación para la síntesis de proteínas del complemento y este efecto es mediado de forma principal por citocinas inducidas por LPS.

LPS es un potente inductor de la expresión de  $\text{TNF-}\alpha$ , IL-1 y IL-6 y estas citocinas son las principales activadoras de la respuesta hepática activa. La presencia de LPS en la circulación resulta en la activación transcripcional de IL-6, IL-1, proteína reactiva-C, fibrinógeno, proteínas de asociación a manosa, las proteínas del complemento C3, C4, factor B y factor H (184). El  $\text{IFN-}\gamma$ , es una citosina producida por los linfocitos, induce la expresión de proteínas del complemento en respuesta a monocitos estimulados con LPS, este efecto se potencia cuando se tratan las células junto con  $\text{TNF}\alpha$ . (184, 185).

Por otra parte, existen evidencias de que  $\text{TGF-}\beta$  es un regulador esencia en el control de la inflamación (186). Drouin et, al. (187) mostró que

TGF- $\beta$ 2 induce la transcripción de gene C3 en monocitos e inhibe la expresión en astrocitos.

En resumen el sistema del complemento es crucial tanto en la respuesta innata del huésped como en la inmunidad adquirida contra microorganismos patogénicos. Las proteínas del complemento inician la inflamación, matan bacterias y media la liberación de los componentes de la membrana externa de bacterias gram-negativas. Pero a pesar de los importantes avances que se han realizado en el campo de la bioquímica y genética aún faltan por realizar un mayor número de estudios que permita identificar con certeza el papel del complemento en la liberación de LPS. Las proteínas del complemento también influyen en las actividades biológicas de las células fagocíticas, determina la tasa de bacterias internalizadas y es crucial en la resolución favorable de las infecciones y de proteger al organismo de shock séptico y de la falla múltiple de órganos.

Finalmente, los componentes del complemento se han extendido mostrando que una proteína de asociación a lectinas con estructura similar a las proteínas C1q se asocia a bacterias gram-negativas activa la cascada del complemento y sirve como opsoninas.

#### ***4.8 Aspecto Biofísicos en la función y actividad de los LPS***

Los LPS son macromoléculas anfífilas localizadas en la superficie de bacterias gram-negativas (188 y 189). Participan en las funciones fisiológicas de las membranas de estas bacterias y son esenciales para el crecimiento y supervivencia de las mismas (190).

Los LPS son, al mismo tiempo, el blanco primario para la interacción de drogas antibacterianas y de componentes del sistema inmune del huésped. Liberados de la superficie bacteriana o aislados, los LPS presentan un gran espectro de actividades biológicas cuando se administran a animales o humanos *in vitro*. Participan en la patogénesis y en la manifestación de infecciones por organismos gram-negativos en general y de shock séptico en particular (191) son los agentes más potentes capaces de inducir reacciones inflamatorias generalizadas o locales tanto en humanos como en animales experimentales.

En bacterias gram-negativas la composición de la matriz lipídica de la membrana externa es extremadamente asimétrica con respecto a la estructura química y carga de los lípidos. De manera que la capa externa de la membrana externa está enriquecida en LPS y la capa interna de fosfolípidos (192).

Químicamente el LPS consiste de heteropolisacáridos hidrofílicos, que están covalentemente unidos a la porción lípido hidrofóbica denominada lípido A, que es la estructura responsable de anclar la molécula a la membrana externa de las bacterias.

En cepas silvestres la porción polisacárida consiste de cadenas O-específicas y un núcleo oligosacárido (LPS de cepas lisas). Cepas mutantes rugosas no expresan la cadena O pero se contienen el núcleo oligosacárido de variada longitud. El LPS de varias mutantes rugosas están caracterizados por quimiotipos en las secuencias de disminución de la longitud del núcleo de carbohidratos y se agrupan de la siguiente forma: Ra (núcleo completo), Rb, Rc, Rd y Re, la última representa las estructura mínima de LPS que consiste únicamente de lípido A y dos monosacáridos 2-ceto-3-deoxioctonato (Kdo). El lípido A está compuesto de  $\beta$ -glucosamil 1-(1-6)- $\alpha$ -D-glucosamina

disacárido y está fosforilado en la posición 1 y 4' del esqueleto disacárido y contiene en el caso de enterobacterias, de seis a siete residuos de (hidroxi) ácido graso que está unido en posición en forma de éster o amida. En resumen las características más importantes que distinguen a los LPS de los otros lípidos de membrana son la presencia de tres grupos hidroxilo y la presencia de grupo fosfato en el lípido A.

En forma libre el lípido A expresa todas las actividades características del LPS estudios *in vivo*, como pirogenicidad y letalidad esta estructura constituye el principio endotóxico del LPS (193).

Se ha encontrado que especies no entéricas presentan variantes del lípido A por ejemplo en *Rhodobacter capsulatus* se presentan solo cinco cadenas de ácido graso no saturadas de 12 átomos de carbono (194) mientras que las enterobacterias presenta un promedio de más de 12 átomos de carbono. Muchas de los LPS de las variantes de *Rhodobacter* pueden actuar como antagonistas de formas biológicamente activas de LPS/lípido A (195 y 196).

En 1991 Kaeahara (197) logró de forma exitosa la elucidación completa de la estructura del glicolípido que substituye al LPS de la membrana externa en *Flavobacterium devorans* (198) este glicolípido que se encontró contiene características estructurales inusuales y se identificó como un glico-esfingolípido.

Por otra parte, los LPS y el lípido A son moléculas anfifílicas (Fig. 12) y como consecuencia forman agregados en ambientes acuosos, la estructura de estos agregados varía en función de las moléculas que la conforman así como de la temperatura, fuerza iónica y el pH.

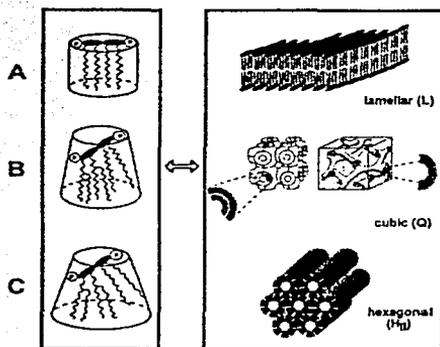


Fig. 12 Conformación molecular del lípido A (izquierda) en relación con sus estructuras supramoleculares.

La forma dependerá así mismo de la fluidez de las cadenas que pueden asumir dos estados: de fase gel y de fase líquida-cristalina. Entre estos dos estados de fase la transición reversible dependerá de la temperatura de fase de transición que depende de la longitud (Fig. 13) y el grado de saturación de las cadenas de ácido graso así como de la conformación, cambio en la densidad y la distribución de las moléculas (199).

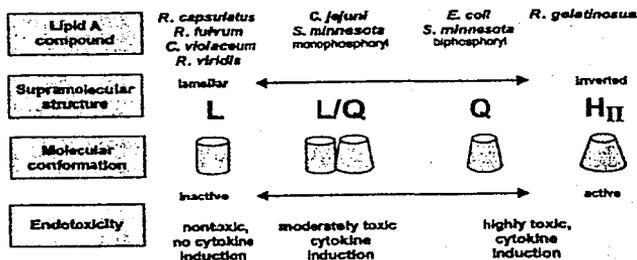


Fig. 13 Correlación entre la configuración estructural macromolecular y la actividad biológica por varios lípidos a 37°C.

Debido a la variación en los patrones de acilación y en la estructura química y composición de azúcares se presentan complejos polimorfismos en lípido A y LPS libre.

Las funciones de las endotoxinas se relacionan con ser el principal constituyente de la membrana externa de las bacterias, en contraste la actividad de la endotoxina se relaciona con su interacción con las células huésped y la señalización intracelular que activan.

Las membranas por lo general, constituyen la unión entre una célula con otra célula. Están compuestas de glicoproteínas y proteínas que funcionan como barreras, que mantienen constante el gradiente de iones a través de membranas y garantizan y controlan el paso de moléculas a través de las membranas. Modificaciones en la composición de las membranas conducen a alteraciones en la fluidez, formación de dominios, disrupción de la arquitectura de las membranas y la internación de lípidos exógenos. Con lo que la célula compensa estos cambios alterando la composición de la matriz lipídica (200).

Las endotoxinas interaccionan las membranas de celulares mediante interacciones hidrofóbicas (201-204) por la formación de pequeños agregados de LPS que se intercalan con la membrana celular. Otro posible mecanismo es a través de receptores de membrana como el CD14, o indirectamente, mediante la proteína de asociación a LPS (LBP), que transfiere al LPS al receptor CD14 (195, 205 y 206).

#### **4.8.1 Función de las endotoxinas como constituyentes de la membrana externa bacterial**

Por la complejidad de la membrana externa de bacterias gram-negativas se han desarrollado modelos que tratan de estudiar la composición de la membrana externa de las bacterias gram-negativas. La interacción de los LPS con la superficie celular puede conducir a modificaciones en el potencial electrostático, ya que la interacción de los LPS puede conducir a que las membranas cambien en su fluidez o rigidez.

#### **4.8.2 Potencial de Membrana**

Las propiedades electrostáticas de las membranas son, en adición a sus características hidrofóbicas, de importancia particular por la interacción con biomoléculas y pueden jugar un papel crucial en los efectos biológicos asociados a las membranas. En bicapas lipídicas se generan distintos potenciales electrostáticos a partir de diferentes fuentes y se combinan con un perfil potencial característico.

Las células por lo general efectúan un rígido control de la concentración de iones en relación con su entorno presentando una carga neta negativa al interior. La separación de carga a través de la membrana ocasiona una diferencia de potencial de  $-100\text{mV}$ . Este potencial transmembrana (que se mide mediante electrodos) es importante en la regulación de canales iónicos sensibles a voltaje (207).

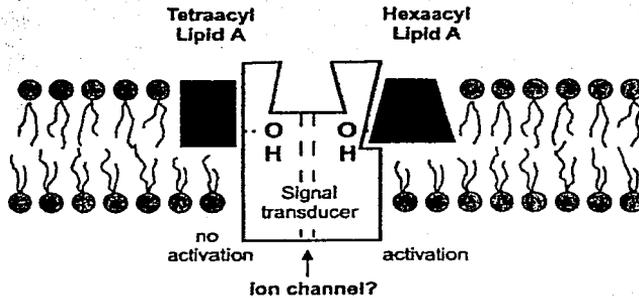


Fig. 14 Modelo propuesto de activación celular por endotoxina. Las moléculas de endotoxina atan con su mitad del lípido A a un potencial transmembrana transduciendo moléculas, probablemente un canal iónico. El enlace es facilitado por la vía de atadura de hidrógeno. Estos requieren la existencia de (hidroxi) ácidos grasos en la parte del lípido A. Un prerequisite, ajeno por la activación, es una conformación particular del lípido A.

Los componentes cargados de las moléculas de las membranas (fosfatos, carboxilos y amino) que se expresan en la superficie generan un potencial de superficie y que varía de acuerdo a la composición de la membrana.

Por otra parte, la asimetría de los lípidos provoca una diferencia de potencial adicional entre las dos superficies de la bicapa membranal. Una gran asimetría se presenta por la densidad de cargas así como por la conformación de las moléculas los LPS tipo Re presentan cuatro cargas negativas, en los cálculos de la densidad de cargas por unidad de área es de  $1.23 \text{ nm}^2$  y de  $0.55 \text{ nm}^2$  para los fosfolípidos lo que representa una diferencia de un factor de cuatro.

La presencia de estos cuatro iones negativos por molécula LPS provoca que actúen como una importante barrera contra los antibióticos cargados negativamente.

Porinas: Son proteínas presentes en las bacterias gram-negativas que sirven para que moléculas hidrofílicas de bajo peso molecular puedan cruzar a través de los poros proteicos (Omp) formados en la membrana externa (208). Las porinas presentan pesos moleculares característicos de 30 a 50 kDa son moléculas triméricas (208 y 209). En estudios de reconstitución de membranas se ha observado que los LPS no participan en la funcionalidad de los canales de porina pero algunos autores (210-212) señalan que se participan en el cierre del canal de porina según sea el potencial de membrana y participan así mismo en la fluidez de membrana.

#### ***4.8.3 Preparación de LPS en medios acuosos***

Preparación de LPS a la concentración de 1 mg/ml por lo general son suspensiones opalescentes que se obtienen mediante los siguientes procesos:

- 1) Calentando a 50°C.
- 2) Sonicando.
- 3) Removiendo los cationes divalentes del LPS por electrodiálisis (213 y 214).

La efectividad del tratamiento se ilustra por el hecho de que LPS-Re en trietilamina conducen a soluciones claras a la concentración de 1mg/ml y a esta misma concentración difícilmente se disuelven en agua. A esta concentración se forman agregados (215-218) y a mayores diluciones no es posible distinguir la fase en suspensión por inspección visual.

Por otra parte, una solución de LPS-Re (82.5  $\mu\text{M}$ ) en 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 100 mM KCl solo el 0.04% está en solución y el restante 99.96% se encuentra en suspensión.

#### **4.8.4 Concentración micelar crítica y solubilidad**

La formación de micelas está asociada con la existencia de la concentración micelar crítica (CMC) (219, 220, 221, 222 y 233). CMC de los LPS ha sido determinada mediante métodos espectrofotométricos que no son precisos por lo que deberá realizarse un mayor número de estudios que permita estudiar este parámetro.

#### **4.8.5 Efecto del pH en la solubilidad del LPSRe**

Experimentos de diálisis en equilibrio con ReLPS se realizaron a diferentes valores de pH en un rango de 6.5 a 8.2 se observó un pequeño cambio en la solubilidad de  $2.91 \times 10^{-8}$  M a  $4.55 \times 10^{-8}$  M esto se atribuye a que el pKa del LPS es de 8.58, este valor corresponde con la formación del pentanión. El pK refleja la segunda disociación del grupo de fosfato en posición 1. El valor estimado del pKa 8.58 es más alto que en compuestos sencillos pKa de 6.1 (como monosacáridos monofosfato) (224).

##### **4.8.5.1 Actividad de LPS-Re monoméricos**

Con el propósito de estudiar la actividad de LPS monoméricos se prepararon soluciones de LPS-Re 82.5  $\mu\text{M}$  preparaciones que contenían menos del 0.1% de formas monoméricas se compararon con dializados

monoméricos.  $3.4 \times 10^{-8}$  M (225) se compararon diversas soluciones con la prueba del lisado de amebocitos de *Limulus* así como la inducción de la expresión Erg-1 en macrófagos. La preparación monomérica fue de 179 a 1000 más activa que la suspensión para ambos ensayos. Con lo que se concluye que los agregados presentes en la suspensión eran inactivos.

#### ***4.8.6 Implicación para estudios de laboratorio y patogénesis***

Se requiere realizar un gran número de estudios que permitan comprender los factores que controlan la actividad de los LPS en investigaciones en laboratorio con LPS aislados y en infecciones.

Los estudios de solubilidad muestran que la concentración total de LPS aún en soluciones muy diluidas se encuentra por encima del límite de solubilidad. Mucho más importante para los estudios de laboratorio es considerar las suspensiones son menos activas que las preparaciones monoméricas obtenidas de los lisados. Por otra parte, es posible que realicen algunos errores en los análisis por la forma en la que se encuentran los LPS. En los ensayos de LPS que se encuentra asociados a LBP presentará mayor actividad porque la unión entre estas moléculas favorece la formación de monómeros (225).

#### ***4.8.7 LPS monoméricos se requieren para la especificidad estructural***

La asociación de LPS con células inmunes conduce a la activación de señales intracelulares como la activación de la proteína cinasa dependiente

de ceramida. Por otra parte, se ha determinado que las células discriminan entre el muy tóxico LPSRe que el DPLA o del lípido Iva, lo que sugiere que durante los procesos infecciosos los daños ocasionados por LPS involucran moléculas monoméricas.

En resumen la naturaleza anfipática de los LPS provoca que puedan existir en números formas de agregados en preparaciones acuosas. También existen con un verdadero estado de solución como monómeros. En sistemas biológicos los LPS pueden existir como formas libres o unidas a proteínas y actuar como especies activas. Es claro que concentraciones bajas de LPS (en pg a ng/ml) están involucradas en la activación de las células inmunes. Esta activación puede ocurrir por la vía del receptor CD-14. La naturaleza de la interacción de las formas monoméricas de LPS con las proteínas de señalización fisiológica es un área de gran interés en el futuro.

Por lo que habría de realizarse estudios de asociación de formas monoméricas con proteínas receptoras y determinar la interacción molecular entre estas estructuras.

Las relaciones entre la estructura-actividad de diferentes especies de LPS deberán estudiarse a nivel fisicoquímico en la que se involucraría la solubilidad, el grado de ionización, interacciones intramoleculares en solución y la asociación con proteínas acarreadoras ( en específico LBP y CD14 soluble). Todos estos estudios darán luz al diseño de drogas contra el shock séptico ocasionado por bacterias gram-negativas (Fig. 15).

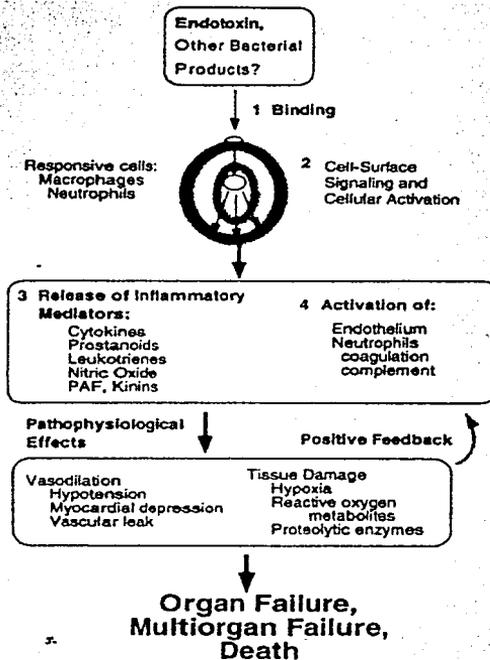


Fig. 15 Secuencia de eventos guiados a sepsis y Shock séptico. La endotoxina de bacterias gram-negativas activan CD14 de las células, inducen liberación de endotoxinas y otros mediadores celulares. Una vez obtenidos estos mediadores inflamatorios "tóxicos", niveladores, otras células convertidas, tales como células epiteliales activadas más ampliamente aumentando la cascada de soltar más citocinas y otros mediadores inflamatorios, aumentando la inflamación. La obtención de la respuesta puede poner a la altura de "giro de electrón positivo" induciendo la falta del órgano, falta de multiórganos y muerte.

#### 4.9 Proteínas de asociación a LPS

En la década de los setenta Ulevithch mostró que los LPS se pueden asociar a proteínas del plasma y esta asociación convierte al LPS en una forma menos tóxica (226) en particular con la proteína denominada proteína de asociación al LPS (LBP) (227-231). Posteriormente cuatro estudios han sido relevantes para estudiar las funciones de LBP *in vivo*. En dos de estos estudios se utilizaron anticuerpos para inactivar o deletar a LBP y los otros dos estudios usaron recombinantes para crear un ambiente libre de LBP.

En estudios tempranos realizados por Gally (232), se obtuvieron muestras de LBP de murinos que utilizaron para generar anticuerpos policlonales dirigidos contra esta proteína, en sus estudios encontraron que lograban bloquear la expresión de TNF $\alpha$  inducida por LPS (233).

La proteína LBP está compuesta de 456 aminoácidos (Fig. 16) es una glicoproteína plasmática de 60 kDa (234) está presente en el plasma a concentraciones de microgramos o menos por mililitro. Sin embargo, su concentración se eleva en condiciones inflamatorias, también está presente en los espacios extravasculares. Ha sido secuenciada en humano, ratón y rata. Estas secuencias entre sí presentan un alto grado de homología.

```
1  AMPLVAVRIT ENQGYAAQS GLALGSELI RTTLPTPTGD LRIPRVRGR  
51  YEPHELEIKS CEELEKALRP VFOQCELEI SDESIRVQGR NERYKSPFEL  
101 QOSFOYIVTG LSISVNLGG SESGRFQY CLQCSIDLAD VEVMSGDSG  
151 WLLGFRQKI ESKFQVLES RIGENICKSY SSDLQPTLQT LPTTEINDP  
201 ADIDVELVEA PRATAQKLEV KFCEKIFRKH HRSPTLLAA VMSLPEKDK  
251 MYFPAISDYV ENTAGLVYER SCYLPFSTD EMIPFQENIR LYLESPLFPV  
301 PRILALYPMH MLELQGVPS APLLEFSPKH LSYDFYKID APVLLPESSE  
351 EYVPELSVAT MYEATLTPWT SKKTFQKNG EYKTELESK VGLVQELLE  
401 ALLNYLLNT LYPFQKELA KGFPLLEK VQVTEGLQI KEDFLPGM  
451  VQDGV
```

Fig. 16 Secuencia de los aminoácidos de LBP humano.

El LBP es un miembro de las familias de proteínas que incrementan la permeabilidad/bactericida (BPI), proteínas de transporte de ésteres de colesterol (CETP) y proteínas que transportan fosfolípidos (PLTP). Todas estas proteínas se pueden asociar a LPS pero solo LBP facilita la interacción con CD14 (Fig. 17). Las proteínas CETP y PLTP no presentan un papel definido en las interacción del huésped con LPS (235 y 236). Un gran número de proteínas involucradas en la recepción olfatoria que presentan secuencias similares a LBP pero ninguna de estas proteínas se puede asociar al LPS. La expresión de LBP se ha detectado en varios tejidos de rata pero es sintetizada principalmente en el hígado (237 y 238). Estudios del control de su expresión se han efectuado en un gran número de especies (239-242), las cuales generalmente promueven la expresión de citocinas o genes inflamatorios durante respuesta de fase aguda.

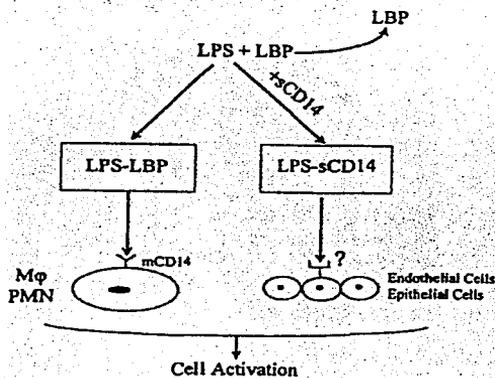


Fig. 17 Activación de LPS inducido de células mieloides llevando receptores CD14 a la membrana contra la activación de células adelgazando mCD14, tal como endotelio y células epiteliales.

Se han realizado estudios de cristalografía de rayos X de la proteína homóloga de LBP y de BPI. El BPI se asocia a LPS con mayor afinidad de LBP (243). Así mismo, se presentan moléculas de fosfolípidos. Estos sitios de asociación a fosfolípidos pueden acomodar moléculas como el lípido A. En adición los sitios de asociación a fosfolípidos está distante en secuencia en posiciones 90 y 100 y han sido implicados como importantes en la asociación LBP-LPS. La proteína LBP contiene cuatro cisteínas, en la proteína BPI las cisteínas forman puentes disulfuro entre los residuos 136 y 177 que también se encuentran en LBP. Sin embargo, los residuos 61 y 133 de BPI no forman puentes de cisteína porque se encuentran muy distantes entre sí.

#### **4.9.1 Ensayos**

Con el propósito de definir las propiedades funcionales de LBP se han realizado infinidad de estudios entre los que se encuentran opsonización por LBP mediante ensayos de fluorescencia.

Existen infinidad de ensayos para estudiar la capacidad de LBP para incrementar la activación celular (228), también se han realizado ensayos de asociación en los que se inmoviliza al LPS y se determina su capacidad para capturar moléculas de LBP con estos ensayos se ha determinado que LBP se una al lípido A con alta afinidad (243). De igual forma, se han realizado ensayos de marcaje radiactivo, a fin de establecer el recambio celular (244).

### ***Estudios de función – estructura***

La capacidad de LBP para interactuar con LPS y CD14 ha mostrado que LBP contiene dos sitios de asociación a estas moléculas y que están separados entre sí. Los sitios de 1-197 son importantes para la interacción del LBP con el LPS (244-250).

Por otra parte, estudios de mutagénesis dirigida de la Arg-94, Lys-95 y Lys-99 inhiben la capacidad de LPS de asociarse con LBP. La secuencia 158-172 presenta alta afinidad (30  $\mu\text{M}$ ) de asociación al LPS, encontró que en este sitio se presentan tres aminoácidos con carga positiva que pudieran contribuir a la asociación. Pero hasta el momento no se han encontrado los determinantes de asociación a CD-14.

### ***CD14 como un aceptor de LPS***

Se ha determinado que una o dos moléculas en asociación a una molécula de CD14, no se forman compuestos ternarios CD14-LBP-LPS. Por otra parte, el LBP participa en el LPS uniéndose a LBP. En cuanto a la cinética de la interacción se piensa que LBP se disocia del LPS cuando está presente alguna molécula de CD-14 (251) (Fig. 18). La constante de disociación LPS-LBP es de  $3.5 \times 10^{-9}$  M y para el complejo LPS-CD14 es de  $29 \times 10^{-9}$  M.

Sin embargo, otros autores mencionan que CD14 tiene mayor afinidad por el LPS que LBP (251). La constante de afinidad de LPS-LBP es  $2 \times 10^{-9}$  M.

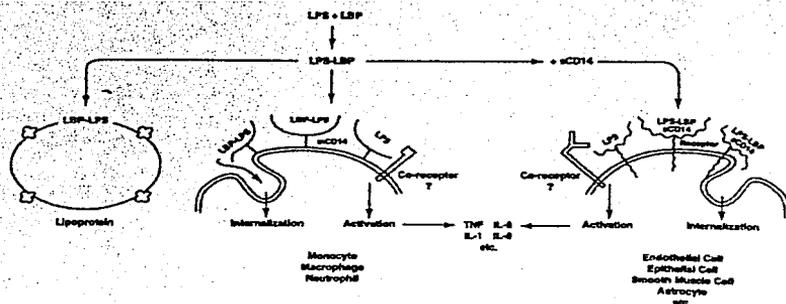


Fig. 18 El envolvimento de LBP con endotoxinas en interacción con células y lipoproteínas. La figura muestra la interacción de LPS con lipoproteínas y dos tipos de respuestas de LPS a células expresando mCD14 (monocitos) y no expresando mCD14 (células endoteliales). La interacción con lipoproteínas resultada en disminución de la actividad endotóxica del LPS. Por todo tipo de células, ahí es una interacción activada, indica como el LPS interacciona con un co-receptor y una fecha apuntando a "Activación" apuntando a "Internalización". Los detalles moleculares de la activación e internalización son procesos desconocidos.

### Aceptores alternos a LPS

Se ha demostrado que LPS se asocia a lipoproteínas (252 y 253) y fosfolípidos. La interacción de LPS con lipoproteínas se demostró desde 1960 (234), estudios en donde se reconstituye el suero con lipoproteína de muy baja densidad (VLDL), lipoproteínas de baja densidad (LDL) o lipoproteínas de alta densidad (HDL) solo este último grupo afecta la densidad de LPS añadidos. Por otra parte, algunos investigadores sugieren que algunos factores no lipídicos afectan la interacción de las lipoproteínas con los LPS porque cuando se incubaba HDL con LPS induce neutropenia en conejos. El estado en que se encuentra el LPS es importante para que se efectuó la asociación ya que cuando el LPS se trata con cloruro de calcio lo que promueve su agregación inhibe la interacción LPS-HDL y el desoxicolato de sodio de desagrega a los LPS revierte este la asociación entre LPS-HDL (254) (Fig. 19).

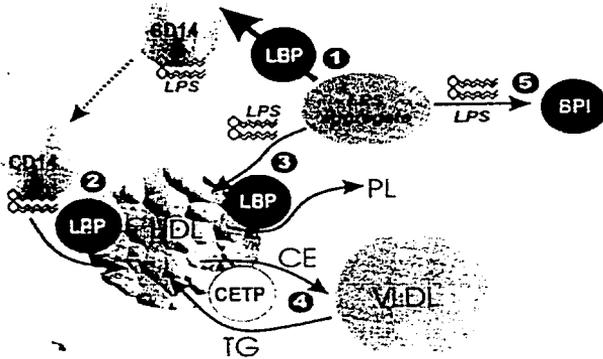


Fig. 19. Este LPS liberado por agregados bacterianos de formas largas. EL LBP mimetiza al LPS, y sirve como un transporte a proteínas presentes de la membrana atado a CD14, causando activación celular (no mostrada). EL LBP también transfiere LPS a sCD14 (1), este sirve como endotoxina "sink", y enlace SCD14 el LPS al haber transferido a una subunidad de partículas HDL, y este proceso es catalizado por LBP (2). Alternativamente, el enlace HDL, es cambiado por fosfolípidos (3). CETP influye en la composición de HDL, como es importante por la habilidad de aceptar LPS, cambiando ésteres de colesterol por triglicéridos (4). Otro miembro de enlace LPS familia proteica fue identificado por sus capacidades de neutralizar LPS, pero fue recientemente edificado a enlaces de fosfolípidos.

### **CD14 soluble**

La proteína CD14 de una glicoproteína glicosilfosfatidilinositol que se puede encontrar anclada a membranas o en forma soluble. La forma soluble se encuentra en el suero de individuos sanos en una concentración de 2-6 µg/ml. Las células endoteliales y epiteliales responden a bajas concentraciones de LPS mediante un mecanismo dependiente de CD14 soluble. Una vez activadas estas células responden liberando citocinas,

radicales de oxígeno que modulan la coagulación y promueven la presencia de leucocitos en los tejidos aledaños a la lesión (244, 255-257).

Las células que no presenta CD-14 membranar responden a los LPS de estos que se encuentran unidos a la proteína CD-14 soluble (232, 244, 255 y 256).

La proteína CD14 se libera de dos formas una de 49 kDa y otra completa de 55 kDa que carece del sitio de anclaje glicofosfatidilinositol. La forma de bajo peso molecular se deriva de las membranas por ruptura proteolítica y de esta manera presenta un extremo carboxilo más corto. Las moléculas alto peso molecular se liberan directamente de la porción intracelular. Pero los monocitos las pueden desprender de la membrana (233, 258). Experimentos con marcaje radiactivo muestran que CD14 soluble presenta masa molecular menor de 48kDa en comparación a la que se libera de las membranas 53kDa (259).

En conclusión CD14 representa un gran reservorio de asociación al LPS en la circulación y en la distribución de LPS en otros reservorios moleculares pueden jugar un rol crucial en la modulación de la respuesta del huésped.

## **5. LIPOPOLISACÁRIDOS Y LA ENFERMEDAD PERIODONTAL**

La placa dental o dentobacteriana es una entidad con aspecto de masilla, formada a partir de materia orgánica: mucina, productos de descamación epitelial, detritos alimenticios y colonias de bacterias adheridas entre sí o a una superficie, que se encuentran recubiertas por una matriz, cubre en forma de capa la superficie de los dientes, encía y llena los huecos e intersticios existentes y el dorso de la lengua. El sarro o tártaro dental, no es otra cosa que la concreción cálcica de esta placa dental, lograda por su existencia estacionaria sobre la superficie dental (260).

La placa dental está compuesta por más de 300 diferentes especies de bacterias (261). Este conjunto de bacterias es sumamente resistente a los mecanismos de defensa del huésped (262).

El número total de bacterias que pueden ser aisladas de un sitio sano, oscila entre  $10^2$  -  $10^3$  bacterias, de las cuales aproximadamente el 10% corresponde a bacterias gram-negativas las cuales presentan en su superficie una macromolécula denominada lipopolisacárido LPS.

La gingivitis es una enfermedad caracterizada por inflamación y aumento en el enrojecimiento de la encía que rodea la superficie dental conjuntamente con un incremento en el número y tipo de células inflamatorias; se produce de igual forma un aumento en las cuentas microbianas de hasta  $10^4$  -  $10^5$  microorganismos de los cuales del 15 al 50% son bacterias gram-negativas. Mientras que la periodontitis es una enfermedad en la que se produce una inflamación crónica que conlleva a la destrucción del hueso alveolar y pérdida de tejido conectivo se presenta un incremento en el número de bacterias de  $10^5$  a  $10^8$  microorganismos. Este

incremento se produce con una clara asociación de bacterias de tipo gram-negativas.

Entre los microorganismos gram-negativos más fuertemente asociados con la enfermedad periodontal se encuentran *Porphyromonas gingivalis*, *Bacteroides forsythus* y *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Estos microorganismos están asociados y participan de manera importante en la inducción de la enfermedad periodontal.

Los LPS participan como mediadores de procesos inflamatorios (Fig. 20). Se ha determinado que estas macromoléculas actúan en todas las células que componen la encía y que inician una cascada de procesos que deterioran las estructuras orales. Algunos estudios muestran que al tratar tejidos con diversos tipos de LPS se promueve la expresión de mediadores inflamatorios nocivos sobre el tejido del huésped.

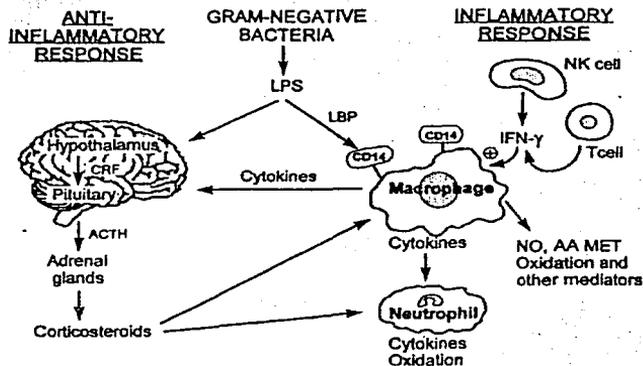


Fig. 20 Mecanismos de repuestas inflamatorias y antiinflamatorias de humanos a bacterias gram-negativas. El sistema neuroendocrino controla de respuesta de la inflamación. El componente primario del sistema neuroendocrino son los corticosteroides, el cual puede ser inducido por RsDPLA. RsDPLA puede bloquear la iniciación de las respuestas inflamatorias con LPS tóxico. El LPS, lipopolisacárido; IFN- $\gamma$ , interferón gamma; célula NK, célula natural killer; CRF, factor relacionado a corticotropina; ACTH, hormona adrenocorticotrópica.

## **5.1 Composición y estructura de lipopolisacáridos orales**

El grupo de LPS, más ampliamente caracterizado, es la familia de enterobacterias, en particular los de *Escherichia coli*, que están formados por cuatro dominios: un lípido A, que es la región tóxica de la molécula, el núcleo interno de oligosacáridos, el núcleo externo y la región polisacárida O-antigénica. Los LPS presentan un lípido A bastante conservado, que consiste en una molécula de  $\beta$ -(1,6)-D-glucosamina (1,4') disacárido fosfato, 3-hidroxi-ácido dodecanoico y tetradodecanoico unidos en posiciones 2'y 3'hidroxi-ácido graso respectivamente. El lípido A está unido a un núcleo interno que contiene L-glicero-D-mano-heptosa y ácido ceto-deoxi-octulosónico (KDO) y una región menos conservada en el núcleo externo, compuesta de azúcares como glucosa, galactosa, manosa y glucosamina. La molécula O-polisacárida, que esta unida al núcleo externo, varía ampliamente en composición y estructura, aún entre las mismas especies.

Los LPS aislados están compuestos de especies moleculares múltiples, que difieren en la presencia o cantidad de O-polisacáridos unidos en el núcleo externo y en la composición del lípido A. Algunas especies contienen lípido A acilado y los fosfatos son reemplazados por algún otro sustituyente.

## **5.2 Los LPS de las bacterias bucales y su composición química**

De acuerdo a la longitud de la cadena de ácido graso presente en la estructura del lípido A las bacterias pueden clasificarse en tres grupos: Bacterias con cadenas de ácidos grasos de longitud media (14C), con LPS

similar a *E. coli*; LPS con una longitud de ácido graso (17C) presente en *Bacterioides fragilis* y bacterias con cadenas de ácido graso de longitud (12-13C) como en *Pseudomonas aeruginosa*.

Los LPS obtenidos de *A. actinomycetemcomitans*, *Haemophilus parainfluenzae*, *Fusobacterium nucleatum* y *Campylobacter rectus*, contienen una región 3-hidroxi-tetradecanoato (3-OHC14), 3-deoxi-D-mano-octil-2-ácido ulopiranosónico (KDO) y L-glicero-D-mano-heptosa.

En *A. actinomycetemcomitans* presentan la región KDO forforilada y en ocasiones una región 3-hidroxi-hexadecanoato en *C. rectus* y *F. nucleatum* con más de 14-carbonos como componente activo.

Los LPS de *P. gingivalis*, *B. forsythus* y *Prevotella intermedia* contienen 3-OH-ácido tetradecanoico como el hidroxi-ácido graso mayoritario (263-268).

Se ha determinado también que *Capnocytophaga sputigena* contiene 2-hidroxi-15-metil-ácido hexadecanoico, pero hasta el momento se desconoce si el LPS de estos microorganismos está relacionado con los que se encuentran en los bacteroides.

Otra bacteria oral que tiene LPS con cadenas de ácido graso menores a las determinadas en enterobacterias, es *Eikenella corrodens*, que tiene un LPS compuesto por 3-hidroxi-ácido dodecanoico y ácido dodecanoico. *Centipeda periodontia*, *Selenomonas sputigena* y *Veillonella spp* tienen LPS que contienen 3-hidroxi-ácido tridecanoico y el carbono 13, de ácido graso no hidroxilado (268). Estos tres lipopolisacáridos contienen KDO y heptosa.

### 5.3 Estructura del lípido A obtenido de bacterias Orales

El lípido A obtenido de bacterias orales presenta el mismo tipo de estructura que las enterobacterias, es decir,  $\beta$ -(1,6)-glucosamina disacárido fosfato sustituida con ácidos grasos hidroxilados.

La estructura del lípido A más caracterizada corresponde a la de *P. gingivalis* y *A. actinomycetemcomitans*. Estos microorganismos presentan una estructura de lípido A similar a la de *Escherichia coli* (Fig. 21) y únicamente difieren en la sustitución de dodecanato por una molécula tetradecanato. El lípido A de *P. gingivalis*, presenta un menor número de cadenas de ácido graso unidas mediante un enlace  $\beta$ -(1,6) glucosamina y es de mayor longitud en comparación al lípido A de *A. actinomycetemcomitans*, que se encuentra fosforilado en la posición del átomo de carbono 1.

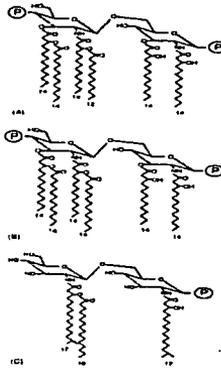


Fig. 21 Estructura química de las moléculas del lípido A de:  
(A) *E. Coli*;  
(B) *A. actinomycetemcomitans*  
(C) *P. gingivalis*

#### **5.4 Región polisacárida de los LPS orales**

Las porciones polisacáridas de las moléculas de LPS de las bacterias orales no han sido ampliamente caracterizadas como en las enterobacterias. El lipopolisacárido más estudiado corresponde al de *A. Actinomycetemcomitan*, que presenta una estructura repetida de (-3- $\alpha$ -D-fucosa (1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -L-ramosa-(3 $\rightarrow$ 1)- $\beta$ -D-N-acetil galactosamina). Biotipos de la misma especie contienen estructuras repetidas de deoxi-L-talosa y deoxi-D-talosa.

#### **5.5 Estimulación de mediadores inflamatorios por LPS orales**

La actividad biológica del LPS se debe al lípido A. Se ha demostrado que la remoción de una cadena de ácido graso o la modificación de alguno de los grupos fosfato, promueve la alteración de las actividades pirogénicas. Sin embargo, la inducción de la síntesis de interleucinas es menos estricta en cuanto a los requerimientos estructurales. Las moléculas de LPS estructuralmente diferentes de la cavidad oral, tienen una actividad biológica alterada. Los LPS obtenidos de *P. gingivalis* son menos potentes que los LPS de *E. coli* porque carecen del grupo 4'-fosfato. Sin embargo, los LPS de *A. actinomycetemcomitans*, *C. rectus*, *E. corrodens* y *F. nucleatum* presentan actividades similares a los de *E. coli*.

### **5.6 Los LPS modulan la respuesta del huésped**

Los LPS con ácidos grasos de cadena corta (*E. corrodens*) o de cadena intermedia (*F. nucleatum*) y con lípido A bifosforilado son potentes estimuladores de mediadores inflamatorios y en bajas concentraciones participan estimulando la respuesta innata en el huésped. Sin embargo, el LPS de *P. gingivalis* participa bloqueando la expresión de E-selectina, que es una molécula de adhesión necesaria para la eficiente salida de leucocitos al flujo sanguíneo. Una vez que *P. gingivalis* ha invadido las células epiteliales, éstas comienzan a secretar IL-8.

### **5.7 Efecto de los lipopolisacáridos sobre las células del periodonto**

Se ha demostrado que los tejidos gingivales sanos presentan un bajo nivel de expresión de mediadores inflamatorios. La función de la molécula E-selectina, que se encuentra en la superficie del endotelio, es facilitar la salida de leucocitos del flujo sanguíneo a los tejidos circundantes con el fin de atacar a las bacterias presentes en el sitio de la infección. La expresión de IL-8 guía a los leucocitos al sitio de la colonización bacterial.

Cuando las bacterias, proteínas y LPS son reconocidos por el huésped en particular mediante la asociación de estas moléculas con los monocitos la distribución de los leucocitos en los tejidos gingivales aumenta.

De la misma forma, las células epiteliales de la encía, que constituyen el primer punto de contacto con los LPS en el periodonto, liberan IL-1 (269).

Las endotoxinas también actúan sobre los fibroblastos gingivales que sintetizan y liberan IL-8 y proteína quimotáctica monocítica (MCP-1). Al igual se ha demostrado, que en fibroblastos obtenidos de encías inflamadas, la respuesta a la producción de IL-8 disminuye cuando se tratan a estas células con LPS extraídos de *P. gingivalis*.

Los monocitos, son capaces de responder a concentraciones muy bajas de LPS produciendo una amplia variedad de mediadores de procesos inflamatorios que estimulan a otros tipos celulares como los linfocitos y los osteoclastos.

De igual forma, los neutrófilos liberan citocinas en respuesta al tratamiento con LPS, en particular los extraídos de *P. gingivalis* y *Capnocytophaga ochracea* que son capaces de estimular la producción de IL-1, IL-8 y TNF- $\alpha$  en estas células.

Los LPS, en los macrófagos, promueven la síntesis de IL-1 $\beta$ , que a su vez estimula a las células no mieloides (endoteliales, epiteliales y fibroblastos) a secretar prostaglandinas y metaloproteinasas, mismas que se encuentran en altas concentraciones en los tejidos periodontales y en particular en el fluido crevicular, con lo que se inicia la destrucción de tejidos de soporte, como el ligamento periodontal y del hueso alveolar (Fig. 22).

De los mediadores de los procesos inflamatorios, el más ampliamente caracterizado es IL-1, entre cuyos efectos se encuentra la inducción de la proliferación de células T, degranulación de neutrófilos, liberación de citocinas y prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), así como de los fibroblastos gingivales y de los monocitos.

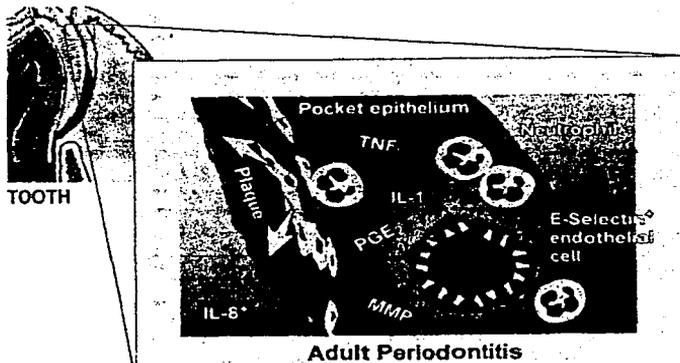
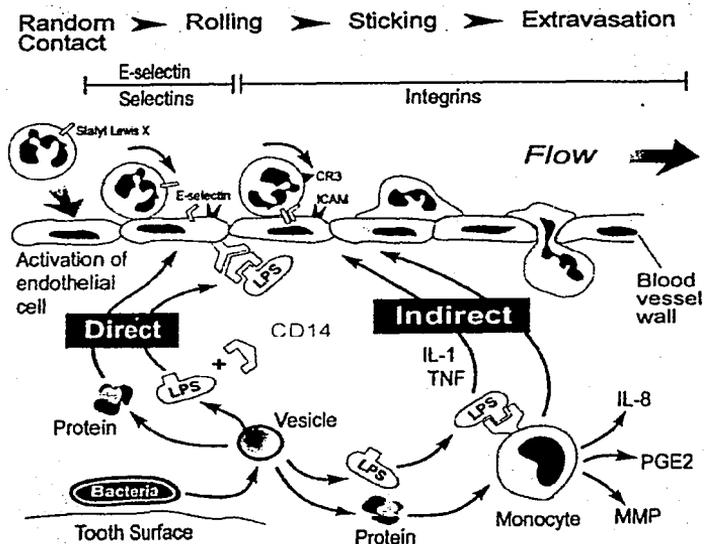


Fig. 22 Defensa innata del huésped en la periodontitis adulta. En la periodontitis adulta, los mediadores moleculares de la inflamación son expresados con niveles superiores que en tejido clínicamente sano y nuevos mediadores están presentes. La inclinación de IL-8 funda la expresión en tejido sano es interrumpida y una pérdida de formas epiteliales. PGE<sub>2</sub>: Prostaglandina E<sub>2</sub>, TNF: factor de necrosis tumoral; MMP: Matriz metaloproteínasa.

En respuesta a LPS, los monocitos son el recurso principal de secreción de TNF- $\alpha$ . El TNF- $\alpha$  estimula la resorción ósea, aunque es menos potente que la IL-1. De este modo incrementa la permeabilidad vascular, la degranulación de neutrófilos e induce la respuesta de varios tipos celulares incluyendo la liberación de IL-1 por monocitos y de PGE<sub>2</sub> por los fibroblastos (Fig. 23). Durante los procesos inflamatorios los niveles de PGE<sub>2</sub> se incrementan en el fluido crevicular. Se ha determinado que el tratamiento con agentes anti-inflamatorios disminuye el proceso destructivo, lo que nos sugiere que la PGE<sub>2</sub> participa de manera importante en la enfermedad periodontal (270).

Las proteínas de matriz, como las metaloproteinasas (MMP), que consisten al menos de nueve endopeptidasas dependientes de zinc, se ha establecido que participan en la destrucción del tejido conjuntivo y en la

resorción ósea. Los LPS de bacterias de la cavidad oral pueden estimular a los macrófagos a secretar MMP que participan en la destrucción tanto de tejidos blandos como óseos.



**Fig. 23** Derramamiento bacterial y el papel del CD14 en la respuesta del huésped. Derramamiento bacterial de ambos LPS y proteína, que es la mejor forma de comunicación entre la placa dentobacteriana y el huésped. Liberó vesículas para la superficie dentobacteriana interactúan con ambas células mieloides (monosacáridos) y no mieloides (endotelio). La activación directa del epitelio con LPS puede ocurrir activación indirecta de la primera bacteria interactuando con monocitos, liberando citoquinas. El resultado de sus interacciones es la salida de leucocitos para la corriente sanguínea alrededor de tejidos a eliminar la estimulación bacteriana. No obstante, el recalcitrante natural de la placa dental en la superficie del diente previene la completa remoción y contribuye a una estimulación constante por antígenos bacteriales. ICAM: Adhesión de molécula intracelular, PGE<sub>2</sub>: Prostaglandina E<sub>2</sub>, CR3: CD11/CD18-β integro, LPS: lipopolisacárido, TNF: Factor de necrosis tumoral, MMP: matriz metaloproteínasa.

### **5.8 Mecanismos de destrucción del hueso alveolar y del ligamento periodontal**

Se ha demostrado que la presencia de LPS conduce a la activación de los neutrófilos, que liberan de forma permanente gránulos que contienen hidrolasas ácidas como Catepsina y proteasas neutras como elastasas y colagenasas. Estas sustancias disgregan los proteoglicanos de la membrana celular bacteriana así como el colágeno y el fibrinógeno presente en el ligamento periodontal. Los neutrófilos se agrupan durante el curso de la inflamación aguda y en los abscesos, la lisis en el tejido inflamado da lugar a la liberación de grandes cantidades de hidrolasas y proteasas. También los macrófagos participan en este proceso, que secretan una serie de productos entre los que se encuentran hidrolasas ácidas, lisozima y proteasas neutras.

Los mecanismos que determinan la destrucción del hueso no se conocen con certeza, pero en estudios *in vitro* se ha demostrado que la prostaglandina E<sub>2</sub>, la IL-1 y el TNF $\alpha$  estimulan la formación de nuevos osteoclastos e incrementan la capacidad de resorción de las células destructoras existentes.

## **6. CONCLUSIÓN**

Después de nuestra investigación podemos concluir, de manera general, que la influencia del lipopolisacárido, como partes de las bacterias gram-negativas, es determinante en la enfermedad periodontal por las siguientes razones:

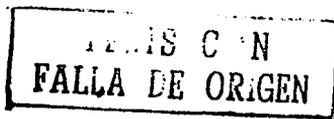
a) Los LPS son determinantes en los procesos inflamatorios del periodonto porque activan sus mediadores.

b) Esto es efectuado por la E-selectina que facilita la salida de leucocitos al flujo sanguíneo que al mismo tiempo son guiados por IL-8 al sitio de colonización bacterial.

c) Por otro lado, hemos mostrado que tanto los neutrófilos como los macrófagos participan en la defensa contra la infección producida por LPS, porque los neutrófilos liberan citosina que estimulan IL-1, IL-8 y TNF- $\alpha$ , mientras que los macrófagos promueven la síntesis de IL-1 $\beta$ , estimulando a las células endoteliales, epiteliales y fibroblastos a secretar prostaglandinas y metaloproteinasas con lo que se inicia la destrucción de tejidos de soporte.

## 7. BIBLIOGRAFIA

1. Rietschel ET, Brade H. Bacterial endotoxins. *Sci Am* 1992; 267:26-33.
2. Raetz CRH, Biochemistry of endotoxins. *Annu Rev. Biochem* 1990; 59:129-170.
3. Morrison DC, Ryan JL. Bacterial endotoxins and host immune responses. *Adv Immunol* 1979; 28:293-450.
4. Morrison DC, Ryan JL. Endotoxins and disease mechanisms. *Annu Rev Med* 1987; 38:417-432.
5. Rietschel ET, Brade H, Holst O, Brade L, Müller-Loennies S, Mamat U, Zähringer U, Beckmann F, Seydel U, Brandenburg K, Ulmer AJ, Mattem T, Heine H, Schletter J, Loppnow H, Schönbeck UU, Flad H-D, Hauschildt S, Schade FU, Di Padova F, Kusumoto S, Schumann RR. Bacterial endotoxin: chemical constitution, biological recognition, host response, and immunological detoxification. *Curr Top Microbiol Immunol* 1996; 216:39-81.
6. Westphal O, Westphal U, Sommer T. The history of pyrogen research. In: Schlessinger D. Ed. *Microbiology* 1977. Washington, DC: American Society of Microbiology, 1977:221-238.
7. Westphal O, Lüderitz O, Galanos C, Mayer H, Rietschel ET, The story of endotoxin. *Proc 3° Internat Conf Adv Immunopharmacol* 1975:13-34.
8. Berry LJ. Retrospective and prospective view of endotoxin research. In: Szentivanyi A, Friedman H, Nowotny A, eds. *Immunology and immunopharmacology of bacterial endotoxins*. New York: plenum Press, 1986:13-34.
9. Seibert FB. Fever-producing substance found in some distilled waters. *Am J Physiol* 1923; 67:90-104
10. Seibert FB, Introduction. *Symposium on bacterial pyrogens*. NY Acad Sci 1952; 14: 157-158.



11. Seibert FB, The cause of many febrile reactions following intravenous infections. *I. Am J Physiol* 1925; 71:621-652.
12. von Haller A. *Elementa physiologiae corporis humani*. Vol III. P. 154.
13. Magandie F. Remarques sur la nituce précédente (de Dupre), avec quelques expériences sur les effets des substances en putréfaction. *J Physiol (paris)* 1823, 3:81-88.
14. Panum PL. Das putride Gift, die Bakterien, die putride Infektion oder Intoxikation und die Septikämie. *Arch Pathol Anat Physiol Klin Med (Virchow's Archiv)* 1874, 60:301-352.
15. Billroth, Th. Beobachtungsstudien über das Wundfieber und accidentelle Wundkrankheiten. *Arch klin Chir* 1862; 2:578-667.
16. Dubzanski V. Naunyn B. Beiträge zur Lehre von der fieberhaften (durch pyrogene Substanzen bewirkten) Temperaturerhöhung. *Arch Pathol* 1873; 1:1-32.
17. Burdon-Sanderson J. Aetiology of fever, In: Albutt TC, ed. *A System of Medicine*. New York: Macmillan and Co, 1896.
18. Burdon-Sanderson, J. On the process of fever, part III: pyrexia. *Practitioner* 1876; 417-431.
19. Henle J. Von den Miasmen und den miasmatisch-kontagiösen Krankheiten. In: Sudhoff K, ed. *Klassiker der Medizin*. Leipzig: Joh Ambrosius Barth, 1910.
20. Klebs E. Beiträge zur pathologischen Anatomie der Schußwunden. Leipzig: Vogel, 1872.
21. Brieger L. Zur Erenntnis der Fäulnisalkaloide *Berl Dtsch Chem Ges* 1883; 16:1186-1191, 1405-1407.
22. Brieger L. Fraenkel C. Untersuchungen über Bakteriengifte. *Berlin Klin Wochenschr* 1890; 27:231-246, 268-271.
23. Buchner H. Über pyrogene Stoffe in den Bakterienzellen. *Berlin Klin Wochenschr* 1890; 27:673-677.

24. Buchner H. Die chemische Reizbarkeit der Leukozyten und deren Berlin Klin Wochenschr 1890; 35:222-268.
25. Pfeiffer R. Undetersuchungen über das Cholera Gift. Z Higiene 1892; 11:393-412.
26. Wolff M. Beiträge zur Immunitätslehre (Contributions to the teaching of immunity): Zentralbl Bakteriol Parasit Infekt Hyg I Orig 1904; 37:390-397.
27. Centanni, E. über Infektionsfieber. Chem Zentr (4° Series) 1894; 6:597.
28. Centanni, E. Untersuchungen über das Infektionsfieber-das Fiebergift des Bakterien. Dtsch Med Wochenschr 1894; 20:148.
29. Centanni E. Untersuchungen über das Infektionsfieber-das Fiebergift der Bakterien. Dtsch Med Wochenschr 1894; 20:270.
30. Centanni E. Weitere Beiträge zur Kenntnis des pyrogenen Wirkstoffes des Fiebers. Dtsch Med Wochenschr (Anal Series) 1940; 10:263-365.
31. Gram Chr. Über die isolierte Färbung der Schizomyceten in Schnitt-und Trockenpräparaten. Fortschr Med 1884; 2:185-189.
32. Boivin A. Mesrobeanu J. Mesrobeanu L. Technique pour la préparation des polysides microbiens spécifiques. Compt Rend Soc Biol 1933; 113:490-492.
33. Boivin A. Mesrobeanu L. Recherches sur les antigènes somatiques et sur les endotoxines des bactéries. I. Considérations générales et exposé des technique utilisées. Rev Immunol 1935; 1:553-569.
34. Boivin A. Traveaux récents sur la constitution chimique et sur les propriétés biologiques des antigènes bactériens. Schweiz Z Pathol Bakteriol 1946; 9:505-541.
35. Penell CB, Huddleson IF. Mich. State Coll. Agr. Expt. Sta. Tech. Bull. No. 15, 1937.
36. Morgan WTJ, Partridge SM. Studies in immunochemistry -the fractionation and nature of antigenic material isolated from *Bact. dysenteriae* (shige). Biochem J 1940; 34:169-191.

37. Morgan WTJ, Partridge SM. Studies in immunochemistry. 6. The use of phenol and of alkali in the degradation of antigenic material isolated from *Bact. Dysenteriae* (Shiga). *Biochem J* 1941; 35:1140-1163.
38. Morgan WTJ, Partridge SM. An examination of the O-antigen complex of *Bact. Typhosum*. *Br J Exp Pathol* 1942; 23:151-165.
39. Tal C, Goebel WF. On the nature of the toxic component of somatic antigen of *Shigella paradysenteriae* type Z (Flexner). *J Exp Med* 1950; 92:25.
40. Goebel WF, Binkley F, Perlman E. Studies on Flexner group of dysentery bacilli. I. Specific antigens of *Shigella paradysenteriae* (Flexner). *J Exp Med* 1945; 81:331-347.
41. Binkley F, Goebel WF, Perlman E. Studies on the Flexner group of dysentery bacilli. II. The chemical degradation of the specific antigen of type Z *Shigella paradysenteriae* (Flexner). *J. Exp Med* 1945; 81:331-347.
42. Goebel WF, Jesaitis MA. The somatic antigen of a phage-resistant variant of phage II *Shigella sonnei*. *J Exp Med* 1952; 96:425-438.
43. Gough GAC, Burnet FM. The chemical nature of the phage-inactivating agent in bacterial extracts. *J Path Bact* 1934; 38:301-303.
44. Coley WB. The treatment of inoperable sarcoma with the mixed toxins of erysipelas and *Bacillus prodigiosus* and final results in 140 cases. *J Am Med Assoc* 1989; 31:389-456.
45. Coley-Nauts H, Swift WE, Coley BL. The treatment of malignant tumors by bacterial toxins as developed by the late William B. Coley, MD, revised in the light of modern research. *Cancer Res* 1946; 6:205-216.
46. Shear MJ, Turner FC. Chemical treatment to tumors. V. Isolation of the hemorrhage producing fraction from *Serratia marcescens* (*Bacillus prodigiosus*) culture filtrate. *J Natl Cancer Inst* 1943; 4:81-97.
47. Hartwell JL, Shear MJ, Adams JR Jr. Chemical treatment of tumors. VII. Nature of the hemorrhage-producing fraction from *Serratia marcescens* (*Bacillus prodigiosus*) culture filtrates. *J Natl Cancer Inst* 1943; 4:107-122.

48. Westphal O, Lüderitz O, Bister F. Über die Extraktion von Bakterien mit Phenol/Wasser. Z Naturforsch 1952; 7:148-155.
49. Milner KC, Rudbach JA, Ribí E. Bacterial endotoxins: general characteristics. In: Weinbaum G, Kadis S, Aji SJ, eds. Microbial Toxins. Vol. IV. Bacterial Endotoxins. New York and London: Academic Press, 1971; 1-65.
50. Lüderitz O, Staub AM, Westphal O. Immunochemistry of O and R antigens of *Salmonella* and related *Enterobacteriaceae*. Bacteriol Rev 1966; 30:192.
51. Kauffmann F, Lüderitz O, Stierlin H, Westphal O. Zur Immunchemie der O-Antigene der Enterobacteriaceen. I. Analyse der Zuckerbausteine von *Salmonella*-O-Antigenen. Zentralbl Bakl I Orig 1960; 178:442-458.
52. Kauffmann F, Braun OH, Lüderitz O, Stierlin H, Westphal O. Zur Immunchemie der O-Antigene von Enterobacteriaceae. IV. Analyse der Zuckerbausteine von *Escherichia*-O-Antigenen. Zentralbl Bakteriol Parasitenk Abt I Orig 1960; 180:180-188.
53. Kauffmann F, Krüger L, Lüderitz O, Westphal O. Zur Immunchemie der Zuckerbausteine von Polysacchariden aus *Salmonella*-S- und R-Formen. Zentralbl Bakteriol Parasitenk Abt I Orig 1961; 182:57-66.
54. Jesaitis MA, Goebel WF. The chemical and antiviral properties of the somatic antigen of phage II: *Shigella sonnei*. J Exp Med 1952; 96:409-424.
55. Slein MW, Schnell GW. The polysaccharide of *Shigella flexneri* type 3. J Biol Chem 1953; 203:837-848.
56. Weidel W. L-Gala-D-mannoheptose als Baustein von Bakterienzellwänden. Z Physiol Chem 1955; 299:253-257.
57. Heath EC, Ghalambor MA. 2-Keto-3-deoxyoctonate, a constituent of cell wall lipopolysaccharide preparations obtained from *E. coli*. Biochem Res Commun 1963; 10:340-345.

58. Bobbins PW, Uchida T. Studies on the chemical basis of the phage conversion of O-antigens in the group *Salmonella*. *Biochemistry* 1962; 1:323-335.
59. Robbins PW, Uchida T. Determinants of specificity in *Salmonella*: changes in antigenic structure mediated by bacteriophage. *Fed Proc* 1962; 21:702-710.
60. Uchida T, Robbins PW, Luria SE. Analysis of the serologic determinant group of the *Salmonella* O antigen. *Biochemistry* 1963; 2:663-668.
61. Losick R, Robbins PW. Mechanism of  $B^{15}$  conversion studied with a bacterial mutants. *J Mol Biol* 1967; 30:445-455.
62. Nikaido H, Nadie Y, Mäkelä PH. Biosynthesis of O-antigenic polysaccharides in *Salmonella*. *Ann NY Acad Sci* 1966; 133:209-314.
63. Pon G, Staub AM. Etude chimique du polyside somatique typhipe. *Bull Soc Chim Biol* 1952; 34:1132.
64. Staub Am, Tinelli R. Structure chimique de certains motifs antigéniques présents dans les antigènes 09 et 12 du tableau de Kauffmann-White. *Bull Soc Chim Biol* 1957; 39:65-83.
65. Staub AM. Constitution chimique de quelque sites présents á la surface des *Enterobacteriaceae* responsables de leur spécificité vis á vis des anticorps et des bacteriophages. *Pathol Microbiol* 1961; 24:890-909.
66. Staub AM. The role of the polisaccharido moiety in determining the specificity and immunological activity of the O antigen complex of *Salmonellae*. In: Landy M, Braun W, eds. *Bacterial Endotoxins*, New Brunswick: Rutgers University Press, 1964:38-48.
67. Lüderitz O, Westphal O, Staub AM, Le Minor L. Preparation and immunological properties of an artificial antigen with colitose (3-deoxy-L-fucose) as determinant group. *Nature* 1960; 188:556-558.
68. Murase W. *Jpn J Bacteriol* 1959; 440:975 (in Japanese).
69. Fukasawa T, Nikaido H. Galactose-sensitive mutants of *Salmonella*. *Nature* 1959; 184:1168-1169.

70. Nikaido H. Galactose sensitive mutants of *Salmonella*. I. Metabolism of galactose. *Biochim Biophys Acta* 1961; 48:460-469.
71. Kikaido H. Studies on the biosynthesis of cell wall polysaccharide in mutant strains of *Salmonella*. II. *Proc Natl Acad Sci USA* 1962; 48:1542-1548.
72. Elbein AD, Heath EC. The biosynthesis of cell wall lipopolysaccharide in *Escherichia coli*. I. The biochemical properties of a uridine diphosphate galactose -4-epimeraseless mutant. *J Biol Chem* 1965; 240:1919-1925.
73. Teng NNH, Kaplan HS, Herbert JM, Moore C, Douglas H, Wunerlich A, Braude H. Protection against gram-negative bacteremia and endotoxemia with human monoclonal IgM antibodies. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82:1790-1794.
74. Young LS, Stevens P. Cross-protective immunity to gram-negative bacilli: studies with core glycolipid of *Salmonella minnesota* and antigens of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Dis* 1977; 136:174-180.
75. Young LS, Gascon R, Alam S, Bermudez LEM. Monoclonal antibodies for treatment of gram-negative infections. *Rev Infect Dis* 1989; 11:1564-1571.
76. Ziegler EJ, Fischer CJ, Sprung CI, Straube RC, Sadoff JC, Foulke GE, Wortel CH, Fink MP, Dellinger RP, Teng NNH, Allen IE, Berger HJ, Knatterud GI, LoBuglio AF, the HA-1A Sepsis Study Group. Treatment of gram-negative bacteremia and septic shock with HA-1A human monoclonal antibody against endotoxin. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *N Engl J Med* 1991; 324: 429-436.
77. Greenman RL, Schein RMH, Martin MA, Wenzel RP, McIntyre NR, Emmanuel G. A controlled clinical trial of E5 murine monoclonal antibody to endotoxin in the treatment of gram-negative sepsis. *JAMA* 1991; 266:1097-1102.
78. Miles AA, Pirie NW. Antigenic preparations from *Brucella melitensis*. *Br J Exp Pathol* 1939; 20:278-296.
79. Westphal O. Bakterienreizestoffe und ihre Wirkungsweise. *Angew Chem* 1952; 64:314.

0. Westphal O, Lüderitz O, Eichenberg E, Keiderling W. Über bakterielle Reizstoffe I. Mitteilung. Reindarstellung eines Polysaccharid-Pyrogens aus *Bacterium coli*. Ztschr Naturforsch 1952:536.
1. Lüderitz O, Westphal O. Über bakterielle Reizstoffe. II. Mitteilung. Qualitative und quantitative papierchromatographische Bestimmung der Zuckerkbausteine eines hochgereinigten Polysaccharids aus Colibakterien. Z Naturforsch 1952; 7:548-555.
2. Westphal O, Lüderitz O. Chemische Erforschung von Lipopolysacchariden gram-negativer Bakterien. Angew Chemie 1954; 66:407-417.
3. Ikawa M, Koepfli JB, Mudd SG, Niemann C. An agent from *E. coli* causing hemorrhage and regression of an experimental mouse tumor. III. The component fatty acids of the phospholipid moiety. J Am Chem Soc 1953; 75:1035-1038.
4. Ikawa M, Koepfli JB, Mudd SG, Niemann C. An agent from *E. coli* causing hemorrhage and regression of an experimental mouse tumor. IV. Some nitrogenous components of the phospholipid moiety. J Am Chem Soc 1953; 75:3439-3442.
5. Nowotny A. Chemical structure of a phosphomucolipid and its occurrence in some strains of *Salmonella*. J AM Chem Soc 1961; 83:501-503.
6. Burton HJ, Carter HE. Purification and characterization of the lipid A component of the lipopolysaccharide from *Escherichia coli*. Biochemistry 1964; 3:411-418.
7. Gmeiner J, Lüderitz O, Westphal O. Biochemical studies on lipopolysaccharides of *Salmonella* R mutants 6. Investigations on the structure of the lipid A component. Eur J Biochem 1969; 7:370-379.
8. Stetson CA. Studies on the mechanism of the Schwartzman phenomenon. Similarities between reactions to endotoxins and certain reactions of bacterial allergy. J Exp Med 1955; 101:421.

**FALTA  
PAGINA**

**97**

100. Brouckaert P, Fiers W. Tumor necrosis factor and the systemic inflammatory response syndrome. *Curr Top Microbiol Immunol* 1996; 216:167-207.
101. Freeman Bob A. Microbiología de Burrows. 22va. Edición. Editorial Interamerican Mc Graw-Hill, México DF, 1989:368-371.
102. Peña Martínez José. Inmunología, bases moleculares y celulares. Ediciones Pirámides. Madrid, España. 1994:344-347.
103. Raetz C R H. Biochemistry of endotoxins. *Annu Rev. Biochem.* 1990; 59:129-170.
104. Nikaido H. Outer membrane. In: Neidhardt FC, Curtiss III R, Ingraham JL, Lin ECC, Low Jr KB, Magasanik B, Reznikoff WS, Riley M, Schaechter M, Umbarger HE, eds. *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*, Cellular and Molecular Biology, 2d ed. Washington, DC: American Society for Microbiology, 1996:29-47.
105. Nikaido H. Permeability of the lipid comains of bacterial membranes. In: Alois RC, Curtain CC, Gordon LM, eds. Membrane Transport and Infotmation Storage. *Advances in Membrane Fluidity*. Vol 4. New York: Alan Riss, 1991:165-190.
106. Brandenburg K, Seydel U. Investigation into the fluidity of lipopolysaccharide and free lipid A membrane systems by Fourier-transform infrared spectroscopy and differential scanning calorimetry. *Eur J Biochem* 1990; 191:229-236.
107. Labischinski H, Naumann D, Schulz C, Kusumoto S, Shiba T, Rietschel ET, Giesbrecht P. Comparative X-ray and Fourier-transform-infrared investigations of conformational properties of bacterial and syntheticlipid A of *Escherichia coli* and *Salmonella minnesota* as well as patial structures and nalogues thereof. *Eur J Biochem* 1989; 179:659-665.
108. Neidhardt FC. Chemical composition of *Escherichia coli*. In: Neidhardt FC, Ingraham JL, Low Jr KB, Magasanik B, Schaechter M, Umbarger HE, eds. *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*, Cellular and Molecular

- Biology. 1 st ed. Washington, DC: American Society for Microbiology, 1987:3-6.
109. Vaara M, Nikaido H, Molecular organization of bacterial outer membrane. In: Rietschel ET, ed. Handbook of Endotoxin, Vol. 1: Chemistry of Endotoxin. Amsterdam: Elsevier Science Publishers B. V., 1984:1-45.
  110. Vaara M. Antibiotic-supersusceptible mutants of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. Antimicrob Agents Chemother 1993; 37:2255-2260.
  111. Vaara M. Agents that increase the permeability of the outer membrane. Microbiol Rev 1992; 56:395-411.
  112. Vaara M, Poro M. Group of peptides that act synergistically with hydrophobic antibiotics against gram-negative enteric bacteria. Antimicrob Agents Chemother 1996; 40:1801-1805.
  113. Nikaido H, Vaara M. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. Microbiol Rev 1985; 49:1-32.
  114. Vaara M, Vaara T. Ability of cecropin to penetrate the enterobacterial outer membrane. Antimicrob Agents Chemother 1994; 38:2498-2501.
  115. Vaara M. Increased outer membrane resistance to ethylenediaminetetracetate and cations in novel lipid A mutants. J Bacteriol 1981; 149:523-528.
  116. Vaara M, Vaara T, Jensen M, Helander I, Numinen M, Rietschel ET, Mäkelä PH. Characterization of the lipopolysaccharide from the polymyxin-resistant pmrA mutants fo *Salmonella typhimurium*. FEBS Lett 1981; 129:145-149.
  117. Onishi HR, Pelak BA, Gerckens LS, Silver LL, Kahan FM, Chen MH, Patchett AA, Galloway SM, Hyland SA, Anderson MS, Rietz CR. Antibacterial agents that inhibit lipid A biosynthesis. Science 1996; 274:980-982.

118. Smith AI, Smith DH, Averill DR, Moxon ER. Production of *Haemophilus influenzae* b meningitis in infant rats by intraperitoneal inoculation. *Infect Immun* 1973; 8:278-290.
119. Zwahlen A, Rubin LG, Connellu CJ, Inzana TJ, Moxon ER. Alteration of the cell wall of *Haemophilus influenzae* type b by transformation with cloned DNA: association with attenuated virulence. *J Infect Dis* 1985; 152:485-492.
120. Weiser JN, Williams A, Moxon ER. Phase-variable lipopolysaccharide structures enhance the invasive capacity of *Haemophilus influenzae*. *Infect Immun* 1990; 58:455-3457.
121. Hood DW, Deadman ME, Jennings MP, Bisceric M, Fleischmann RD, Venter JC, Moxon ER. DNA repeats identify novel virulence genes in *Haemophilus influenzae*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93:11121-11125.
122. Patrick D, Betts J, Frey EA, Prameya R, Dorovini ZK, Finlay BB. *Haemophilus influenzae* lipopolysaccharide disrupts confluent monolayer of bovine endothelial cells via a serum-dependent cytotoxic pathway. *J Infect Dis* 1992; 165:865-872.
123. Hood DW, Deadman ME, Allen T, Masoud H, Martin A, Brisson JR, Fleischmann R, Venter JC, Richards JC, Moxon ER. Use of the complete genome sequence information of *Haemophilus influenzae* strain Rd to investigate lipopolysaccharide biosynthesis. *Mol Microbiol* 1996; 22:951-965.
124. Kimura A, Hansen EJ. Antigenic and phenotypic variants of *Haemophilus influenzae* type b lipopolysaccharide and their relationship in virulence. *Infect Immun* 1986; 51:60-79.
125. Seifert HS. Questions about gonococcal pilus phase and antigenic variation. *Mol Microbiol* 1996; 21:433-440.
126. Opal SM. Lessons learned from clinical trials of sepsis. *J Endotoxin Res* 1995; 2:221-226.

127. Anderson BM, Solgberg O. Release of endotoxin from *Neisseria meningitidis*: a short survey with a preliminary report on virulence in mice. Natl Inst Public Health Ann 1980; 3:49-55.
128. Eng RH, Smith SM, Fan-Harvard P, Ogbara R. Effects of antibiotics on endotoxin release from gram-negative bacteria. Diag Microbiol Infect Dis 1993; 16:185-189.
129. Simon DM, Koenig G, Trenholme GM. Differences in release of tumor necrosis factor from THP-1 cells stimulated by filtrates of antibiotic killed *Escherichia coli*. J. Infect Dis 1991; 164:800-802.
130. Stevens DL, Yan S, Bryant AE. Penicillin-binding protein expression at different growth stages determines penicillin efficacy in vitro and in vivo: an explanation for the inoculum effect. J Infect Dis 1993; 167:1401-1405.
131. Jackson JJ, Kropp H. Differences in mode of action of  $\beta$ -lactam antibiotics influence morphology, LPS release and in vivo antibiotic efficacy. J Endotoxin Res 1996; 3:201-218.
132. Morrison DC, Bucklin SE, Leeson MC, Norimatsu M. Contribution of soluble endotoxin released from gram-negative bacteria by antibiotics to the pathogenesis of experimental sepsis in mice. J Endotoxin Res 1996; 3:237-244.
133. Dofferhoff ASM, Buys J. The influence of antibiotic-induced filament formation on the release of endotoxin from gram-negative bacteria. J Endotoxin Res 1996; 3:187-194.
134. Opal SM, Horn CL, Palardy JE, Jhung J, Bhattacharjee A, Young LD. The in vivo significance of antibiotic-induced endotoxin release in experimental gram-negative sepsis. J Endotoxin Res 1996; 3:245-252.
135. Nakano M, Kirikare T. Biological characterization of *Pseudomonas aeruginosa* endotoxin released by antibiotic treatment in vitro. J Endotoxin Res 1996; 3:195-200.

136. Arditis M, Zhou J, Huang SH. Antibiotic induced bacterial killing activates vascular endothelial cells and whole blood cells. Role of free lipopolysaccharide and soluble CD14. *J Endotoxin Res* 1996; 3:179-186.
137. Rokke O, Sveen G, Lehmann AK, Digraanes A, Halstensen A. Endotoxin and cytokines in plasma and clinical manifestations during treatment of septicemia with imipenem or cefuroxime/metronidazole. *Immunol Infect Dis* 1996; 6:159-166.
138. Mosk CN, Jurkovich GJ, Dries D, Maier RV. The clinical significance of endotoxin released by antibiotics; what is the evidence. *J Endotoxin Res* 1996; 3:253-260.
139. Yokochi T, Kusumi A, Kido N, Kato Y, Sugiyama T, Koide N, Jiang G-Z, Narita K, Takahashi K. Differential release of smooth-type lipopolysaccharide from *Pseudomonas aeruginosa* treated with carbapenem antibiotics and its relation to production of tumor necrosis factor alpha and nitric oxide. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40:2410-2414.
140. Haranaka K, Satomi N, Sakurai A. Differences in tumor necrosis factor productivity ability among rodents. *Br J Cancer* 1984; 50:471-478.
141. Morgan BP. *COMPLEMENT: Clinical Aspects and Relevance to Disease*. London: Academic Press, 1990.
142. Reid KBM. The complement system. In: Jones BD, Glover DM, eds. *Molecular Immunology*. 2d ed. Oxford: Oxford University Press, 1996:326-381.
143. Esser AF. Big MAC attack: complement proteins cause leaky patches. *Immunol Today* 1991; 12:316-318.
144. Bhakdi S, Tranum-Jensen J. Complement lysis: a hole is a hole. *Immunol Today* 1991; 12:318-320.
145. Lambris JD, ed. *The Third Component of Complement*. Chemistry and Biology. Berlin: Springer-Verlag, 1990.

146. Esser AF. The membrane attack complex of complement. Assembly, structure and cytotoxic activity. *Toxicology* 1994; 87:229-247.
147. Morgan BP, Gasque P. Extrahepatic complement biosynthesis: where and why. *Clin Exp Immunol* 1997; 107:1-7.
148. Cooper NR, Morrison DC. Binding and activation of the first component of human complement by the lipid A region of lipopolysaccharides. *J Immunol* 1978; 120:1864-1868.
149. Betz SJ, Isliker H. Antibody-independent interactions between *Escherichia coli* J5 and human complement components. *J Immunol* 1981; 127:1748-1754.
150. Pillemer L, Blum L, Lepow IH, et al. The properdin system and immunity. I. Demonstration and isolation of a new serum protein, properdin, and its role in immune phenomena. *Science* 1954; 120:279-285.
151. Schreiber RD, Morrison DC, Podack ER, et al. Bactericidal activity of the alternative complement pathway generated from 11 isolated plasma proteins. *J Exp Med* 1979; 149:870-882.
152. Meri S, Pangburn MK. Discrimination between activators and nonactivators of the alternative pathway of complement regulation by a sialic acid/polyanion binding site on factor H. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87:3982-3986.
153. Pillemer L, Blum L, Lepow IH, et al. The properdin system and immunity. I. Demonstration and isolation of a new serum protein, properdin, and its role in immune phenomena. *Science* 1954; 120:290-298.
154. Schreiber RD, Morrison DC, Podack ER, et al. Bactericidal activity of the alternative complement pathway generated from 11 isolated plasma proteins. *J Exp Med* 1979; 149:850-862.
155. Meri S, Pangburn MK. Discrimination between activators and nonactivators of the alternative pathway of complement regulation by a sialic acid/polyanion binding site on factor H. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87:3982-3986.

156. Dankert Jr Esser AF. Proteolytic modification of human complement protein C9. Loss of poly (C9) and circular lesion formation without impairment of function. Proc Natl Acad Sci USA 1985; 82:2128-2132.
157. Tomlinson S, Taylor PW, Luzio JP. Transfer of preformed terminal C5b-9 complement complexes into the outer membrane of viable gram-negative bacteria: effect on viability and integrity. Biochemistry 1990; 29: 1852-160.
158. Acosta JA, Benzaquen LR, Goldtein DJ, et al. The transient pore formed by homologous terminal complement complexes functions as a bidirectional route for the transport of autocrine and paracrine signals across human cell membranes. Mol Med 1996; 2:755-765.
159. Joiner KA. Complement evasion by bacteria and parasites. Annu Rev Microbiol 1988; 42:201-230.
160. Heffeman EJ, Reed S, Hackett J, et al. Mechanism of resistance to complement-mediated killing of bacteria encoded by *Salmonella typhimurium* virulence plasmid gene rck. J Invest 1992; 90:953-964.
161. Vukajlovich SW. Antibody-independent activation by lipid A is restricted to Re-chemotype lipopolysaccharides and purified lipid A. Infect Immun 1986; 53:480-485.
162. Vukajlovich SW, Hoffman J, Morrison DC. Activation of human serum complement by bacterial lipopolysaccharides: structural requirements for antibody independent activation of the classical and alternative activation of the alternative of the classical and alternative pathways. Mol Immunol 1987; 24:319-331.
163. Pangburn MK, Morrison DC, Schreiber RD, et al. Activation of the alternative complement pathway: recognition of surface structures on activator by bound C3b. J Immunol 1980; 124:977-982.
164. Galanos C, Lüderitz O. The role of the physical state of lipopolysaccharides in their interaction with complement. High molecular weight as prerequisite for the expression of anti-complementary activity. Eur J Biochem 1976; 65:403-408.

165. Wilson ME, Morrison DC. Evidence for different requirements in physical state for the interaction of lipopolysaccharides with classical and alternative pathways of complement. *Eur J Biochem* 1982; 128:137-141.
166. Tesh VL, Vukajlovich SW, Morrison DC. Endotoxin interactions with serum proteins: relationship to biological activity. *Prog Clin Biol Res* 1988; 272:47-62.
167. Tesh VL, Ducan RL, Morrison DC. Interaction of *Escherichia coli* with normal human serum: kinetics of serum-mediated lipopolysaccharide release and its dissociation from bacterial killing. *J Immunol* 1986; 137:1329-1335.
168. Freudenberg MA, Meier-Dieter U, Staehelin T, et al. Analysis of LPS released from *Salmonella abortus equi* in human serum. *Microb Pathog* 1991; 10:93-104.
169. Tesh VL, Morrison DC. The physical-chemical characterization and biologic activity of serum released lipopolysaccharides. *J Immunol* 1988; 141:3523-3531.
170. Mattsby-Balzer I, Lindgran K, Lindholm B, et al. Endotoxin shedding by enterobacteria: free and cell-bound endotoxin differ in Limulus activity. *Infect Immun* 1991; 59:689-695.
171. Figueroa JE, Densen P. Infectious diseases associated with complement deficiencies. *Clin Microbiol Rev* 1991; 4:359-395.
172. Platonov AE, Beloborodov VB, Gabilovitch DI, et al. Immunological evaluation of late complement component-deficient individuals. *Clin Immunol Immunopathol* 1992; 64:98-105.
173. Curry BJ, Morrison DC. Role of complement in endotoxin initiated lethality in mice. *Immunopharmacology* 1979; 1:125-135.
174. Rothstein JL, Lint TF, Schreiber H. Tumor necrosis factor/cachectin induction of hemorrhagic necrosis in normal tissue requires the fifth component of complement C5. *J Exp Med* 1988; 168:2007-2021.

175. Hsueh W, Sun X, Rioja LN, et al. The role of the complement system in shock and tissue injury induced by tumor necrosis factor and endotoxin. *Immunology* 1991; 70:309-314.
176. Quezado ZMN, Hoffman WD, Winkelstein JA, et al. The third complement of complement protects against *Escherichia coli* endotoxin-induced shock and multiple organ failure. *J Exp Med* 1994; 179:569-578.
177. McCabe WR. Serum complement levels in bacteremia due to gram-negative organisms. *New Engl J Med* 1973; 288:21-23.
178. Ohno A, Isii Y, Tateda K, et al. Role of LPS length in clearance rate of bacteria from bloodstream of mice. *Microbiology* 1995; 141: 2749-2756.
179. Pollack M, Esponiza AM, Guelde G, et al. Lipopolysaccharide (LPS)-specific monoclonal antibodies regulate LPS uptake and LPS-induced tumor necrosis factor- $\alpha$  responses by human monocytes. *J Infect Dis* 1995; 172:794-804.
180. Hammond SM. Inhibitor of lipopolysaccharide biosynthesis impair the virulence potential of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* 1992; 100:293-298.
181. Noel GJ, Katz S, Edelson PJ. Complement-mediated early clearance of *Haemophilus influenzae* type b from blood is independent of serum lytic activity. *J Infect Dis* 1988; 157:85-90.
182. Loss M, Euneuer B, Clas F. Interaction of bacterial endotoxin (LPS) with fluid phase and macrophage membrane associated C1q, the Fc-recognizing component of the system. *Adv. Exp Med Biol* 1990; 256:301-317.
183. Château M-T, Caravano R. The oxidative burst triggered by *Salmonella typhimurium* in differentiated U937 cells requires complement and a complete bacterial lipopolysaccharide. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1997; 17:57-66.
184. Volanakis JE. Transcriptional regulation of complement genes. *Annu Rev Immunol* 1995; 13:277-305.

185. Williams SA, Vik DP. Characterization of the 5' flanking region the human complement Factor H gene. *Scand J Immunol* 1997; 45:7-15.
186. McCartney-Francis NL, Wahl SM. Transforming growth factor- $\beta$ : a matter of life and death. *J Leukocyte Biol* 1994; 55:401-409.
187. Drouin SM, Carlino JA, Barnum SR. Transforming growth factor- $\beta$ -mediated regulation of C3 gene expression in monocytes. *Mol Immunol* 1996; 33:1025-1034.
188. Raetz C. Biochemistry of endotoxins. *Ann Rev Biochem* 1990; 59:129-170.
189. Rietschel ET, Brade H, Holst O, Brade L, Müller-Loennies S, Mamat U, et al. Bacterial endotoxin: chemical constitution, biological recognition, host response, and immunological detoxification. In: Rietschel ET, Wagner H, eds. *Pathology of Septic Shock*. Berlin: Springer-Verlag, 1996:39-81.
190. Rietschel ET, Brade L, Lindner B, Zähringer U. Biochemistry of lipopolysaccharides. In: Morrison DC, Rian JL, eds. *Bacterial Endotoxic lipopolysaccharides, Vol I: Molecular Biochemistry and Cellular Biology*. Boca Raton, FL: CRC Press, 1992:3-41.
191. Westphal O, Westphal U, Sommer T. The history of pirigen research. In: Sclessinger D, ed. *Microbiology*. Washington, DC: American Society of Microbiology, 1977:221-238.
192. Kikaido H, Vaara M. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. *Microbiol Rev* 1985; 49:1-32.
193. Zähringer U, Lindner B, Rietschel ET. Molecular structure of lipid A, the endotoxic center of bacterial lipopolysaccharides. *Adv Carbohydr Chem Biochem* 1994; 50:211-276.
194. Krauss JH, Seydel U, Wechessr J, Mayer H. Structural analysis of the nontoxic lipid A of *Rhodobacter capsulatus* 37b4. *Eur J Biochem* 1989; 180:519-526.
195. Loppnow H, Libby P, Freuderberg MA, Kraus JH, Weckesser J, Mayer H. Cytokine induction by lipopolysaccharide (LPS) corresponds to the lethak

- toxicity and is inhibited by nontoxic *Rhodobacter casulatus* LPS. Infect Immun 1990; 58:3743-3750
196. Ulmer AJ, Feist W, Kirikae T, Kirikae F, Kusumoto S, Kusama T, et al. Modulation of endotoxin-induced monokine release in human monocytes by lipid A partial structures inhibiting the binding of<sup>125</sup>I-LPS. Infect Immun 1992; 60:5145-5152.
  197. Kawahara K, Seydel U, Matsuura M, Danbara H, Rietschel ET, Zähriger U. Chemical structure of glycosphingolipids isolated from *Sphingomonas paucimobilis*. FEBS Lett 1991; 292:107-110.
  198. Yamamoto A, Yano I, Masui M, Yabuuchi E. Isolation of a novel sphingoglycolipid containing glucuronic acid and 2-hydroxy fatty acid from *Flavobacterium devorans* ATCC 10829, J Biochem 1978; 83:1213-1216.
  199. Aloia RC. Membrane Fluidity in Biology, Vol. I: Concept of Membrane Structure. New York: Academic Press. 1983.
  200. Cossins AR, Sinensky M. Adaptation of membranes to temperature, pressure, and exogenous lipids. In: Shinitzky M, ed. Physiology of Membrane Fluidity. Vol II Boca Raton, FL: CRC Press, 1984:1-20.
  201. Morrison DC, Rudbach JA. Endotoxin-cell-membrane interactions leading to transmembrane signaling. Contemp Top Immunol 1981; 8:187-218.
  202. Jackson SK, James PE, Rowlands CC, Mile B. Binding of endotoxin to macrophages: interactions of spinlabelled saccharide residues. Biochim Biophys Acta 1992; 1135:165-170.
  203. Portiles MT, Pagani R, Diaz-Laviada I, Municio AM. Effect of *Escherichia coli* lipopolysaccharide on the microviscosity of liver plasma membranes and hepatocytes suspensions and monolayers. Cell Biochem Funct 1987; 5:55-61.
  204. Jacobs DM. Fluorescent detection of lipopolysaccharide interactions with model membranes. Adv Exp Med Biol 1990; 25b:233-245.

205. Hailman E, Lichenstein HS, Wurfel MM, Miller DS, Johnson DA, Kelley M, et al. Lipopolysaccharide (LPS)-binding protein accelerates the binding of LPS to CD14. *J Exp Med* 1994; 179:269-277.
206. Gegner JA, Ulevith RJ, Tobias PS. Lipopolysaccharide (LPS) signal transduction and clearance. *J Biol Chem* 1995; 270:5320-5325.
207. Gallin EK, MCKinney LC. Monovalent ion transport and membrane potential changes during activation in phagocytic leukocytes. In: Grinstein S, Rotstein OD, eds. *Current Topics in Membranes and Transport*. New York: Academic Press, 1990:127-152.
208. Benz R, Schemid A, Hancock REW: Ion selectivity of gram-negative bacterial porins. *J Bacteriol* 1985; 162:722-727.
209. Mauro A, Blake M, Labarca P. Voltage gating of conductance in lipid bilayers induced by porin form outer membrane of *Neisseria gonorrhoeae*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85:1071-1075.
210. Wiese A, Schröder G, Brandenburg K, Hirsch A, Welte W, Seydel U. Influence of the lipid matrix on incorporation and function of LPS-free porin from *Paracoccus denitrificans*. *Biochim Biophys Acta* 1994; 1190:231-242.
211. Wiese A, Reiners JO, Brandenburg K, Kawahara K, Zähringer U, Seydel U. Planar asymmetric lipid bilayers and phospholipids on the other: membrane potential, porin function, and complement activation. *Biophys J* 1996; 70:321-329.
212. Hall JE, Latorre R. Nonactin-K<sup>+</sup> complex as a probe for membrane asymmetry. *Biophys J* 1976; 15:99-103.
213. Morrison RP, Belland RJ, Lyng K, Caldwell HD. Chlamydial disease pathogenesis. The 57-kD chlamydial hypersensitivity antigen is a stress response protein. *J Exp Med* 1989; 170:1271-1283.
214. Morrison RP, Lyng K, Caldwell HD. Chlamydial disease pathogenesis. Ocular hypersensitivity elicited by a genus-specific 57kD protein. *J Exp Med* 1989; 169:663-675.

215. Toye B, Laferriere C, Claman P, Jessamine P, Peeling R. Association between antibody to the chlamydial heat-shock protein and tubal infertility. *J Infect Dis* 1993; 168:1236-1240.
216. Claman P, Honey L, Peeling RW, Jessamine P, Toye B. The presence of serum antibody to the chlamydial heat shock protein (CHSP60) as a diagnostic test for tubal factor infertility. *Fertil Steril* 1997; 67:501-504.
217. Money DM, Hawes SE, Eschenbach DA, Peeling RW, Brunham R, Wölnner-Hanssen P, et al. Antibodies to the laparoscopically confirmed perihepatitis. *Am J Obstet Gynecol* 1997; 176:870-877.
218. Peeling RW, Kimani J, Plummer F, Maclean I, Cheang M, Bwayo J, et al. Antibody to *Chlamydial hsp60* predicts an increased risk for *chlamydial* pelvic inflammatory disease. *J Infect Dis* 1997; 175:1153-1158.
219. Saikku P, Mattila K, Nieminen MS, Mäkelä PH, Huttunen JK, Valtonen V. Serological evidence of an association of a novel *Chlamydia*, TWAR, with chronic coronary heart disease. *Lancet* 1988; 2:983-986.
220. Kuo C, Gown AM, Benditt EP, Grayton JT. Detection of *Chlamydia pneumoniae* in aortic lesions of atherosclerosis by immunocytochemical stain. *Arterioscler Thromb* 1993; 13:1501-1504.
221. Kuo C, Shor A, Campbell LA, Fukushi H, Patton DL, Grayton JT. Demonstration of *Chlamydia pneumoniae* in atherosclerotic of coronary arteries. *J Infect Dis* 1993; 167:841-849.
222. Jackson LA, Campbell LA, Kuo CC, Rodriguez DI, Lee A, Grayton JT. Isolation of *Chlamydia pneumoniae* from a carotid endarterectomy specimen. *J Infect Dis* 1997; 176:292-295.
223. Rietschel ET, Kirikae T, Schade FU, Mamat U, Schmidt G, Loppnow H, et al. Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function. *FASEB J* 1994; 8:217-225.
224. Stephens RS, Stary A, editor. Chlamydial genomic sequencing and manipulation. 1996; 7-10.

**FALTA  
PAGINA**

**111**

233. Gallay P, Heumann D, Le Roy D, Barras C, Glauser M-P. Mode of action of anti-lipoplysaccharide-binding protein antibodies for prevention of endotoxemic shock in mice. *Proc Natl Acad USA* 1994; 91:7922-7926.
234. Tobias PS, Soldau K, Ulevitch RJ. Isolation of a lipopolysaccharide-binding acute phase reactant from rabbit serum. *J Exp Med* 1986; 164: 777-793.
235. Hailman E, Albers JJ, Wolfbauer G, Tu A-y, Wright SD. Neutralization and transfer of lipopolysaccharide by phospholipid transport protein. *J Biol Chem* 1996; 271:12172-12178.
236. Elsbach P, Weiss J. Prospects for use of recombinant BPI in the treatment of gram-negative bacterial infection [review]. *Infect Agents Dis* 1995; 4:102-109.
237. Su GL, Freeswick PD, Geller DA, Wang Q, Shapiro RA, Wan Y-H, et al. Molecular cloning, characterization, and tissue distribution of rat lipopolysaccharide binding protein. *J Immunol* 1994; 153:743-752.
238. Ramadori G, Mayer zum Buschenfelde K-H, Tobias PS, Mathison JC, Ulevitch RJ. Biosynthesis of lipopolysaccharide binding protein in rabbit hepatocytes. *Pathobiol* 1990; 58:89-94.
239. Geller DA, Kispert PH, Su GL, Wang SC, di Silvio M, Tweardy DJ, et al. Induction of hepatocyte lipopolysaccharide binding protein in models of sepsis and the acute-phase response. *Arch Surg* 1993; 128:22-28.
240. Wong HR, Pitt BR, Su GL, Rossignol DP, Steve AR, Billiar TR, et al. Induction of lipopolysaccharide-binding protein gene expression in cultured rat pulmonary artery smooth muscle cells by interleukin 1 beta. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1995; 12:449-454.
241. Grube BJ, Cochane CG, Ye RD, Green CE, McPhail ME, Ulevitch RJ, et al. Lipopolysaccharide binding protein expression in primary human hepatocytes and HepG2 hepatoma cells. *J Biol Chem* 1994; 269:8477-8482.

242. Kirschning C, Ubehaun A, Lamping N, Pteil D, Herrmann F, Schumann RR. Control of transcriptional activation of the lipopolysaccharide binding protein (LBP) gene by proinflammatory cytokines. *Cytokines Cell Mol Ther* 1997; 3:59-62.
243. Abrahamson SL, Wu H-M, Williams RE, Der K, Ottah N, Little R, et al. Biochemical characterization of recombinant fusions of lipopolysaccharide binding protein and bactericidal/permeability-increasing protein. *J Biol Chem* 1997; 272:2149-2155.
244. Hailman E, Lichenstein HS, Wurfel MM, Miller DS, Johnos DA, Kelley M, et al. Lipopolysaccharide (LPS)-binding protein accelerates the binding of LPS to CD14. *J Exp Med* 1994; 179:269-277.
245. Han J, Mathison J, Ulevitch R, Tobias P. Lipopolysaccharide (LPS) binding protein, truncated at Ile-197, binds LPS but does not transfer LPS to CD14. *J Biol Chem* 1994; 269:8172-8175.
246. Theofan G, Horwitz A, Williams R, Liu P, Chan I, Birr C, et al. An amino-terminal fragment of human lipopolysaccharide-binding protein retains lipid A binding but not CD14-stimulatory activity. *J Immunol* 1994; 152:3623-3629.
247. Schromm AB, Brandenburg K, Rietschel ET, Flad HD, Carrol SF, Seydel U. Lipopolysaccharide-binding protein mediates CD14-independent intercalation of lipopolysaccharide into phospholipid membranes. *FEBS Lett* 1996; 399:267-271.
248. Battafaraono RJ, Dahlberg PS, Ratz CA, Johnston JW, Bray BH, Haseman JR, et al. Peptide derivatives of three distinct lipopolysaccharide binding proteins inhibit lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor- $\alpha$  secretion in vitro. *Surgery* 1995; 118:318-324.
249. Taylor AH, Heavner G, Nedelman M, Shemis D, Brunt E, Knight D, et al. Lipopolysaccharide (LPS) neutralizing peptides reveal a lipid A binding site of LPS binding protein. *J Biol Chem* 1995; 270:17934-17938.

250. Tobias PS, Mathison J, Mintz D, Lee J, Kravchenko V, Kato K, et al. Participation of lipopolysaccharide binding protein in lipopolysaccharide dependent macrophage activation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1992; 7:239-245.
251. Tobias PS, Soldau K, Gegner JA, Mintz D, Ulevitch RJ. Lipopolysaccharide with soluble CD14. *J Biol Chem* 1995; 270:10482-10488.
252. Wurfel MM, Hailman E, Wright SD. Soluble CD14 acts as a shuttle in the neutralization of lipopolysaccharide (LPS) by LPS-binding protein and reconstituted high density lipoprotein. *J Exp Med* 1995; 181:1743-1754.
253. Wurfel MM, Wright SD. Lipopolysaccharide-binding protein and soluble CD14 transfer lipopolysaccharide to phospholipid bilayers: preferential interaction with particular classes of lipid. *J Immunol* 1997; 158:3925-3934.
254. Tobias PS, Soldau K, Hatlen LE, Schumann RR, Einhorn G, Mathison JC, et al. Lipopolysaccharide Binding Protein. *J Cell Biochem* 1992; 16C:151.
255. Tapping RI, Tobias PS. Cellular binding of soluble CD14 requires lipopolysaccharide (LPS) and LPS-binding protein. *J Biol Chem* 1997; 272:23157-23264.
256. Wurfel MM, Kunitake ST, Lichenstein H, Kane JP, Wright SD. Lipopolysaccharide (LPS)-binding protein is carried on lipoproteins and acts a cofactor in the neutralization of LPS. *J Exp Med* 1994; 180:1025-1035.
257. Dear TN, Boehm T, Keverne EB, Rabbitts TH. Novel genes for potential ligand-binding in subregions of the alfactory mucosa. *EMBO J* 1991; 10:2813-2819.
258. Wright SD, Ramos RA, Patel M, Miller DS. Septin: A factor in plasma that opsonizes lipopolysaccharide-binding particles for recognition by CD14 on phagocytes. *J Exp Med* 1992; 176:719-727.

259. Gray PW, Flaggs G, Leong SR, Gumina RJ, Weiss J, Ooi CE, et al. Cloning of the cDNA of a human neutrophil bactericidal protein structural and functional correlations. *J Biol Chem* 1989; 264:9505-9509.
260. Esponda Vila R. *Anatomía Dental*. UNAM. México 1994; 383.
261. Moore W y Moore L (1994) The bacteria of periodontal diseases. *Periodontology* 2000. 5: 66-77.
262. Moughal NA, Adonogianaki E, Thornhill M y Kinane D (1992) Endothelial cell leukocyte adhesion molecule-1 (ELAM-1) and intracellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression in gingival tissue during health and experimentally induced gingivitis. *J. Periodont Res* 27: 623-630.
263. Weintraub A, Zahringer U, Wollenwever H, Seydel S y Rietschel E (1989) Structural characterization of the lipid A component of *Bacteroides fragilis* strain NCTC 9343 lipopolysaccharide. *Eur. J. Biochem.* 183: 425-431.
264. Kumada H, Haishima Y, Umemoto T y Tamamoto K (1995) Structural study on the free lipid A isolated from lipopolysaccharide of *Porphyromonas gingivalis*. *J. Bacteriol.* 177: 2098-2106
265. Kumada H, Kondo S, Umemoto T y Hisatsune K (1997) Chemical structure of the 2-keto-3-deoxyoctanate region of lipopolysaccharide isolated from *Porphyromonas gingivalis*. *FEMS. Microbiol Lett.* 108(1): 75-79.
266. Fujiwara T, Ogawa T, Sobue S, y Hamada S (1990) Chemical immunobiological and antigenic characterizations of lipopolysaccharides from *Bacteroides gingivalis* strains. *J. Gen. Microbiol.* 136: 319-326.
267. John B, Olsen I y Bryn K. (1983) Fatty acids and sugars in lipopolysaccharides from *Bacterioides intermedius*, *Bacteroides gingivalis* and *Bacteroides loescheii*. *Oral Microbiol Immunol* 3: 22-27.
268. Mashimo J, Michiko Y, Ikeuchi K y Hata S (1985) Fatty acid composition and Schwartzman activity of lipopolysaccharides from oral bacteria. *Microbiol Immunol* 29(5):395-403.

269. Mashimo J, Michiko Y, Ikeuchi K y Hata S. (1985) Fatty acid composition and Schwartzman activity of lipopolysaccharides from oral bacteria. *Microbiol Immunol* 29(5):395-403 Sugiyama A, Arakaki R, Ohnishi T, Arakaki N, Daiuhara Y y Takada H (1996) Lipoteichoic acid and Interleukin 1 stimulate synergistically production of hepatocyte growth factor (scatter factor) in human gingival fibroblasts in culture. *Infect Immun* 64: 1426-1431.
270. Morrison DC, Ryan JL. (1992) *Bacterial Endotoxic Lipopolysaccharides*. Vol I. Boca Raton CRC Press, New York, NY, USA, p 317.