



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

---

---



**FACULTAD DE ODONTOLOGÍA**

MECANISMOS MOLECULARES Y ESTRUCTURA DEL  
LIPOPOLISACÁRIDO.

**T E S I N A**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**C I R U J A N O   D E N T I S T A**

P R E S E N T A:

JOSÉ GUSTAVO CADENA GONZÁLEZ

TUTOR: Dra. GLORIA GUTIÉRREZ VENEGAS



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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



## AGRADECIMIENTOS

La obtención de un grado universitario es la culminación de un largo proceso de aprendizaje, en el cual la obtención de conocimientos es sólo una parte del resultado final. El éxito de este objetivo tiene un doble significado: Por un lado es un logro individual para el graduado, pero también representa un logro colectivo de todas aquellas personas que de una u otra forma colaboraron en su consecución. En este contexto quiero agradecer a todos aquellos que compartieron conmigo este largo camino.

A mi amada familia Norma Angélica y Rodrigo Rafael.  
Gracias por su amor y comprensión. Ustedes son el motor de mi vida y la razón por la cual han valido la pena los sacrificios. Todo esto es por y para ustedes.

A mis padres Martha Idalia y José Julio, y a mi hermano José Francisco.

Gracias por su cariño y ejemplo. Por inculcarme valores como la responsabilidad, la honestidad y el respeto; por creer en mí y apoyar siempre mis proyectos; por impulsarme hacia adelante; y por darme una niñez maravillosa. Sin su respaldo no hubiera sido posible lograrlo.

A la Dra. Gloria Gutiérrez Venegas

La culminación de mi formación hubiera sido incompleta sin su guía y consejos. Gracias por ser mi tutora; por su valioso tiempo dedicado a este proyecto, así como por la confianza y entera libertad que me concedió para elaborarlo.

A la UNAM.

Por la oportunidad que me brindó al recibirme como parte de su comunidad y darme una formación profesional. Es un orgullo y un privilegio formar parte de esta gran institución.

A todos aquellos que en algún momento tuvieron la disposición de ayudarme, muchas veces a costa de sus propios compromisos, como mis pacientes Rocío de la Torre y mi tío Pedro Sánchez. Así mismo, a mis amigos y compañeros de la Facultad de Odontología y la Clínica Periférica Oriente, quienes compartieron conmigo los buenos y malos momentos a lo largo de la carrera.



## DEDICATORIA

**A mi hijo Rodrigo Rafael**

Todo lo que sueñes está a tu alcance

**A mi esposa Norma Angélica**

Por tu ayuda incondicional

**A mis abuelos Luz María y José Rafael**

Sé que estarían orgullosos

**A mis padres Martha Idalia y José Julio**

Una satisfacción que les debía



**ΓΝΩΘΙ ΣΑΥΤΟΝ** («*Conócete a ti mismo*»)  
Grabado en oro en el pórtico del Templo de Apolo en Delfos.



## ÍNDICE

<b>1. RESUMEN.....</b>	<b>8</b>
<b>2. ABREVIATURAS.....</b>	<b>9</b>
<b>3. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>12</b>
<b>4. INMUNIDAD.....</b>	<b>15</b>
4.1. Tipos de inmunidad.....	15
4.2. Inmunidad innata.....	19
4.2.1. Defensa de superficie.....	20
4.2.2. Factores humorales.....	20
4.2.3. Fagocitosis.....	22
4.2.4. Respuesta inflamatoria.....	23
4.2.5. Interferones.....	24
4.2.6. Acción de células natural killer (NK).....	24
4.3. Inmunidad adquirida.....	25
4.3.1. Características.....	25
4.3.2. Fases de la inmunidad adquirida.....	26
4.3.2.1. Reconocimiento.....	26
4.3.2.2. Activación.....	27
4.3.2.3. Fase efectora.....	27
4.4. Enfermedad periodontal y respuesta inflamatoria.....	28
4.5. Activación de la inmunidad innata en el periodonto y papel de las estructuras moleculares de periodontopatógenos en la inducción de la enfermedad periodontal.....	30
4.5.1. Efectos sobre células residentes.....	31
4.5.2. Efectos sobre células no residentes.....	33
4.5.3. Fases de la enfermedad periodontal	33
<b>5. RECEPTORES CELULARES.....</b>	<b>36</b>
5.1. Reconocimiento de lo no propio infeccioso.....	36
5.2. Receptores de reconocimiento de patrones.....	39
5.2.1. Receptores tipo NOD (NLR).....	40
5.2.2. Receptores helicinas tipo RIG (RLH).....	40
5.2.3. Receptores lectina tipo C (CLR).....	40
5.3. Receptores Toll.....	43
5.3.1. Estructura.....	43
5.3.2. Clasificación.....	46
5.3.3. Ligandos de receptores Toll.....	46
5.3.4. Expresión de TLRs.....	47
<b>6. PATRONES MOLECULARES ASOCIADOS A PATÓGENOS.....</b>	<b>49</b>
6.1. Definición.....	49
6.2. Principales PAMPs.....	49



<b>7. LIPOPOLISACÁRIDO.....</b>	<b>51</b>
7.1. Perspectiva histórica.....	51
7.2. Estructura.....	67
7.2.1. Lípido A.....	67
7.2.2. Núcleo (Core).....	68
7.2.3. Cadena-O específica.....	69
7.2.4. Morfología.....	70
7.3. Acción endotóxica.....	72
7.3.1. Reconocimiento.....	73
7.3.2. Vías de transducción.....	74
7.3.3. Regulación negativa de la señalización.....	79
<b>8. CONCLUSIONES.....</b>	<b>82</b>
<b>9. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>83</b>



## ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

<b>Fig. 1.-</b> Interacciones entre la inmunidad innata y adquirida.....	<b>18</b>
<b>Fig. 2.-</b> Células y mediadores solubles.....	<b>22</b>
<b>Fig. 3.-</b> Activación celular por PAMP y efecto en el periodonto.....	<b>35</b>
<b>Fig. 4.-</b> Estructura del dominio extracelular de TLR4.....	<b>45</b>
<b>Fig. 5.-</b> François Magendie.....	<b>52</b>
<b>Fig. 6.-</b> Jacob Henle.....	<b>56</b>
<b>Fig. 7.-</b> Robert Koch y Richard Pfeiffer.....	<b>60</b>
<b>Fig. 8.-</b> Otto Westphal.....	<b>66</b>
<b>Fig. 9.-</b> Otto Lüderitz.....	<b>66</b>
<b>Fig. 10.-</b> Estructura y variabilidad del Lipopolisacárido .....	<b>71</b>
<b>Fig. 11.-</b> Vías de transducción.....	<b>77</b>
<b>Fig. 12.-</b> Reguladores de señalización LPS/TLR4.....	<b>81</b>
<b>Tabla 1.-</b> Características de la respuesta inmune Innata y adquirida.....	<b>16</b>
<b>Tabla 2.-</b> Receptores PRR y sus ligandos.....	<b>42</b>





## 1.- RESUMEN

Para protegerse de la multitud de agentes infecciosos presentes en el medio ambiente externo los organismos metazoarios, desde plantas, peces, insectos, hasta organismos más complejos como los mamíferos, han debido desarrollar un sistema de defensa capaz de reconocer y hacer frente a la amenaza constante de una invasión. La inmunidad innata es el mecanismo evolutivo filogenéticamente más antiguo en desarrollarse y, en algunos casos, el único recurso de algunos organismos para conservar su integridad. El Lipopolisacárido (LPS), una poderosa endotoxina componente de la membrana externa de las bacterias gram-negativas, juega un papel fundamental en el reconocimiento de estos microorganismos, y la subsecuente contención de una invasión masiva, a través de su papel de patrón molecular asociado a patógenos (PAMP); estructuras altamente conservadas que no se encuentran en el organismo hospedero y son detectadas por medio de receptores celulares de patrones (PRR), específicamente por los receptores tipo Toll (TLR4) en las células de la inmunidad innata, tales como macrófagos, células dendríticas, neutrófilos. Lo que conduce a una cascada de señalización intracelular y eventualmente a la liberación de mediadores químicos (quimiocinas, citocinas, Interferones) que se traduce en el establecimiento de la respuesta inmune innata como una primera línea de defensa y puente para la segunda respuesta inmune a cargo de la inmunidad adquirida.

**Palabras clave:** Lipopolisacárido, Receptores Toll, Inmunidad innata, PAMPs, PRR.



## 2.- ABREVIATURAS

- LPS** = Lipopolisacárido  
**PAMP** = Patrón molecular asociado a patógeno  
**PRR** = Receptores de reconocimiento de patrones  
**TLR** = Receptores tipo Toll  
**DC** = Célula dendrítica  
**IFN** = Interferón  
**NK** = Natural Killer  
**MBL** = Proteína lectina fijadora de manosa  
**CRP** = Proteína C reactiva  
**CAM** = Complejo de ataque a la membrana  
**PMN** = Leucocito polimorfonuclear  
**TNF** = Factor de necrosis tumoral  
**IL** = Interleucina  
**RNA** = Ácido ribonucleico  
**ADN** = Ácido desoxirribonucleico  
**CMH** = Complejo mayor de histocompatibilidad  
**CPA** = Célula presentadora de antígeno  
**TCR** = Receptores de célula T  
**CD** = Grupo de diferenciación  
**PG** = Prostaglandina  
**GCF** = Líquido crevicular gingival  
**MMP** = Metaloproteinasas de matriz  
**NO** = Óxido nítrico  
**ICAM** = Molécula de adhesión intracelular  
**VCAM** = Molécula de adhesión vascular  
**MCP** = Proteína quimiotáctica de monocitos  
**MIP** = Proteína inflamatoria de macrófagos  
**TGN** = Factor de crecimiento transformador  
**LT** = Leucotrienos



- TIMP** = Inhibidor tisular de MMP
- LB** = Linfocitos B
- Ag** = Antígeno
- BCR** = Receptor de células B
- LTh** = Linfocito T colaborador
- NOD** = Dominios de oligomerización para unión a nucleótidos
- HSP** = Proteína de choque térmico
- DAMP** = Patrón molecular asociado a daño
- NLR** = Receptores tipo NOD
- PGN** = Peptidoglicano
- NAIP** = Proteína neuronal inhibidora de apoptosis
- MDP** = Muralmilpéptido
- RLH** = Receptor helicasa tipo RIG
- RIG** = Proteína citoplásmica inducible por ácido retinoico
- CARD** = Dominio de reclutamiento y activación de caspasa
- NF-κB** = Factor de transcripción nuclear
- LRR** = Repeticiones ricas en leucina
- TIR** = Como Toll/IL-1R-
- BLP** = Lipopéptido bacterial
- dsRNA** = RNA viral de doble cadena
- LTA** = Ácido lipoteicoico
- CpG** = Deoxicitidilato-fosfato-deoxiguanilato no metilado
- KDO** = Ácido 2-keto-3-deoxioctanoico
- GlcN2N** = Disacárido de glucosamina
- 3-OH-C14** = 3-Hidroximiristato
- GlcN3N** = Trisacárido de glucosamina
- pEtN** = Fosfoetanolamina
- Glc** = Glucosa
- Gal** = Galactosa
- GlcNAc** = N-acetilglucosamina
- MD-2** = Molécula de asociación LPS/TLR4



- MyD88** = Factor de diferenciación mieloide-88  
**IRAK** = Receptor quinasa asociado a IL-1  
**TRAF6** = Receptor factor 6 asociado a TNF  
**MAPK** = Proteína quinasa activada por mitógeno  
**LBP** = Proteína de unión al LPS  
**TIRAP** = Proteína adaptadora del dominio TIR  
**TRIF** = Proteína adaptadora asociada al dominio TIR inductor de IFN- $\beta$   
**TRAM** = Molécula adaptadora relacionada con TRIF  
**SARM** = Proteína inhibidora de la señal TRIF  
**DD** = Dominio de muerte  
**UBC13** = Enzima conjugadora ubiquitina 13  
**UEV1A** = Enzima conjugadora ubiquitina E2 variante 1 isoforma A  
**TAK** = Factor de crecimiento transformante  $\beta$   
**IKK** = Quinasa I $\kappa$ B  
**IRF5** = Factor de regulación IFN  
**RHIM** = Motivo de interacción homotípica RIP  
**RIP** = Receptor interactivo de proteína  
**TANK** = Familia de miembros asociados a TRAF activadora de NF- $\kappa$ B  
**ppG** = Pequeñas proteínas G  
**JNK** = Factor de transcripción c-Jun  
**PLA<sub>2</sub>C** = Fosfolipasa A<sub>2</sub> citosólica  
**ERK** = Quinasa regulada por señales extracelulares  
**PK** = Proteínquinasa  
**TBK1** = Kinasa 1 ligada a TANK  
**SIGIRR** = Molécula relacionada con inmunoglobulina 1  
**TRIAD3A** = Proteína 3 con dominio triada variante A  
**SOCS-1** = Supresor de señal 1 citocina



### 3.- INTRODUCCIÓN

Los organismos multicelulares, entre ellos los vertebrados, están constantemente amenazados ante una invasión de microorganismos y tuvieron que desarrollar sistemas de defensa para contener y eliminar patógenos infecciosos en su interior. El sistema inmune de los mamíferos comprende dos ramas: la inmunidad innata y la inmunidad adquirida. La inmunidad innata es la primera línea de defensa contra los agentes invasores mientras que la inmunidad adquirida está involucrada en la eliminación de patógenos en la fase tardía de la infección, así como también en la generación de la memoria inmunológica.<sup>1</sup> La inmunidad adaptativa tiene la habilidad de reconocer un amplio espectro de antígenos a través de una serie de receptores somáticamente reordenados (receptores de células T y B). Esta respuesta inmune altamente específica se encuentra ausente en los organismos invertebrados que únicamente son protegidos por los mecanismos de la inmunidad innata.<sup>2</sup>

La respuesta de la inmunidad innata es activada unos minutos después de la invasión y es responsable de la defensa durante las horas y días iniciales de la infección, mientras que la inmunidad adquirida requiere al menos de 7 a 10 días antes de establecer una respuesta adecuada. Aunque los componentes del sistema inmune innato, celulares (monocitos, neutrófilos, células natural killer) y humorales (sistema de complemento, lisozimas) son muy eficaces contra la inmensa mayoría de las infecciones, por largo tiempo se creyó que era un sistema inespecífico de inmunidad. El dogma de la naturaleza inespecífica de la respuesta inmune innata ha cambiado recientemente con el descubrimiento de una nueva clase de receptores, los receptores tipo Toll (TLRs), que han probado ser cruciales en el reconocimiento de microorganismos por la inmunidad innata y ser un puente entre la respuesta inmune innata y adquirida.<sup>3</sup>



El primer miembro de la familia Toll fue descubierto como uno de los 12 genes efectores maternos con función en la ruta requerida para la formación axial dorso ventral de los embriones de la mosca de la fruta, *Drosophila melanogaster*,<sup>4</sup> Adicionalmente, se observó que la ausencia congénita de esta proteína en embriones deficientes conducía a una severa incapacidad para defenderse contra infecciones micóticas y de bacterias gram-positivas. Los datos iniciales sugerían que Toll era un importante componente de defensa ante microorganismos, estableciendo su papel principal en el mecanismo de reconocimiento del sistema inmune de estos insectos.<sup>3</sup> Subsecuentemente, fueron descubiertas proteínas homólogas a Toll en humanos, siendo nombradas por su analogía con las con halladas en *Drosophila melanogaster*, receptores similares a Toll (Toll-like receptors). A la fecha, al menos trece miembros de la familia TLR han sido identificados y caracterizados en el sistema inmune de mamíferos. TLR1 a TLR9 están conservados en humanos y ratones. TLR10 se expresa en humanos, mientras TLR11 a TLR13 se encuentran presentes en ratones.<sup>5</sup>

El reconocimiento de la inmunidad innata se basa en la detección de “firmas” moleculares invariables que son únicas de los microorganismos. Esto involucra a un número limitado de receptores de reconocimiento de patrones (PRR) que reconocen moléculas conservadas, denominadas patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP). Su naturaleza química puede ser muy diversa: ácidos nucleicos, proteínas, péptidos o lípidos. Sin embargo, comparten tres criterios: Tienen un núcleo estructural invariable entre los diversos grupos, son productos de vías únicas de los microorganismos y, son esenciales para la supervivencia de los mismos, por lo que son motivos altamente conservados y difícilmente podrían alterarse.<sup>6</sup> El Lipopolisacárido (LPS), estructura molecular componente de los microorganismos gram-negativos, forma parte de



estos patrones moleculares. El objetivo del presente trabajo es hacer una revisión de la literatura acerca de la importancia del lipopolisacárido en la activación del sistema inmune, abarcando su contexto histórico, funciones y estructura química.



## 4.- INMUNIDAD

### **4.1. TIPOS DE INMUNIDAD**

El sistema inmune en vertebrados comprende la inmunidad innata y la inmunidad adquirida, mecanismos que interactúan entre sí para proteger al huésped ante las agresiones de infecciones microbianas. La inmunidad adquirida se caracteriza por su especificidad y memoria, siendo los linfocitos T y B las células efectoras de este mecanismo. Cada linfocito expresa un receptor de superficie celular con singularidad única, el cual es generado por recombinación somática durante la maduración. Este proceso sin embargo, toma varios días en completarse desde su inicio.

La inmunidad innata se considera la primera línea de defensa del huésped ante el crecimiento y propagación bacterianos en la fase temprana de la infección. Los principales actores en este proceso son fagocitos como macrófagos, neutrófilos y células dendríticas.<sup>7</sup>

Las principales diferencias entre ambas respuestas son los mecanismos y los tipos de receptores usados para el reconocimiento antigénico. En la inmunidad adquirida, los receptores reconocen a los microorganismos infecciosos e identifican antígenos propios y del medio. Esto es dañino para el hospedero, ya que la activación del sistema inmune por tales antígenos puede conducir a enfermedades autoinmunes y alergias. En cambio, en la inmunidad innata, los receptores reconocen estructuras altamente conservadas presentes en un gran grupo de microorganismos. Estas estructuras son designadas patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) y los receptores involucrados en identificarlas son llamados receptores para reconocimiento de patrones. (Tabla 1)



**Tabla 1.** Características de la respuesta inmune innata y adquirida.

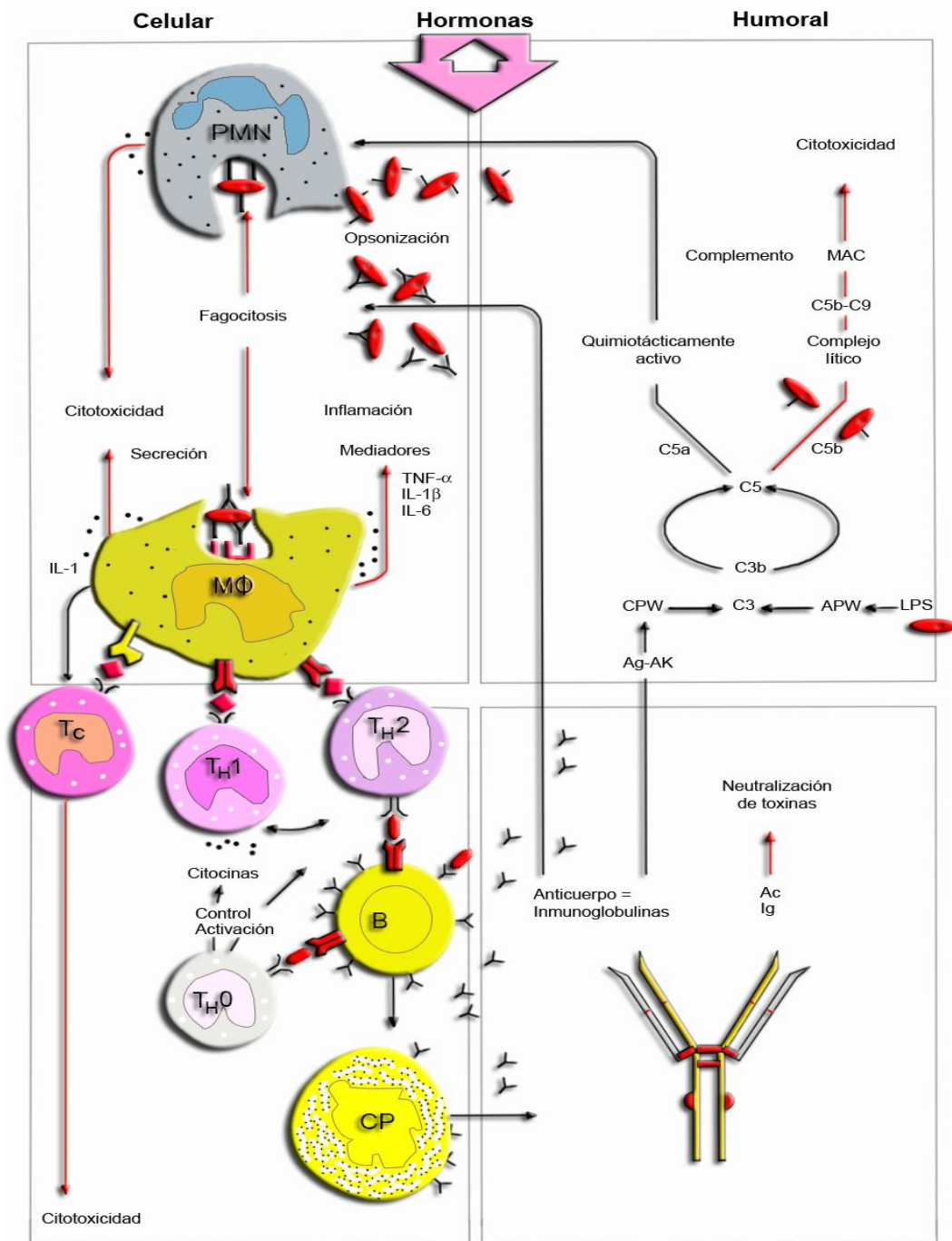
<b>INMUNIDAD INNATA</b>	<b>INMUNIDAD ADQUIRIDA</b>
Primera línea de defensa	Segunda línea de defensa
<b>Innata:</b> se nace con las células y moléculas que la identifican	<b>Adquirida:</b> aunque se nace con el repertorio de células capaces de responder al antígeno, éstas no alcanzan un número suficientemente elevado hasta que no se enfrentan al antígeno.
<b>Inespecífica:</b> los receptores que reconocen a muchas de las moléculas están sobre una misma célula.	<b>Específica:</b> cada célula posee sólo receptores que reconocen a uno y sólo un antígeno concreto.
<b>Independiente de antígeno:</b> las células y moléculas están preparadas para la defensa desde antes de enfrentarse con el agente patógeno.	<b>Dependiente de antígeno:</b> los linfocitos con un receptor concreto proliferan cuando su receptor reacciona con el antígeno, adquiriendo sólo entonces funciones efectoras
<b>Inespecífica de antígeno:</b> no discierne entre agentes próximos o incluso alejados	<b>Específica de antígeno:</b> ante la llegada del antígeno sólo proliferan los linfocitos que poseen el receptor específico para el mismo
<b>Respuesta máxima inmediata:</b> como los elementos y mecanismos están siempre presentes, se ponen en marcha de forma inmediata	<b>Respuesta máxima retardada o con fase de latencia:</b> los efectos de esta inmunidad no se notan hasta que las células no han proliferado hasta alcanzar un número elevado que garantice su éxito
<b>Sin memoria inmunológica:</b> la respuesta es similar independientemente del número de veces que se haya respondido a un agente concreto previamente	<b>Con memoria inmunológica:</b> la respuesta es por lo general muy superior (en rapidez e intensidad) en exposiciones sucesivas al mismo antígeno

Fuente: Collado V., *et ál.* El sistema inmune innato I: Sus mecanismos. 2008.

Ambas respuestas inmunes son reguladas en gran parte por un grupo de proteínas llamadas interleucinas o citocinas. Las citocinas son proteínas solubles de bajo peso molecular mediadoras de crecimiento celular, inflamación, inmunidad, diferenciación, reparación, entre otras actividades. Además de las células del sistema inmune, las citocinas son producidas por diferentes tipos celulares durante la activación de la



inmunidad innata y adquirida. Son el principal medio de comunicación intracelular ante una invasión microbiana. Las citocinas sirven para iniciar la respuesta inflamatoria, y para definir la magnitud y naturaleza de la respuesta inmune específica.<sup>8</sup> (Fig 1)



**Fig.1. Interacciones entre la inmunidad innata y adquirida.** Los granulocitos PMN constituyen la primera línea de defensa en el epitelio de unión y el surco. Al desintegrarse liberan enzimas lisosómicas y radicales tóxicos. El Sistema de complemento se activa inicialmente por la vía alterna (independiente de anticuerpos), y posteriormente por la vía clásica dependiente de anticuerpos. Los macrófagos participan de la fagocitosis y liberan citocinas, mediadores inflamatorios y enzimas. Así mismo, presentan antígenos a los linfocitosT; (T<sub>H</sub>) auxiliares, con efecto regulador y/o activador, (T<sub>C</sub>) citotóxicos y de memoria de ambos tipos. Los linfocitos B, al contactar con antígenos y al ser activados por T<sub>H</sub>, se diferencian en células plasmáticas secretoras de inmunoglobulinas (anticuerpos), que se ligan específicamente a aquellos antígenos por los cuales han sido inducidas. Tienen acción opsonizante, neutralizadora de toxinas y activadora. Fuente: Modificado de Wolf H., *et ál.* Periodoncia. 2005.



## **4.2. INMUNIDAD INNATA**

La inmunidad innata, conocida por los trabajos de Elie Metchnikoff, actúa siempre de igual forma. Este inmunólogo ruso descubrió que muchos microorganismos podían ser ingeridos y digeridos por células fagocíticas, a las que llamó macrófagos, las cuales actúan siempre sin variaciones ante cualquier microorganismo, en contraste con los anticuerpos que solo responden ante sustancias específicas que generan su producción.<sup>9</sup> El objetivo de la inmunidad innata es evitar la instalación del proceso infeccioso; si este se produce, dicho mecanismo inmunitario logra establecer un ambiente para que se desarrolle una respuesta adaptativa.<sup>10</sup> Se caracteriza por ser de respuesta rápida, actúa directamente sobre el patógeno sin necesidad de selección o maduración celular, no tiene memoria.<sup>11,13</sup> Inicialmente se consideró a la fagocitosis, digestión de patógenos y presentación de antígenos derivados de patógenos a linfocitos T, como la función principal de las células integrantes de la inmunidad innata. Este mecanismo de respuesta fue llamado respuesta inmune no específica. Sin embargo, la identificación de receptores tipo Toll (Toll-like) (TLRs) ha cambiado esta idea, revelando que la inmunidad innata es capaz de reconocer patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), mediante los TLRs expresados en la superficie de las células componentes de este mecanismo de defensa.<sup>7,13</sup>

La respuesta inmune innata contra patógenos inicia con el reconocimiento de estructuras específicas de los patógenos invasores llamadas patrones moleculares asociados a patógenos, por un número limitado de receptores reconocedores de patrones (PRRs) expresados en los macrófagos y células dendríticas (DCs). El reconocimiento de PAMPs por PRRs dispara una vía de señalización intracelular que culmina en la inducción de citocinas, quimiocinas, interferón tipo I (IFN- $\alpha$  o  $-\beta$ ) proinflamatorios y maduración de DCs que conducen a la activación de la inmunidad adaptativa.<sup>12</sup>



Forman parte de la inmunidad innata:

- Defensa de superficie
- Factores humorales
- Fagocitosis
- Respuesta inflamatoria
- Acción de interferones
- Acción de las células Natural Killer (NK)

#### **4.2.1. DEFENSA DE SUPERFICIE**

Para que un agente biológico produzca infección, debe atravesar primeramente una importante barrera defensiva superficial, conformada por la piel y las mucosas. Además de funcionar como barrera física, la superficie epitelial produce sustancias químicas que son microbicidas e inhiben el crecimiento microbiano como la lisozima (enzima catiónica presente en las lágrimas, saliva, secreciones nasales y conjuntivales, leche materna, moco cervical e intestinal, etc), que reduce la concentración local de agentes patógenos susceptibles al atacar los mucopéptidos de sus paredes celulares, especialmente en bacterias gram-positivas.

Muchas superficies corporales expuestas al medio externo son colonizadas por microorganismos no patógenos o débilmente patógenos, que constituyen la flora normal, los cuales “compiten” con los agresores por los sitios de fijación y los nutrientes. La descamación de la piel y otras formas de recambio celular en las superficies corporales, remueven un sinnúmero de microorganismos adheridos.

#### **4.2.2. FACTORES HUMORALES**

En los vertebrados, las formas de defensa de aparición más temprana en la evolución son los factores humorales inespecíficos. Entre tales sustancias se destaca el sistema de complemento,<sup>9</sup> integrado por unas 30 proteínas que interaccionan entre sí de modo regulado dando lugar



a una cascada enzimática, la cual estimula las respuestas defensivas del organismo. Para que se produzca la cascada enzimática se precisa su activación, que se puede realizar por tres vías o rutas diferentes:

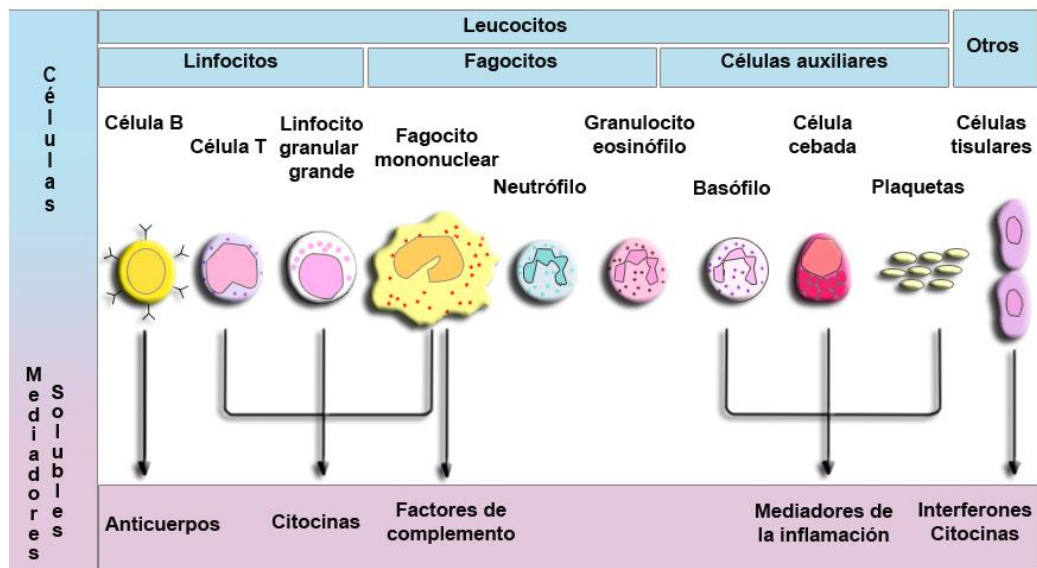
- La vía alternativa: corresponde a la inmunidad innata y se inicia interaccionando directamente con la superficie del microorganismo.
- La vía de las lectinas: también de la inmunidad innata, es una variante de la ruta clásica, pero su inicio no requiere la presencia de anticuerpos. Se activa por la unión de la proteína lectina fijadora de manosa (MBL) a moléculas de manosa en la superficie de los microorganismos.
- La vía clásica: se inicia fundamentalmente por la interacción con inmunocomplejos y, por lo tanto, corresponde a la inmunidad adaptativa. También se puede activar por la proteína C reactiva (CRP).

Cualquiera de estas tres vías de activación del sistema de complemento reconoce la llegada de un material extraño, hecho que provoca el reclutamiento secuencial de los distintos componentes y el ensamblaje, sobre la superficie del microorganismo, del denominado complejo de ataque a la membrana (CAM). Este complejo forma un canal totalmente permeable a iones y agua, provocando la lisis del microorganismo.

Durante la activación se generan y liberan una serie de proteínas que tienen actividades accesorias en la defensa contra las infecciones. Por ejemplo, C4a, C3a y C5a funcionan como **anafilotoxinas**, es decir, activan a los basófilos y mastocitos para liberar el contenido de sus gránulos. Las moléculas contenidas en estos gránulos inducen incremento de la permeabilidad vascular y contracción de las células del músculo liso, lo que puede conducir a la anafilaxia.

Otros componentes de la cascada del complemento (C5a y C5b67) son dos factores **quimiotácticos**, que atraen a otros componentes inmunes

hacia el foco donde se ha activado el complemento, merced a un gradiente de concentración reconocido por células distantes que recorren el organismo hasta donde comenzó el proceso. C5a también es un activador potente de neutrófilos, basófilos y macrófagos y produce inducción de moléculas de adhesión sobre células endoteliales vasculares. Cuando las células fagocíticas reconocen a las moléculas del complemento que funcionan como **opsoninas**, C3b y C4b, que , depositadas sobre la superficie del agente extraño, facilitan la fagocitosis del mismo por estas células.<sup>13</sup> (Fig.2)



**Fig. 2. Células y mediadores solubles.** La inmunidad comprende mecanismos que se complementan entre sí. Cada célula sintetiza un espectro determinado de mediadores solubles, y/o activa otros, como el sistema de complemento. Fuente: Modificado de Wolf H., *et ál.* Periodoncia. 2005.

### 4.2.3. FAGOCITOSIS

La fagocitosis es llevada a cabo por células especializadas, denominadas fagocitos: leucocitos polimorfonucleares (PMN), monocitos circulantes y macrófagos fijos en los tejidos, capacitados para ingerir partículas opsonizadas con anticuerpos o componentes del complemento, además de poder identificar e ingerir microorganismos directamente; todo lo cual logran por poseer receptores en la superficie



de sus membranas, que reconocen al fragmento Fc de las inmunoglobulinas, a componentes comunes de numerosos patógenos y a componentes activados del complemento.

Cuando el agente atraviesa la barrera epitelial, se produce inmediatamente una reorganización de fagocitos, con tres consecuencias:

- 1.Reconocimiento, ingestión y destrucción del patógeno por los macrófagos, así como migración de PMN hacia el área (este proceso suele ser suficiente para prevenir la infección que comienza). Los microorganismos pueden protegerse de la acción de los fagocitos evadiéndolos, como lo hacen los de vida extracelular al recubrirse de polisacáridos capsulares que dificultan su identificación, o logrando sobrevivir dentro del fagosoma.
- 2.La secreción de citocinas.
- 3.Los macrófagos devienen células presentadoras del antígeno (CPA), mediante la concentración y el procesamiento de los antígenos extraños, unidos a los propios (clase I ó II) del complejo mayor de histocompatibilidad, estimulando de esta forma a los linfocitos.<sup>9</sup>

#### **4.2.4. RESPUESTA INFLAMATORIA**

La activación de los fagocitos también provoca la secreción de citocinas proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ) y las interleucinas IL-1, IL-6 e IL-8, que inducen la adhesión de neutrófilos y monocitos al endotelio vascular en el sitio de la infección, seguida por la migración, acumulación local y activación de las células inflamatorias que eliminan las bacterias.<sup>10</sup> Los fagocitos liberan otras proteínas con potente efecto local, tales como la enzima activadora de plasminógeno y fosfolipasa prostaglandina, radicales de oxígeno, peróxidos, ácido nítrico, leucotrieno y factor activador de plaquetas.





Además de estos productos liberados por los fagocitos, la activación del complemento por los agentes infecciosos contribuye a la inflamación mediante el C5a, el C3a y en menor cuantía el C4a. C5a es capaz de activar a los mastocitos y liberar sus gránulos, que contienen sustancias vasoactivas (histamina, serotonina, bradiquinina) y pueden modificar el endotelio vascular en el lugar de la infección. Los efectos locales de todos estos mediadores da como resultado la respuesta inflamatoria, que se caracteriza por los signos clínicos de dolor, calor, enrojecimiento y aumento de volumen.

#### **4.2.5. INTERFERONES**

La infección viral de las células promueve la producción de proteínas llamadas interferones (IFNs), capaces de interferir la replicación de los virus. Son de tres tipos: alfa, beta y gamma; los IFNs alfa y beta son elaborados por células infectadas y protegen a las sanas de las tres formas siguientes:

1. Ofrecen resistencia a la replicación viral por activación de los genes que destruyen el RNA de doble cadena de los virus e inhiben su traslación.
2. Inducen la expresión de los antígenos clase I del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH-I), lo cual incrementa la posibilidad de la célula infectada del hospedero para presentar los péptidos virales y que éstos sean reconocidos por los linfocitos T CD8.
3. Activan las células NK, las cuales destruyen a las infectadas por virus de forma selectiva.

#### **4.2.6. ACCIÓN DE CÉLULAS NATURAL KILLER (NK)**

Estas células actúan en etapas tempranas del proceso infeccioso causado por patógenos intracelulares como virus del herpes, *Listeria monocytogenes*, y ejercen su acción citotóxica o destructiva sobre células infectadas y tumorales.<sup>9</sup> Las bacterias intracelulares inducen la



activación de las células NK, ya sea directamente o mediante la producción de citocinas (especialmente IL-12) derivadas de macrófagos. Las células NK activadas secretan IFN- $\gamma$ , que es a su vez un potente activador de los macrófagos, mejorando su capacidad fagocítica y microbicida.

### **4.3. INMUNIDAD ADQUIRIDA**

Cuando un microorganismo logra evadir los mecanismos de la respuesta inmune innata y en el individuo se acumula una cantidad de antígeno mayor a un umbral determinado, se activarán los mecanismos de la inmunidad adaptativa. Dicho proceso provocará la activación de las células con alta especificidad por el microorganismo en cuestión, y de mecanismos efectores específicos contra el agente patógeno. Esta respuesta demora varios días en activarse y está mediada por linfocitos T y B específicos para el microorganismo, que se activan y proliferan induciendo mecanismos efectores que eliminan el agente infeccioso y generan memoria inmunológica.<sup>10</sup>

#### **4.3.1. CARACTERÍSTICAS**

Sus características, a diferencia de la inmunidad innata son:

- Especificidad: Debido a que este tipo de respuesta va dirigida específicamente a determinada molécula antigénica, la porción del antígeno que es reconocida por los linfocitos se denomina determinante antigénica o epítope. Esta fina especificidad existe porque los linfocitos contienen receptores de membranas capaces de identificar y distinguir sutiles diferencias entre diversos antígenos. Se plantea que todos los individuos tienen numerosos clones (conjunto de células derivadas de un precursor simple), cuya progenie cuenta con los receptores de superficie de célula que les dio origen y pueden responder a determinantes antigénicos específicos para ellas.



Así, el desarrollo de clones antígeno-específicos ocurre previo o independiente a la exposición del antígeno, el cual selecciona un clon específico preexistente y lo activa hasta provocar su proliferación y diferenciación.

- Memoria: Se refiere al incremento en la intensidad de respuesta ante los subsiguientes contactos con el mismo antígeno.
- Heterogeneidad o diversidad: El número total de linfocitos con diferentes especificidades en un individuo ha recibido el nombre de repertorio linfocítico.
- Multifactorialidad: La respuesta inmune depende de múltiples factores, tanto del agente biológico que la origina como del hospedero que responde. Así, por ejemplo, el tipo, la virulencia, la cantidad o la dosis del agente agresor y su vía de penetración pueden generar varios tipos de respuestas; pero también la edad y conformación genética del hospedero pueden ser elementos determinantes.

### **4.3.2. FASES DE LA INMUNIDAD ADQUIRIDA**

La respuesta inmune adaptativa se desarrolla mediante dos mecanismos fundamentales: respuesta inmune humoral, donde los linfocitos B juegan un papel preponderante; y respuesta inmune celular, donde los linfocitos T son las células fundamentales.<sup>9</sup>

El antígeno es capturado en el tejido por DCs que se activan y se transforman en células presentadoras de antígeno (CPA) profesionales y lo llevan hacia los nódulos linfáticos regionales.<sup>10</sup>

En los nódulos linfáticos se desencadenan las siguientes fases:

#### **4.3.2.1. RECONOCIMIENTO**

Consiste en la unión del antígeno extraño a los receptores específicos existentes en la membrana de los linfocitos maduros. Los linfocitos B que median la inmunidad humoral, expresan moléculas de anticuerpos



sobre su superficie, las cuales se unen a proteínas extrañas, polisacáridos o lípidos en su forma soluble; los linfocitos T, responsables de la inmunidad celular, expresan los llamados receptores de célula T (TCR), que reconocen pequeñas secuencias de péptidos antigénicos, pero solamente si éstos se encuentran unidos a moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) sobre la CPA. Los primeros en efectuar este reconocimiento son los linfocitos T CD4.

#### **4.3.2.2. ACTIVACIÓN**

Activación: Secuencia de eventos como resultado del reconocimiento antigénico específico. Todos los linfocitos experimentan dos cambios fundamentales:

Proliferación: Expansión de los clones antígeno-específicos y amplificación de la respuesta protectora, en la que asume una función preponderante el linfocito T CD4, capaz de activar a los linfocitos B y T CD8.

Diferenciación: Etapa en la cual se forman las células efectoras y las de memoria. Las primeras producen diversas sustancias que pueden interactuar con el antígeno, como los anticuerpos y linfocinas; las segundas son los linfocitos parcialmente diferenciados, es decir, que no llegan a convertirse en células efectoras.

#### **4.3.2.3. FASE EFECTORA**

Los linfocitos T diferenciados en células efectoras migran hacia los sitios de agresión, donde desarrollan sus funciones de eliminación de los patógenos, mientras los linfocitos B las ejecutan en los propios órganos periféricos. Muchas de estas acciones efectoras promuevan la participación de células no linfoides y de mecanismos de inmunidad innata, a saber: anticuerpos opsonizantes que favorecen la fagocitosis por parte de macrófagos y neutrófilos PMN; anticuerpos que activan el



sistema de complemento; inmunoglobulinas E que estimulan la desgranulación de los mastocitos; citocinas segregadas por los linfocitos T, necesarios para estimular la inmunidad natural.<sup>9</sup>

#### **4.4. ENFERMEDAD PERIODONTAL Y RESPUESTA INFLAMATORIA**

Las enfermedades del periodonto son diversas y entre ellas destacan la gingivitis asociada a la placa (inflamación de la encía sin pérdida de inserción) y la periodontitis (atrofia del periodonto debida a la inflamación).

La gingivitis se limita a los tejidos blandos supracrestales marginales. Se manifiesta clínicamente por sangrado durante el sondaje del sulcus gingival, y en casos graves por enrojecimiento e hinchazón, especialmente en la zona de las papilas.

En el caso de una depresión del estado inmunitario, presencia de factores de riesgo y mediadores proinflamatorios, así como de un incremento excesivo de bacterias periodontopatógenas, es posible que a partir de una gingivitis se desarrolle una periodontitis: esto se produce cuando la inflamación de la encía afecta a las estructuras más profundas del aparato de sostén dental. Tiene lugar entonces la desintegración del colágeno y la reabsorción ósea (pérdida de inserción). El epitelio de unión se transforma en un epitelio de bolsa que prolifera apical y lateralmente. Se forma así una bolsa que constituye un refugio y depósito de bacterias patógenas oportunistas que mantienen la periodontitis y pueden favorecer el avance de la afección.<sup>14</sup>

Los cambios patológicos en la gingivitis están asociados a la presencia de microorganismos orales adjuntos al diente y quizás en el surco gingival o cerca de él. Estos microorganismos son capaces de sintetizar productos (p. ej. Colagenasa, hialuronidasa, proteasa, sulfatasa de condroitina, endotoxina) que causan daño a las células



epiteliales y del tejido conectivo, además de elementos intracelulares, como el colágeno, la sustancia fundamental y el glucocálix (cubierta celular). El ensanchamiento resultante de los espacios entre las células del epitelio de unión durante la gingivitis temprana permite que agentes nocivos de las bacterias, o las propias bacterias, obtengan acceso al tejido conectivo.

Los productos microbianos activan a monocitos/macrófagos para que produzcan sustancias vasoactivas como prostaglandina  $E_2$  ( $PGE_2$ ), interferón (IFN), factor de necrosis tumoral (TNF) e interleucina-1 (IL-1). Se ha desarrollado un marco conceptual útil para la organización y consideración de estos datos basado en las características histopatológicas, radiográficas y ultraestructurales y las medidas bioquímicas. La secuencia de eventos en la gingivitis clínicamente evidente se categoriza en *etapas inicial, temprana y establecida*, y a la periodontitis se le designa como *etapa avanzada*. Cada una de estas etapas evoluciona a la siguiente, sin líneas claras de división.

A pesar de la amplia investigación, aún no se hace una distinción definitiva entre el tejido gingival normal y la etapa inicial de la gingivitis. Casi todas las biopsias de encía humana clínicamente normal contienen células inflamatorias en que predominan las T, con muy pocas células B o plasmáticas. Estas células no generan daño el tejido, pero parecen ser importantes en la respuesta diaria del huésped ante las bacterias y otras sustancias a las que se expone la encía.

El inicio de la inflamación incluye el desarrollo de edema y eritema, que son signos de cambios vasculares. La activación del complemento como respuesta a la infección bacteriana lleva a la generación de anafilotoxinas C3a y C5a derivadas del complemento. Las *anafilotoxinas* son sustancias que estimulan cambios vasculares de forma indirecta al producir desgranulación de los leucocitos residentes, los mastocitos. Los mastocitos desgranulados aumentan dentro del tejido conectivo gingival conforme aumenta la inflamación gingival. Los



mastocitos transcriben constitutivamente el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), transformando el factor de crecimiento beta (TGF- $\beta$ ), la interleucina-4 (IL-4) y la interleucina-6 (IL-6); cuando se estimulan, inducen la transcripción de citocinas proinflamatorias como la IL-1, IL-6, interferón- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), entre otros. La estimulación de las células endoteliales por parte de C5a, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  y el lipopolisacárido bacteriano (LPS) tiene como resultado la expresión de selectinas en la superficie luminal de las células endoteliales y libera quimiocinas de las células endoteliales. Estos procesos son centrales en la migración transendotelial de los leucocitos, que produce el movimiento de los leucocitos hacia los tejidos locales.

En individuos sanos, los niveles del complemento en el líquido crevicular gingival (GCF) son de casi 3% de los niveles séricos. A medida que aumenta la inflamación periodontal, se da un aumento concomitante en los niveles de los componentes del complemento. Los niveles de C3 y C4, por ejemplo, pueden aumentar a 25 u 85% de los séricos. Los niveles de componentes del complemento en el GCF son más que adecuados para apoyar el reclutamiento de células inflamatorias agudas y crónicas, la opsonización y neutralización de los patógenos o sustancias patogénicas, y la regulación local de los cambios en el tejido conectivo.<sup>15</sup>

#### **4.5. ACTIVACIÓN DE LA INMUNIDAD INNATA EN EL PERIODONTO Y PAPEL DE ESTRUCTURAS MOLECULARES DE PERIODONTOPATÓGENOS EN LA INDUCCIÓN DE LA ENFERMEDAD PERIODONTAL**

Uno de los principales retos del sistema inmunitario innato es la discriminación entre un gran número de patógenos periodontales del huésped con un número limitado de receptores celulares superficiales. El sistema inmunitario innato ha interactuado con este reto a través del reconocimiento de estructuras evolutivas conservadas en los



patógenos que no se presentan en eucariotas más evolucionados. Estos elementos moleculares conocidos como patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) tienen papeles esenciales en la capacidad de los patógenos para evadir la defensa del huésped y, por lo tanto, no están sujetos a índices altos de mutación. Los PAMP se comparten entre patógenos pero no se expresan en el huésped. Aunque desde hace años se conocen muchos receptores de reconocimiento de patrón (PRR), no era claro cómo funcionaba el sistema inmunitario innato hasta que se descubrieron los receptores tipo Toll (TLR). La investigación ha identificado los TLR como una clase importante de receptores de señalización, que reconocen estructuras bacterianas conservadas.

Las interacciones huésped-patógeno en las enfermedades periodontales destructivas son muy complejas, porque diversos PAMP pueden estimular muchos tipos de células, incluidas células residentes que están presentes de forma normal en los tejidos periodontales en ausencia de enfermedad, así como células no residentes o inflamatorias atraídas hacia los tejidos periodontales como resultado del proceso patogénico. Las células activadas del huésped pueden producir sustancias biológicamente activas que afectan a otras células, formando una red intrincada de citocinas y quimiocinas proinflamatorias con el propósito central de evitar la sepsis. Sin embargo, algunos PAMP tienen un efecto opuesto al de inhibir la respuesta del huésped, un mecanismo de facilitación de la ineficacia para algunas especies microbianas, al evadir el sistema inmune del huésped.

#### **4.5.1. EFECTOS SOBRE CÉLULAS RESIDENTES**

El primer tipo celular en ser estimulado por los PAMP es la **célula epitelial**. Estas células expresan TLR-2 y TLR9, además de IL-8, quimioatrayente y activador neutrófilo. Además de activar otras células





huésped, como células endoteliales, macrófagos, células dendríticas y neutrófilos, estas células producen metaloproteinasas de matriz (MMP) después de la estimulación con PAMP, lo que sugiere un mecanismo de daño directo al tejido.

Las **células dendríticas** (DCs) se exponen a los PAMP en cuanto se coloniza el área subgingival con patógenos periodontales putativos. Las DCs producen IFN- $\alpha$ , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, TNF- $\alpha$  y moléculas coestimulantes (CD40, CD54, CD80, CD86) que inducen la activación de linfocitos T, que producen respuestas inmunes tipo Th1 o Th2.

A medida que avanza la periodontitis y los PAMP entran en el tejido conectivo, los **macrófagos** se activan de forma directa produciendo IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12, TNF- $\alpha$ , MMP-1, Óxido nítrico (NO).

Los **fibroblastos** gingivales pueden producir cierto número de citocinas proinflamatorias y también expresan moléculas de adhesión a diversos PAMP (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ , PGE<sub>2</sub>). Se informa que los fibroblastos del ligamento periodontal carecen de expresión de receptores CD-14, que puede ser responsable de los bajos niveles de IL-8 producidos después de la estimulación del LPS en comparación con los fibroblastos gingivales. Estas células también pueden secretar proteinasas, lo que produce la degradación directa de tejidos blandos y mineralizados.

Las **células endoteliales** pueden estar estimuladas por la IL-8 secretada por otras células del huésped y también de forma directa por el LPS, lo que lleva a la activación y la mayor adhesión de monocitos. Este efecto se relaciona con la inducción de la producción de citocina y una mayor expresión de las moléculas de adhesión selectina-E, ICAM-1, y VCAM-1. Inducidas por los PAMP.

Los osteoblastos también son sensibles a los PAMP; en particular, el LPS puede inducir la producción de múltiples citocinas proinflamatorias y mediadores biológicos que participan en la resorción ósea.



#### **4.5.2. EFECTOS SOBRE CÉLULAS NO RESIDENTES**

Los **neutrófilos** responden a las citocinas secretadas por las células huésped activadas, como la IL-8 liberada por las células epiteliales, y a las moléculas de adhesión expresadas por las células endoteliales estimuladas. Los PAMP también pueden estimular de manera directa estas células, induciendo quimiotaxis, la liberación de la molécula de adhesión selectina-L y la producción de citocina, efectos mediados por la expresión de TLR-2.

Los **monocitos** estimulados por los PAMP producen citocinas inflamatorias y también aumentan la proliferación y adhesión a las células endoteliales. La secreción de IL-12 juega un papel importante en la activación de las células T para producir IFN- $\gamma$ , que lleva al desarrollo de una respuesta Th1 de células T, caracterizada por una inmunidad mediada por células.

Los **linfocitos B** también están estimulados de manera directa por los PAMP, porque carecen de expresión de TLR-4, mientras que expresan TLR-9. Esto lleva a la proliferación, la producción de anticuerpos en los plasmocitos, la expresión de factores coestimulantes (p. ej. MHC clase II, CD80, CD86) y la producción de citocinas inflamatorias, incluida IL-12, en presencia de factores coestimulantes.

Los **linfocitos T** suelen activarse mediante la interacción con otras células y sus mediadores biológicos, lo que produce la diferenciación a un tipo de respuesta inmune Th1 o Th2. Sin embargo, el LPS también puede inducir de manera directa la proliferación y secreción de citocinas, pero este efecto depende de la especie de microorganismo.<sup>15</sup>

#### **4.5.3. FASES DE LA ENFERMEDAD PERIODONTAL**

A nivel molecular las bacterias de la placa producen metabolitos –por ejemplo, ácidos grasos de cadena corta (ácido butírico, ácido propiónico), el péptido *N*-formil-metionil-leucil-fenilalanina (FMLP) y Lipopolisacárido (LPS)– que inducen a que el epitelio de unión secrete



mediadores de inflamación (IL-8; TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , PGE<sub>2</sub>, MMP). Las terminaciones nerviosas libres producen neuropéptidos e histamina, que regulan la reacción vascular local. Las células cebadas perivasculares liberan histamina, lo cual lleva al endotelio a liberar IL-8 en el vaso. La IL-8 atrae a los PMN.

### **Activación de macrófagos y del sistema de proteínas séricas**

Esta reacción vascular provoca que proteínas séricas –por ejemplo, el complemento– penetren en el tejido conjuntivo, activando la reacción inflamatoria local.

Posteriormente se reclutan leucocitos y monocitos. Los macrófagos activados producen mediadores de la inflamación, como IL-1 $\beta$ , IL-1ra, IL-6, IL-10, IL-12, TNF- $\alpha$ , PGE<sub>2</sub>, MMP, IFN- $\gamma$ , y quimiotaxinas como Proteína quimiotáctica de monocitos (MCP), Proteína inflamatoria de macrófagos (MIP).

### **Regulación de la actividad de células inflamatorias**

Los linfocitos predominan ahora en el infiltrado inflamatorio. Las células T activadas coordinan la respuesta inmunitaria mediante citocinas (IL-2 a IL-6, IL-10 e IL-13, Factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), Factor de crecimiento transformador beta (TGN- $\beta$ ), IFN- $\gamma$ ).

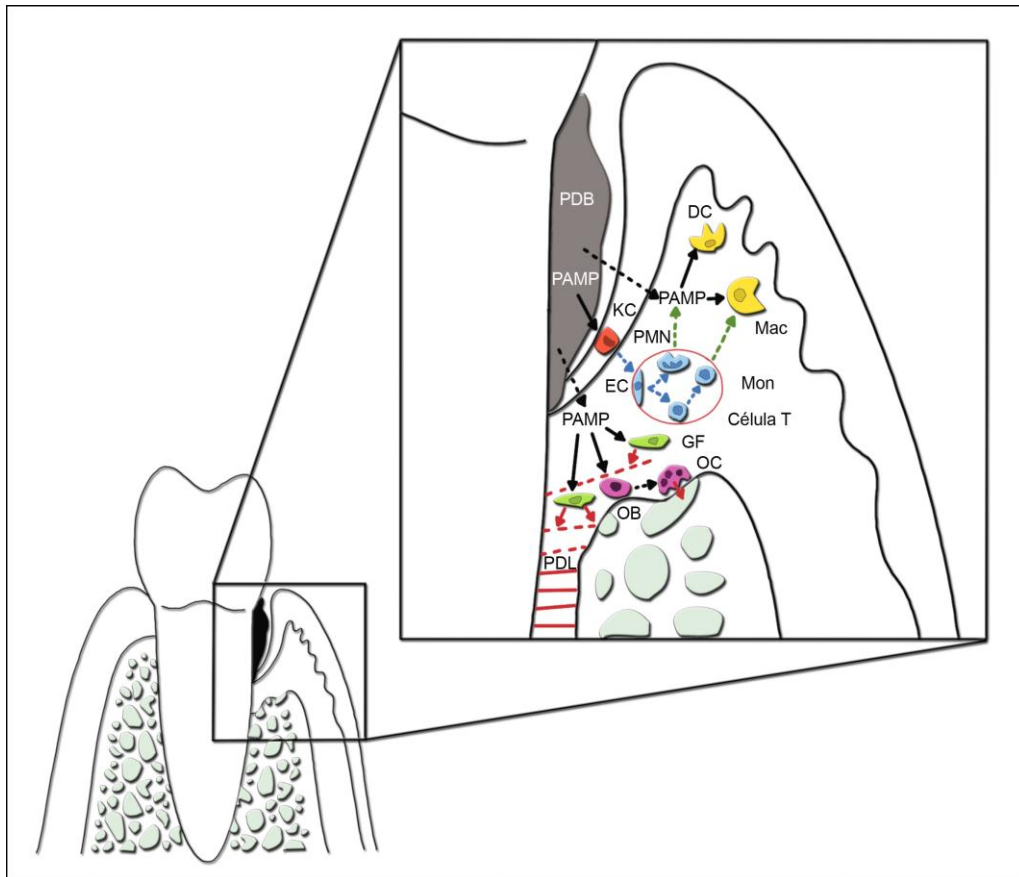
Las células plasmáticas producen Ig y citocinas. Los PMN activados secretan diversas citocinas, leucotrienos (LTB<sub>4</sub>) y MMP. Los fibroblastos activados producen MMP e Inhibidor tisular de las MMP (TIMP) en lugar de colágeno. El infiltrado aumenta de tamaño.

### **Primera pérdida de inserción**

Aumento de la actividad de los macrófagos, los mediadores regulados y las reacciones del huésped en el tejido conjuntivo infiltrado. Las células inmunocompetentes, como los fibroblastos, producen numerosas citocinas (IL-1- $\beta$ , IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ ), así como

prostaglandina ( $PGE_2$ ), MMP y TIMP. Las células plasmáticas predominan en el infiltrado.

La alteración de la homeostasia tisular conduce a la degradación del colágeno, la matriz y el hueso, con la consiguiente periodontitis.<sup>14</sup> (Fig.3)



**Fig. 3. Activación celular por PAMP y efecto en el periodonto.** Los PAMP de microorganismos en la placa dentobacteriana (PDB) pueden activar de manera directa varios tipos celulares (flechas negras) que producen cierto número de mediadores biológicos. Estos mediadores, afectan a otras células (flechas punteadas azules), al inducir la expresión de otros mediadores (expresión de RANKL por parte de los osteoblastos) o por la activación de la quimiotaxis (flechas punteadas verdes). Algunos ejemplos de estos efectos son la expresión de RANKL por los osteoblastos y la secreción de IL-8 por parte de las células epiteliales. También puede haber daño directo a los tejidos periodontales después de la estimulación de los PAMP (flechas rojas), como la secreción de metaloproteinasa por parte de los fibroblastos del ligamento gingival y periodontal.

*PAMP*, patrón molecular asociado a patógenos; *RANKL*, activador del receptor del ligando del factor nuclear kappa B; *IL-8*, interleucina-8; *KC*, queratinocito; *DC*, célula dendrítica; *Mac*, macrófago; *GF*, fibroblasto gingival; *PDL*, fibroblasto del ligamento periodontal; *OB*, osteoblasto; *OC*, osteoclasto; *EC*, célula endotelial; *PMN*, neutrófilo polimorfonuclear; *Mon*, monocito; *Célula T*, linfocito T. Fuente: Modificado de Carranza F., *et ál*. Carranza's Clinical periodontology. 2006.



## 5.- RECEPTORES CELULARES

### **5.1. RECONOCIMIENTO DE LO NO PROPIO INFECCIOSO**

Los seres vivos nos encontramos inmersos en un “océano” de microorganismos que colonizan nuestras superficies. Muchas veces, las interacciones entre el organismo hospedero y las bacterias son benéficas –por ejemplo, la flora microbiana comensal provee nutrientes y promueve el completo desarrollo del tracto intestinal–. En contraste, muchos organismos patogénicos han desarrollado mecanismos para cruzar las barreras de los tejidos<sup>16</sup>. Así, cierta clase de microorganismos representan una constante amenaza para los organismos metazoarios. Consecuentemente, el desarrollo de poderosos mecanismos para contener invasiones microbianas se convirtió en un prerrequisito de la evolución durante miles de millones de años. Esos mecanismos involucran el reconocimiento del invasor, o sea, la discriminación entre lo propio y lo no propio infeccioso, así como un sistema efector que eficientemente reconoce como su blanco a los microorganismos con respecto de las células propias.<sup>17</sup>

A partir de estos planteamientos se cree que el sistema inmune evolucionó como el mecanismo de defensa contra los microbios patógenos. Consta de la inmunidad innata, que es evolutivamente más antigua, y la inmunidad adaptativa, que permite el reconocimiento específico y la memoria inmunológica. La inmunidad innata es la primera línea de defensa contra los patógenos microbianos<sup>18,25,28</sup>. Como primera capa activa, se basa en el reconocimiento, por medio de receptores de superficie, de moléculas indicativas de lo no-propio o lo propio-modificado.<sup>19</sup>

El modelo inicial del porqué se genera una respuesta inmune fue propuesto por Frank Macfarlane Burnet a mediados del siglo XX y se conoce como “la discriminación propio-no propio”. Esta teoría ha prevalecido desde su planteamiento y sostiene que el sistema inmune



se activa en presencia de componentes extraños en tanto que no responde, es decir tolera los componentes propios. La respuesta inmune se iniciaba cuando los linfocitos B (LB) reconocían antígenos (Ag) mediante su receptor específico, el receptor de las células B (BCR).

En 1969, Bretscher y Cohn propusieron al linfocito T colaborador (LTh) como proveedor de una segunda señal (señal 2 de ayuda) que evitaba la muerte de los LB que habían recibido la señal del Ag (señal 1). En 1974 Lafferty y Cunningham modifican el modelo con la inclusión de la célula presentadora de antígeno (CPA) que proveía otra segunda señal a la que llamaron señal 2 coestimuladora del LTh. Durante años se estudió la señal 2 de ayuda y se ignoró la señal 2 coestimuladora debido a que se desconocía la manera en que la APC podía diferenciar lo propio de lo extraño. Ante la imposibilidad de explicar muchos fenómenos inmunológicos con este modelo. Charles Janeway en 1989, encontró la manera de integrar la coestimulación en el modelo del reconocimiento de lo propio versus lo no propio, cuando planteó la teoría de “la discriminación entre lo no propio infeccioso y lo propio no infeccioso”. Janeway acuñó el término “Receptores de reconocimiento de Patrones (PRR) para referirse a receptores no clonales, codificados en la línea germinal y expresados en las APC para reconocer productos microbianos, ausentes en las células del hospedero, como el lipopolisacárido (LPS); es decir, los PRR permitían a las APC discriminar entre lo no propio infeccioso y lo propio no infeccioso.

Este modelo ubica el inicio de la respuesta inmune en el reconocimiento de los agentes infecciosos no por los linfocitos sino por las APC; de acuerdo con esta propuesta y partiendo de la hipótesis de que normalmente las APC están en reposo y deben “activarse” mediante alguna señal, Janeway sugirió que la unión de los PRR a sus ligandos activaba a las APC, las que entonces aumentarían la expresión de moléculas coestimuladoras para activar al LT. Sin



embargo, aunque con esto se explicaba la respuesta inmune a las bacterias y patógenos evolutivamente distantes, no aclaraba porqué se presentaba una respuesta inmune a trasplantes y tumores, ni la disfunción observada en enfermedades autoinmunes.

Para resolver esta cuestión, en 1994, Polly Matzinger propuso la “teoría del peligro” según la cual, las CPA son estimuladas no por los PAMP sino por señales de alarma/peligro liberadas por los tejidos lesionados como aquellos expuestos a patógenos, toxinas, daño mecánico y muerte por necrosis; señales que no son emitidas por células saludables o que sufren muerte fisiológica. En ese momento se desconocía cuáles podían ser esas señales. La teoría del peligro sugiere que el estado de activación de una CPA depende de la salud de su entorno; de este modo, las células saludables envían “señales de normalidad” a las CPA, mientras las células estresadas, dañadas, destruidas anormalmente o muertas por necrosis envían señales de alarma que alertan a las CPA. Este modelo planteó dos aspectos novedosos; el primero, que no es la naturaleza extraña del patógeno el rasgo importante que desencadena la respuesta inmune sino las señales que libera la célula lesionada; y el segundo, que el reconocimiento de lo propio no es garantía de tolerancia porque si lo propio está alterado también puede inducir una respuesta.

La teoría de lo no propio infeccioso y la teoría del peligro tienen en común que ubican el inicio de la respuesta inmune en la CPA; activada por PAMP o señales de peligro derivadas del tejido lesionado. El modelo de lo no propio infeccioso ha sido respaldado por el descubrimiento de los TLR y de los receptores con dominios de oligomerización para unión a nucleótidos (NOD). Por otro lado, la teoría del peligro ha sido respaldada por el hallazgo de señales de alarma endógenas tales como DNA, RNA, proteínas de choque térmico (HSP), interferón alfa (IFN- $\alpha$ ), interleucina 1 beta (IL-1 $\beta$ ), el ligando de CD40 (CD40L) y productos del hialuronano generados durante la



ruptura de vasos sanguíneos.<sup>20</sup> Evidencia reciente indica que los PRR son también responsables por el reconocimiento de moléculas endógenas liberadas por células dañadas, llamadas Patrones moleculares asociados a daño (DAMPs).<sup>21</sup> Sugiriendo que estos receptores reconocen señales exógenas o endógenas para defender al organismo de agresiones tanto del medio externo como interno. Lo que explica la expresión de TLR en células no solo del sistema inmune sino también en tejido epitelial, adiposo y muscular entre otros. De manera que es posible a considerar a los TLR y otros receptores, algunos aún desconocidos, como un puente que permite expandir el modelo del peligro más allá de las fronteras del sistema inmune.<sup>20</sup>

## **5.2. RECEPTORES DE RECONOCIMIENTO DE PATRONES**

Las respuestas del sistema inmune contra patógenos microbianos son iniciadas por el reconocimiento de estructuras específicas de los patógenos invasores<sup>22</sup>. Estructuras químicas moleculares conservadas, como lípidos, carbohidratos, péptidos y ácidos nucleicos, conocidas como patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), que son típicamente invariables y esenciales para el ciclo de vida de los mismos, así como para su virulencia. Estos patrones se encuentran ausentes de las células del organismo hospedero, y son reconocidos por receptores reconocedores de patrones (PRR) codificados en línea germinal por el hospedero.<sup>23</sup>

Los PRR se encuentran distribuidos con perfiles particulares en cada tipo celular, pero su función es la misma independientemente de su localización; además, un solo receptor genera una respuesta celular mediante su interacción con varios ligandos estructuralmente distintos. No obstante, el nivel de especificidad de los PRR es tan fino que dos de ellos distinguen porciones de una misma molécula y no entrecruzan sus respuestas. Una vez activados, disparan eventos de señalización intracelular que llevan a la producción de mediadores de la inflamación.





Las dos familias de PRR más estudiados son los TLR (receptores similares a toll) y los NLR (receptores similares a NOD); pero existen otros, entre ellos, las helicasas tipo RIG, lectinas tipo C, receptores purinérgicos, scavenger y otros. (Tabla 2)

De manera breve se mencionarán algunos, para después describir a fondo los que interesan a este trabajo; los receptores tipo Toll.

### **5.2.1. RECEPTORES TIPO NOD (NLR)**

La familia NLR comprende alrededor de 20 miembros. Los NLR reconocen una variedad de PAMPs similar o complementaria al reconocimiento por TLR. La peptidoglicana (PGN) es reconocida por NOD1/NOD2; el receptor IPAF y la proteína neuronal inhibidora de apoptosis (NAIP) reconocen a la flagelina; los miembros de la subfamilia NALP reconocen al muralmildipéptido (MDP) y a los adenovirus que causan enfermedades respiratorias.

Los NLR están formados por un dominio de reconocimiento rico en repeticiones de leucina, un dominio central de oligomerización (NOD) y un dominio de señalización.

### **5.2.2. RECEPTORES HELICASAS TIPO RIG (RLH)**

La proteína citoplásmica inducible por el ácido retinoico I (RIG-I) es una helicasa de RNA. Posee un dominio de reconocimiento de RNA de doble cadena y tiene dos dominios de reclutamiento y activación de caspasas (CARD). Su función consiste en bloquear la replicación viral a través de producción de IFN- $\beta$ .

### **5.2.3. RECEPTORES LECTINA TIPO C (CLR)**

Los CLR son una familia de receptores que reconocen carbohidratos como N-acetilglucosamina, manosa, N-acetilmanosamina, mucosa y glucosa. Algunos tienen actividad bactericida como Reg III que se une a la PGN de bacterias gram-positivas.



Existen otras lectinas tipo C cuya función principal descrita es la fagocitosis, aunque algunas de ellas parecen generar señales que llegan al núcleo para transcripción de genes.<sup>24</sup>

**Tabla 2.** Receptores PRR y sus ligandos

PRRs	Localización	Ligando	Origen ligando
TLR			
TLR1	Membrana	Lipoproteína triacil	Bacteria
TLR2	Membrana	Lipoproteína	Bacterias, virus, parásitos
TLR3	Endolisosoma	dsRNA	Virus
TLR4	Membrana	LPS	Bacterias, virus
TLR5	Membrana	Flagelina	Bacterias
TLR6	Membrana	Lipoproteína diacil	Bacterias, virus
TLR7 (TLR8 en humanos)	Endolisosoma	ssRNA	Virus, bacterias
TLR9	Endolisosoma	CpG-DNA	Virus, bacterias, protozoarios
TLR10	Membrana	Desconocido	Desconocido
TLR11		Molécula similar a profilina	Protozoarios
RLR			
RIG-1	Citoplasma	dsRNA corto, 5' trifosfato dsRNA	Virus RNA, DNA
MDA5	Citoplasma	dsRNA largo	Virus RNA (Picornaviridae)
LGP2	Citoplasma	Desconocido	Virus RNA
NLR			
NOD1	Citoplasma	iE-DAP	Bacteria
NOD2	Citoplasma	MDP	Bacteria
CLR			
Dectin-1	Membrana	Glucano- $\beta$	Hongos
Dectin-2	Membrana	Glucano- $\beta$	Hongos
MINCLE	Membrana	SAP130	Hongos

Fuente: Takeuchi O. *et ál.* Pattern Recognition and Inflammation. 2010.



### **5.3. RECEPTORES TOLL**

En 1988 Nusslein-Volhard acuñó el término Toll que en alemán significa extraordinario para referirse a un gen que codifica para un receptor de membrana involucrado en el desarrollo dorso-ventral de la mosca de la fruta *Drosophila Melanogaster*, ya que cuando estos insectos carecían de esta proteína se desarrollaban de manera fuera de lo común, de ahí que en principio se relacionara con la diferenciación morfológica del insecto.

A mediados de los años noventas, se descubrió que la defensa fisiológica generada por la mosca de la fruta consistía en la producción de diferentes péptidos antimicrobianos. Los promotores de los genes que codifican estos péptidos contienen secuencias de reconocimiento para el factor de transcripción nuclear (NF- $\kappa$ B), que es central para la expresión de genes relacionados con la respuesta inflamatoria, el control de la proliferación celular y la resistencia a la apoptosis.

En 1996, el grupo de Hoffmann encontró que las moscas adultas que no expresaban el factor de transcripción denominado “dorsal”, proteína de la familia NF- $\kappa$ B y regulada por Toll, morían de infecciones causadas por hongos.<sup>25</sup>

Un año después, en 1997, el primer receptor homólogo a Toll en humanos fue descrito. Uno tras otro, se fueron identificando más receptores, designándolos receptores similares a Toll (TLRs).<sup>26</sup>

#### **5.3.1. ESTRUCTURA**

Los receptores tipo Toll son receptores transmembranales tipo I que presentan homología con la proteína Toll de *Drosophila Melanogaster* y el receptor de la interleucina-1 (IL-1).

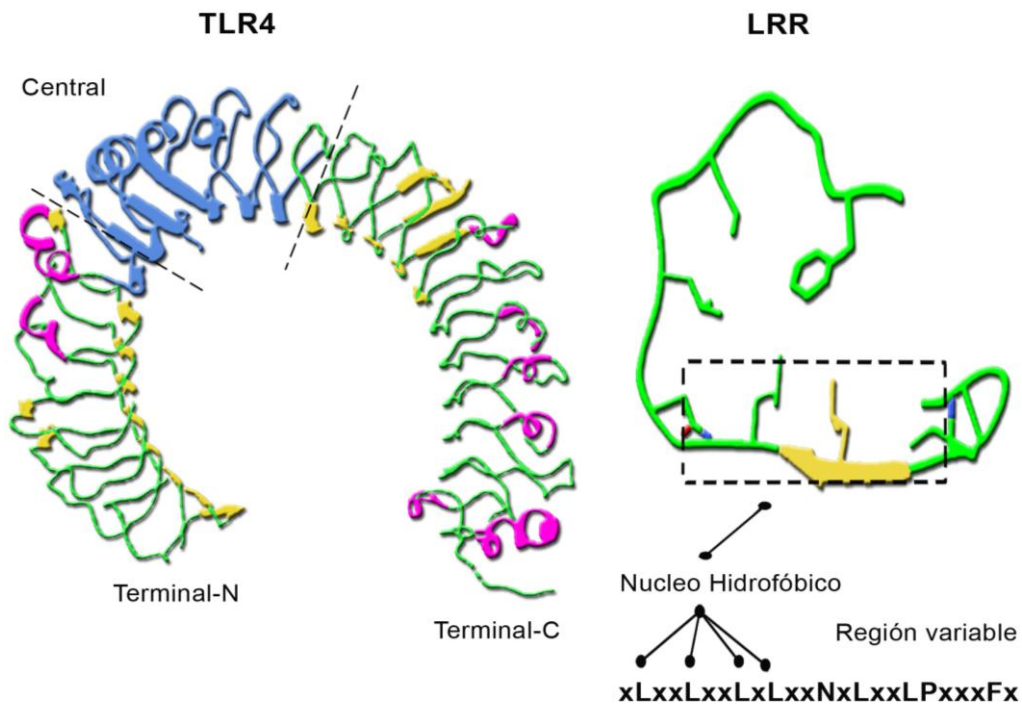
Todos los TLRs comparten la misma estructura: un gran dominio extracelular amino (550 a 980 aminoácidos) que consiste en repeticiones ricas en leucina (LRR), un dominio transmembrana y una porción citoplasmática, con extremo carboxilo, similar al receptor de



IL-1 llamado TIR (como Toll/IL-1R-) de unos 200 aminoácidos de longitud. El dominio extracelular tiene la capacidad de unión al ligando, siendo responsable del reconocimiento de los diferentes PAMPs y el dominio TIR media la señal intracelular.<sup>25,28</sup>

De manera general, el dominio TIR intracelular adaptador de proteínas está compuesto de aproximadamente 160 residuos de aminoácidos y la secuencia primaria del dominio TIR se caracteriza por tres cajas de secuencias conservadas (Box) designadas Box 1, 2 y 3. Box 1 es considerada como la secuencia característica de la familia, mientras box 2 y 3 contienen importantes residuos funcionales involucrados en la señalización. Estos componentes dan como resultado la formación de un extenso complejo multímero, o “plataforma de señalización”, que propaga la cascada de señalización, que eventualmente conduce a cambios en la expresión de varios cientos de genes de la respuesta inmune primaria. Sin embargo, la arquitectura de los complejos de señalización de TLRs es pobremente entendida aún debido a la falta de métodos confiables para estudiar tales interacciones.

El dominio extracelular contiene múltiples bloques de LRR los cuales se encuentran protegidos por regiones ricas en cisteína formando las terminales LRR-N y LRR-C. La estructura terminal C se encuentra conectada al dominio citoplasmático TIR por medio de una hélice  $\alpha$  transmembranal. Un módulo individual LRR (aproximadamente de 20-30 residuos aminoácidos de longitud) consiste de un motivo conservado “LxxLxLxxNxL”, y una región variable. (Fig. 4) Los residuos variables “x” presentes en el motivo son expuestos al solvente. Entre estos, solo pocos residuos están involucrados en el reconocimiento del ligando. El motivo “LxxLxLxxNxL” localizado en el interior de la superficie cóncava de la estructura de herradura forma hebras paralelas  $\beta$ , mientras la región variable forma la superficie cóncava generada por hélices  $\alpha$ , vueltas  $\beta$  y estructuras en bucle.<sup>27</sup>



**Fig. 4. Estructura del dominio extracelular de TLR4.** TLR4: Se muestran las posiciones de los subdominios Terminal-N, Central y Terminal-C. LRR: Módulo de repeticiones ricas en leucina con el motivo conservado (núcleo hidrofóbico) y la región variable. Fuente: Modificado de Manalavan B., *et ál.* Similar structures but different roles – an updated perspective on TLR structures. 2011.

Los receptores Toll reconocen a sus ligandos en forma de homo o heterodímeros, oligomerizando en sus dominios citoplasmáticos. TLR 4 actúa como un homodímero, y un estudio reciente también implica su asociación con TLR5 formando un heterodímero en la señalización de flagelina bacteriana. TLR2 puede formar asociaciones con TLR6 y TLR1, pero también funciona solo.<sup>25,28</sup>

Al estudiar los dominios extracelulares de las proteínas de la familia Toll se ha observado que son muy divergentes. Comparando TLR2 y TLR4, su homología es del 24%, lo que explicaría su activación por distintos ligandos. Esta diferencia se hace patente también entre genes homólogos de diferentes especies, por ejemplo, el TLR4 de ratón presenta una homología del 53% con el TLR4 humano. A diferencia del dominio extracelular, el dominio citoplasmático está bastante conservado a lo largo de la evolución, el TLR4 humano y del ratón presenta una homología del 83%.<sup>29,30</sup>



### **5.3.2. CLASIFICACIÓN (FAMILIA/LOCALIZACIÓN)**

La familia de los TLR se compone por lo menos de 10 miembros, algunos autores mencionan hasta 15 tipos<sup>28</sup>. La comparación de la secuencia de aminoácidos de los TLR humanos y de su estructura genómica permite su clasificación en 5 subfamilias; TLR2, TLR3, TLR4, TLR5 y TLR9. TLR3 es el único codificado por 5 exones, mientras que los representantes de las otras subfamilias sólo codifican por uno o dos exones.<sup>31, 32</sup> A su vez, estos miembros pueden ser divididos en dos subgrupos, extracelulares e intracelulares, dependiendo de su localización celular. TLR1, 2, 4, 5, 6 y 10 están localizados principalmente en la superficie celular para reconocer PAMPs. Por otro lado, TLR3, 7, 8 y 9 se localizan en organelos intracelulares como compartimentos endosomales/lisosomales y el retículo endoplasmático, dependiendo del tipo y la condición celular.<sup>33</sup>

### **5.3.3. LIGANDOS DE RECEPTORES TOLL**

Los ligandos de receptores TLR pueden ser categorizados como componentes lipídicos, proteínicos y ácido nucleícos. Todos ellos potentes coadyuvantes inmunes que pueden disparar una vigorosa respuesta inmune. El primero en ser identificado, y más potente, es el lipopolisacárido (LPS). El LPS es reconocido por TLR4. Inicialmente el LPS se liga a un factor soluble, proteína ligadora LPS, en el suero y entonces se transfiere a células blanco como los macrófagos.

Otros componentes con contenido lipídico de las paredes celulares de una gran variedad de microorganismos son reconocidos por TLR2 y otros TLR relacionados, como TLR1 y TLR6. La heterodimerización es crítica para el reconocimiento mediado por TLR2. Por ejemplo, TLR2 puede reconocer lipopéptido-2 macrófago-activador mycoplasma (MALP-2) cuando se asocia con TLR6. Mientras que, el heterodímero TLR2/TLR1 está involucrado en el reconocimiento del lipopéptido bacteriano (BLP).<sup>34</sup>



Se ha demostrado que TLR3 reconoce RNA viral de doble cadena (dsRNA) producido durante la replicación viral. El dsRNA interactúa con ambas terminales C y N en el lado de la superficie convexa de TLR3. La flagelina es reconocida por TLR5, RNA de una cadena por TLR7 o TLR8, y ADN microbiano por TLR9.<sup>35</sup>

#### **5.3.4. EXPRESIÓN DE TLRs**

Los TLR son expresados en diferentes tipos celulares, principalmente en células del sistema inmune innato, incluyendo neutrófilos, monocitos/macrófagos y células dendríticas.<sup>36</sup> Fuera del sistema inmune también tienen expresión en fibroblastos, células endoteliales, adipocitos, células epiteliales.<sup>28</sup>

Los monocitos y macrófagos expresan RNA mensajero para la mayoría de los TLR, con excepción de TLR3. La expresión de TLR en células dendríticas difiere según su origen. En el hombre, las células dendríticas pueden ser de estirpe mieloide o plasmacitoide. Las primeras expresan TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 y TLR8, mientras que las últimas expresan exclusivamente TLR7 y TLR9. Algunos trabajos sugieren que TLR7 también se expresa en células dendríticas de origen mieloide.

Las células dendríticas maduran en respuesta a componentes microbianos y la expresión de TLR difiere según el patrón de maduración. La mayoría de los tejidos expresa al menos un TLR; aunque los fagocitos son las células con mayor expresión de TLR, algunas moléculas se expresan preferentemente en linfocitos B.

Las células cebadas, muy preservadas a lo largo de la evolución, pueden fagocitar patógenos, procesar antígenos y producir citoquinas inflamatorias, lo cual las involucra en la respuesta inmune innata además de participar en reacciones alérgicas. Las células cebadas expresan TLR2, TLR4, TLR6 y TLR 8 pero no TLR5.





Los LTR también se expresan en una gran variedad de células que contribuyen con la respuesta inflamatoria. La superficie mucosa del tracto intestinal o respiratorio está recubierta por una capa simple de células epiteliales que forma una barrera contra patógenos. En intestino, la cara apical de las células epiteliales está continuamente expuesta a bacterias sin que se genere inflamación, que solamente ocurre cuando los gérmenes patogénicos invaden el compartimiento basolateral. El TLR5 se expresa únicamente en esta última cara, mientras que el LTR4 sólo se expresa levemente en células epiteliales del intestino, lo cual explica la baja reacción a LPS.

En las células epiteliales, la expresión de TLR está sujeta a una regulación exquisita de manera tal que sólo haya respuesta frente a gérmenes patógenos y no comensales.<sup>31</sup>



## **6.- PATRONES MOLECULARES ASOCIADOS A PATÓGENOS**

### **6.1. DEFINICIÓN**

Como se mencionó con anterioridad, las células del sistema inmune innato reconocen un patrón molecular común y constante de la superficie de los microorganismos denominado patrón molecular asociado a patógenos (PAMP).

Estos patrones moleculares presentes en los microorganismos patógenos presentan una serie de propiedades comunes:

- Son característicos de los microorganismos y no se encuentran presentes en las células del hospedero, característica que permite al sistema inmune innato distinguir entre antígenos propios y extraños.
- Son invariables, lo que permite que con un número limitado de PRR se detecte la presencia de cualquier patógeno. Por ejemplo: el reconocimiento del lípido A característico del LPS permite a un único PRR detectar la presencia de cualquier infección bacteriana por microorganismos gram-negativos.
- Son esenciales para la supervivencia o patogenicidad del microorganismo, por lo que sus mutaciones son letales para el mismo y, por tanto, permanecen invariables pudiendo ser reconocidos por los PRR.<sup>29,30</sup>

### **6.2 PRINCIPALES PAMPs**

Entre los principales PAMPs que actúan como dianas para la activación del sistema inmune innato se encuentran el lipopolisacárido, ácido teicoico, secuencias de DNA CpG no metiladas, manosa y RNA bicatenario característico de virus.



El **lipopolisacárido** es un componente integral de la membrana externa de las bacterias gram-negativas y un potente activador de macrófagos como agente causal del shock endotóxico. Estructuralmente, el LPS es un complejo glicolipídico integrado por una porción polisacárida hidrofílica y un dominio hidrofóbico conocido como lípido A, el cual es responsable de su actividad biológica. Las bacterias gram-positivas como *Staphylococcus aureus* no producen LPS pero desencadenan un síndrome de shock tóxico similar al producido por LPS. Los principales componentes inmunoestimuladores son **peptidoglicanos (PGN)**, **ácido lipoteicoico (LTA)** y **lipoproteínas**. LTA se compone de un anclaje lipídico unido a una cadena de unidades de poli-glicerol o poli-ribitol separados por un grupo fosfato. La **Flagelina** es un monómero de 55 kDa obtenido a partir de flagelos bacterianos, un apéndice polimérico tipo varilla que se extiende desde la membrana externa de bacterias gram-negativas, propulsando al organismo a través de ambientes acuosos. De la replicación viral en el interior de células infectadas resulta la generación de **RNA bicatenario (dsRNA)**. Motivos de deoxicitidilato-fosfato-deoxiguanilato no metilado (CpG) también se encuentran entre los principales PAMPs. **Cpg DNA** es el equivalente del DNA bacteriano.<sup>7,29,37,38</sup>



## 7.- LIPOPOLISACÁRIDO

### 7.1. PERSPECTIVA HISTÓRICA

#### **Inicio de la investigación de endotoxinas**

Por 2500 años se pensó en la fiebre como una bendición y un veneno para el cuerpo en su lucha contra la enfermedad. Muchos notables médicos de la antigüedad, iniciando con los griegos, creían que la fiebre debía ser promovida como una manera de combatir a la enfermedad. Hipócrates creía que la fiebre servía para “cocer” los humores excesivos (la supuesta causa de enfermedades como se creía entonces) y, por lo tanto, remover éstos del organismo. No fue hasta el siglo XVIII que se realizaron estudios serios encaminados a descubrir las causas de la fiebre. Los primeros estudios surgieron de observaciones asociadas al comienzo de fiebre en animales y humanos en contacto con materiales orgánicos en estado de putrefacción.<sup>39</sup> A través de los trabajos de Albrech von Haller (1708-1777) y otros médicos y científicos, se reconoce que la inoculación intravenosa de fluidos pútridos, como los obtenidos de la descomposición de materia orgánica como pescado o carne, en animales de experimentación produce fiebre y otras manifestaciones de enfermedad. Un extracto obtenido de pescado o carne fresca no producía reacciones febriles, lo que hace pensar que aparentemente durante la descomposición y putrefacción es formado un principio tóxico que produce fiebre y enfermedad. François Magendie (1783-1855) (Fig. 5), director de servicios médicos del viejo hospital parisino L`Hôtel-Dieu, consideró las frecuentes observaciones de los médicos acerca de la influencia insana de las condiciones insalubres en las principales bahías y sus alrededores. Ahí, masas de plantas y material de origen animal lentamente se descomponían y entraban en putrefacción, presentándose severas enfermedades, incluyendo plaga y cólera. Magendie se planteó una pregunta fundamental, si podía existir una

conexión entre la putrefacción, la producción de toxinas, y la iniciación de la fiebre y la enfermedad.

Magendie desarrollo los más reveladores experimentos con filtrados de peces en descomposición estudiando la respuesta primaria del anfitrión. Sin embargo, no trató de purificar el principio activo de este fluido tóxico.<sup>40</sup> Demostró que sin la descomposición pútrida de materia orgánica no se podía inducir fiebre y que para producir el efecto debía ser absorbida a través de las venas. Al mismo tiempo, los farmacéuticos franceses Pierre-Joseph Pelletier y Joseph-Bienaimé Caventue aislaron la quinina como fármaco antipirético puro de la corteza de la cinchona. De este modo, la piresis y antipiresis (del griego “pyreto” fiebre) pudieron ser inducidas artificialmente y estudiadas.<sup>39</sup>



**Fig. 5. François Magendie**

Fuente: [http://en.wikipedia.org/wiki/File:Fran%C3%A7ois\\_Magendie.jpg](http://en.wikipedia.org/wiki/File:Fran%C3%A7ois_Magendie.jpg)



El problema del aislamiento del principio activo del fluido tóxico fue abordado por el danés Peter L. Panum (1820-1885), entonces profesor asociado de fisiología y patología en Kiel, Alemania. Panum intentó caracterizar el veneno pútrido, su trabajo es ahora considerado como el inicio de la investigación científica sistemática de las endotoxinas. En 1874, publicó su trabajo acerca de sus primeros intentos (alrededor de 1856) por purificar los principios activos del veneno pútrido, que pueden resumirse con lo siguiente:

- El veneno pútrido no es volátil y no es un simple producto del resultado de la putrefacción o fermentación. Puede ser diferenciado de microorganismos vivos, los cuales pueden ser la fuente del mismo pero no la causa.
- La toxina resiste el calor, así, difiere de las enzimas típicas.
- Es insoluble en alcohol puro pero soluble en agua.
- Las sustancias parecidas a proteínas presentes frecuentemente en fluidos pútridos no eran tóxicas en sí mismas, pero absorbían (condensaban) la toxina en sus superficies cuando se precipitaban.
- La inoculación de 12 mg de concentrado era suficiente para producir fiebre alta y matar a un perro.

Las ideas de Panum fueron seguidas más tarde por Ernst von Bergmann (1836-1906), profesor de cirugía en Würzburg y Berlín, Alemania. Von Bergmann creía que existía una sustancia química definida responsable de la intoxicación pútrida, a la cual denominó *sepsina*.<sup>40,41</sup>

En 1868, publicó un primer trabajo acerca de la sepsina. Subsecuentemente, intentó aislar el asumido componente del fluido pútrido que, en una forma purificada, induciría manifestaciones tóxicas en animales. Su trabajo acerca de la sepsina fue desafortunadamente interrumpido por la guerra Franco-Prusia (1870-71) sin ser continuado posteriormente.



Durante estos años de una investigación emergente de la molécula que más tarde se conocería como endotoxina, y como entonces muchas veces se reconocería por sus propiedades productoras de fiebre, para referirse a ella se acuñaron términos como *material pirogénico* o *pirógeno*. El crédito por el primer uso del término sustancia pirogénica se debe a Theodor Billroth (1829-1894), profesor de cirugía en Zurich, Suiza, y en Viena, Austria. En su publicación del año 1862 “Observations on fever caused by wounds and accidental wounds diseases” señala: “La sustancia pirogénica está igualmente presente en material pútrido seco y pus seca como también en fluidos pútridos y pus fresca”. Independientemente el término “sustancia pirogénica” fue usada en 1873 por Bernhard Naunyn (1839-1925), profesor de medicina interna en Dorpat, Berna, Suiza, Königsberg, Rusia (hoy Kaliningrado), y Strasbourg, Francia, para designar a un definido principio productor de fiebre. Finalmente, Sir John Burdon-Sanderson (1828-1905), un eminente fisiologista y patologista británico señala en una revisión de 1896: “En 1875, preparé una sustancia de extracto pútrido de carne, la cual me aventuré a llamar pirógeno. Este producto estéril produce fiebre. Burdon-Sanderson intentó con aparente éxito parcial purificar su pirógeno a partir de material pútrido. Por supuesto, no es posible hoy en día decidir si las preparaciones obtenidas fueron endotoxinas o, quizá, concentrados de mediadores endógenos como interleucinas 1 y 6, o factor de necrosis tumoral  $\alpha$ . En cualquier caso, el mismo Burdon-Sanderson reflexionando en 1876 acerca del origen de la sustancia pirogénica, se preguntaba si era de origen endógeno, presente en la sangre o el fluido tisular. Alternativamente argüía, el material pirogénico podía provenir de una fuente exógena, como un microbio.



### El origen microbiano de toxinas y enfermedades

Los años 1870-1905 comprenden el periodo en el cual el concepto de que la infección es debida a microorganismos ganó terreno en el campo científico.<sup>40</sup> Las teorías competidoras del "*miasma*" y el "*contagio*" constituyen el marco conceptual dentro del que se desarrollaron los primeros trabajos que trataron de identificar al "veneno" que producía las enfermedades.

Impresionados por las emanaciones malolientes de los pacientes que sufren de la plaga y sus similitud con los vapores fétidos que emanan de marismas, los médicos llegaron a creer que el supuesto veneno era generado por la putrefacción (del griego para sepsis) de materia orgánica presente en las personas enfermas o en lugares como los pantanos. El mal aire de los pantanos, hoy en día aún presente en el término malaria = mal'aria, fue nombrado *miasma* (del griego "miainein", "polución") y se creía que esparcía el veneno, con lo que verosímilmente se explicaría la muerte por inhalación de miles de personas dentro de un corto período de tiempo. El modelo del miasma no podía, sin embargo, explicar por qué el aislamiento de los enfermos durante 40 días (cuarentena) a menudo impedía la propagación de la enfermedad.

Una creencia alterna, indicaba, que era un material venenoso no volátil el causante de las enfermedades. Este material, nombrado *contagio* (del latín "contigere" que significa "contacto"), también se pensaba que era producido por putrefacción de materia orgánica, como la carne, pero se transmitiría sólo por contacto directo.<sup>41</sup>

De modo que dos escuelas fueron creadas: una favoreciendo la idea del miasma, y la otra siguiendo el concepto de contagio.<sup>40</sup> Por supuesto, los contagionistas no podían explicar cómo un solo contacto con fluidos putrefactos, o de un paciente enfermo, podía transmitir tanto veneno que no sólo afectaba a un individuo, sino también a miles de personas, que podrían morir. Por consiguiente, un gran avance



intelectual fue postular que el veneno pútrido comunicado por el miasma o por contagio, podrían reproducirse en el individuo afectado, teniendo así, atributos de un organismo vivo. Esta revolucionaria idea fue formulada por Jacob Henle (1809-1885) (Fig. 6), profesor de patología y anatomía en Göttingen, Alemania, que sin saber acerca de los microbios, apuntó: "Un átomo del veneno de la viruela es capaz de causar una erupción de viruela en todo el cuerpo", lo que indica la multiplicación del material tóxico. Así, Henle, quien más tarde sería maestro de Robert Koch, promovió "la microbiología sin microbios" y se situó en un punto de transición entre las épocas pre-microbiana y microbiana.<sup>41</sup>

Tuvieron que pasar alrededor de 25 años para que fuera aceptada la idea de que la enfermedad era el resultado de la fermentación y putrefacción por microbios.



**Fig. 6. Jacob Henle**

Fuente: <http://www.ub.uni-heidelberg.de/Englisch/helios/digi/anatomie/henle.html>



Fue Louis Pasteur (1822-1895), en París, quien demostró convincentemente que la clase de desórdenes que hoy referimos como enfermedades infecciosas eran causadas por pequeños microorganismos animados, los cuales, asociados con el polvo en el aire, pueden ser transportados a cualquier lado y llegar a heridas, donde pueden multiplicarse y causar infección. Por algún tiempo se argumentó que un solo microorganismo, quizá en formas variadas, pudiera ser el responsable de diversas enfermedades. Billroth pensaba que un peculiar microorganismo, *Coccobacteria séptica*, causaba diversos tipos de infección. Consideraba que estas bacterias estaban presentes en tejidos sanos y normales y eran activadas para multiplicarse si el organismo humano era irritado por un “zymoid” (re ensamblaje enzimático) inflamatorio o séptico. Así, Billroth permanecía en la tradición de la teoría de la putrefacción endógena. En contraste, el bacteriólogo alemán Edwin Klebs (1834-1913), claramente declaraba que las infecciones severas eran causadas por microorganismos originados en fuentes externas y podían invadir tejido sano pero irritado. Durante la guerra Franco-Prusiana, Klebs realizó 115 autopsias entre el 17 de agosto y el 17 de octubre de 1870, y notó que no solo el 75% de las muertes se debían a la septicemia, sino que también la septicemia era causada por microorganismos, a los cuales denominó *Microsporon septicum*. En uno de sus reportes hace la siguiente declaración: “Durante el desarrollo de *Microsporon septicum* una sustancia productora de fiebre es generada...La fiebre continua es causada por el transporte constante de esta sustancia al interior del organismo”.

Fue Robert Koch (1834-1910), al final de su carrera como director del Instituto para Enfermedades Infecciosas de Berlín, quien caracterizó microorganismos como los agentes causantes de enfermedades específicas. Koch basó sus brillantes conclusiones inicialmente en animales de experimentación. La conexión con enfermedades



infecciosas humanas fue realizada primeramente por el profesor de cirugía escocés, Sir Alexander Ogston (1844-1929). Ogston aisló pus de pacientes y lo tiñó con anilina violeta. Ogston encontró en todo el pus bacterias aisladas, las cuales, si eran inoculadas en animales de experimentación, causaban septicemia. Fue, no obstante, Koch quien finalmente contribuyó en gran medida al entendimiento de la participación microbiana en heridas infectadas en 1880, sobre la base de sus experiencias con miles de soldados heridos en tiempo de guerra, provenientes de expediciones a países tales como Egipto y la India, los cuales sufrían desastrosas epidemias como el cólera, y soportó sus ideas con experimentación animal utilizando cultivos puros de bacterias como agentes infecciosos.

Gustave Roussy (1874-1948), un médico francés quien fundó cerca de París el Institut du Cancer de Villejuf, aisló, proveniente de bacterias, dos tipos de sustancias: una provocaba hipotermia (denominada *frigorigenina*) y la otra causaba fiebre (denominada *piretogenina*). Él creía que ambos principios residían en las bacterias y eran liberados por la acción lítica de enzimas corporales. Ludwig Brieger (1849-1919) analizó bacilos de tifoidea, los cuales habían sido descubiertos en 1880 por Joseph Eberth (1835-1926). Brieger demostró la generación de un material tóxico al cual llamó *tifotoxina*. De hecho, fue Brieger quien usó por primera vez el término *toxina*.

### **Acuñación del término Endotoxina**

En el contexto de la investigación de las endotoxinas, el año 1892 es de particular importancia. Durante 1892 y los años siguientes, dramáticos estallidos de cólera amenazaron las grandes ciudades portuarias, incluyendo Hamburgo en Alemania y San Petersburgo en Rusia, ocasionando solo en Hamburgo cerca de 17,000 casos de cólera y 8,600 muertos entre el 15 de agosto y el 12 de noviembre.



En el año de 1884, Robert Koch (Fig. 7), identifica a *Vibrio cholerae* como el agente microbiano causante del cólera, y activa investigaciones efectuadas en sus laboratorios para caracterizar los factores de reproducción de este microorganismo patógeno. Estudios desarrollados principalmente en Francia, Alemania y los Estados Unidos revelan que muchas bacterias patogénicas producen sustancias tóxicas, las cuales, en forma aislada, inducen muchas de las reacciones fatales observadas durante infecciones bacteriales severas. La toxina de la difteria fue aislada en 1888-90 de filtrados de cultivo por Pierre Paul Emile Roux (1853-1933) y Alexander Yersin (1863-1943) del Instituto Pasteur en París, demostró que eran de naturaleza proteínica, con lo que el concepto de que prácticamente todas las toxinas bacterianas eran proteínas fue aceptado absolutamente por algún tiempo. Entre los mejores colaboradores de Koch estaba Richard Pfeiffer (1858-1945). Pfeiffer, de hecho, observó que los vibrios de cólera liberaban una toxina proteínica dentro de un medio de cultivo, una exotoxina lábil al calor. Notó, sin embargo, que los vibrios de cólera producían, adicionalmente, una segunda toxina totalmente diferente aparentemente sujeta con firmeza a la superficie de la célula bacteriana.<sup>40</sup> Una sustancia resistente al calor que no era secretada por la célula bacteriana, pero se liberaba con la desintegración celular.<sup>39</sup> En su primera publicación acerca de la materia, Pfeiffer apunta: “En cultivos de cólera aeróbicos muy recientes, una sustancia tóxica específica es contenida, la cual ejerce efectos tóxicos extraordinariamente intensos. Este principio toxico de cólera se encuentra íntimamente sujeto, y probablemente sea una parte integral, del cuerpo de la bacteria. Con cloroformo, timol, o por medio de secado, los vibrios de cólera pueden ser lisados sin cambios detectables en la toxina”.<sup>40</sup> Pfeiffer denominó a este principio tóxico “endotoxina” para diferenciarlo de la exotoxina sensible al calor.<sup>42,43</sup>



**Fig. 7. Robert Koch, al microscopio, y Richard Pfeiffer.**

Fuente: <http://www.corbisimages.com/stock-photo/rights-managed/SF38191/dr-robert-koch-with-dr-richard-pfeiffer>

En su revisión de 1904, Alfred Wolff, médico de la Clínica Universitaria Médica de Munich, Alemania, escribe: “Richard Pfeiffer dio un nombre específico al sustrato bacterial que ejerce una acción tóxica definitivamente diferente de las ya conocidas toxinas. Denominándolo endotoxina. El creador de esta denominación basa su concepto en la correcta opinión de que este principio tóxico no es excretado por las bacterias vivas, pero se encuentra firmemente fijo a los constituyentes corporales de las mismas. En contraste con las toxinas típicas, esta sustancia venenosa no es secretada dentro de medios de cultivo, pero se puede liberar si la bacteria sufre lisis, llamada bacteriólisis.



### **Primeros pasos hacia la caracterización de la endotoxina**

Casi al mismo tiempo, un importante paso fue dado hacia la caracterización de la endotoxina por el italiano Eugenio Centanni (1863-1948), director del Instituto de Patología General de la Universidad de Bolonia. En 1894, comenzó la publicación de una serie de documentos, el primero de ellos titulado “Investigaciones de la fiebre infecciosa- la fiebre de toxinas bacteriales”.

En el capítulo 1 de *La fiebre de toxinas bacteriales*, Centanni describe la preparación de lo que él llamó *pyrotoxina bacterica*. En principio, él usó autolisados de largo plazo (mayores a 10 días) de cultivos puros bacterianos, trabajando un filtrado estéril de alcohol y otros procedimientos de fraccionamiento, al final consigue un polvo blanco estéril. Logrando producir más o menos el mismo material altamente pirogénico de una gran variedad de bacterias incluyendo *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, y otras. Finalmente declara: “De esta forma, podemos concluir que la familia entera de bacterias posee esencialmente la misma toxina, un veneno unido inseparablemente a su existencia y del cual depende el cuadro típico de molestias causadas por infecciones bacterianas”<sup>40,41</sup>. Centanni fue el primero en reconocer la íntima relación entre los principios pirogénicos y endotóxicos de las bacterias, químicamente inseparables, un hecho expresado en el término *pirotoxina*.

En 1898, el bacteriólogo y patólogo francés André Chantemesse (1851-1919) usando filtrados de cultivos de tifoidea mostró material que podía ser precipitado usando cloruro de calcio ( $\text{CaCl}_2$ ), que era tóxico para los animales de experimentación. También notó que los caballos eran particularmente sensibles al material y que los conejillos de indias respondían con hipotermia en lugar de fiebre, como los conejos. Numerosos investigadores trabajaron con filtrados bacteriales o extractos que debieron contener endotoxinas como principio activo.



Pfeiffer, Centanni, Ecker, Jona, Chantemesse, y otros estudiaron las endotoxinas presentes en autolisados de *Vibrio Cholerae*, *Escherichia coli*, y *Salmonella typhi*, pero no reportaron la aparición de material similar a endotoxina presente en cultivos tratados con calor o lisados de *Mycobacteria*, *Treponema*, *Streptococcus* o *Corynebacteria*. ¿De qué forma eran diferentes *Vibrio Cholerae*, *Escherichia coli*, y *Salmonella typhi* de otras bacterias, y qué tenían en común entre sí? Como se sabe hoy en día, las endotoxinas son producidas por un grupo de bacterias llamadas *gram-negativas*. Este término está relacionado al médico danés Hans-Christian Gram (1853-1939), quien en 1884 ideó un procedimiento de tinción por medio del cual el mundo de las bacterias pudo ser dividido en dos grupos principales. Las bacterias pertenecientes a un grupo son, después de ser teñidas con tinte azul, decolorizadas con alcohol, y son, por lo tanto, llamadas gram-negativas. En contraste, las bacterias gram-positivas como *Corynebacteria*, *Streptococcus* o *Staphilococcus* retienen el tinte y aparecen azules después de la tinción. El gran grupo de las bacterias gram-negativas comprende muchos patógenos importantes tales como *Vibrio cholerae*, *Salmonella typhi*, *Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, *Yersinia pestis* (causante de la plaga), *Neisseria meningitidis*, y *Hemophilus influenzae* (causante de meningitis en recién nacidos y niños), *Helicobacter pylori* (gastritis y úlceras duodenales), etc. Sabemos hoy en día que las bacterias gram-negativas en general –y sólo las gram-negativas– producen endotoxinas, el cual es un constituyente común de y, por lo tanto, característico de esta clase de microorganismos.



### Aislamiento y caracterización de endotoxinas

Es evidente que la endotoxina de Pfeiffer, la pirotóxina de Centanni, y los filtrados de Chantemesse fueron sólo pobres productos definidos y ciertamente representan mezclas de muchos componentes bacteriales. Tuvieron que pasar varias décadas antes de que los procedimientos de extracción selectiva fueran desarrollados permitiendo un examen más detallado de las toxinas.

Un gran pionero fue el microbiólogo francés André Boivin (1895-1949), quien, junto con la rumana Lydia Mesrobeanu (1908-1978), a la cual conoció cuando trabajaba en Bucarest, Rumania, idearon en 1932 el primer procedimiento aplicable generalmente para la extracción de endotoxinas de muchas bacterias gram-negativas: el método del ácido tricloroacético (TCA). En la base de su análisis, Boivin y Mesrobeanu llamaron al extracto tóxico purificado, y antigénico, *antígenos glycido-lipídiques* para indicar que el principal componente era de naturaleza polisacárida y lípida, con sólo una pequeña cantidad de proteínas adicionales.

Usando un procedimiento similar, Walter T.J. Morgan en Londres y Walther F. Goebel (1899-1994) en Nueva York desarrollaron avanzados procedimientos de extracción utilizando mezclas de solventes orgánicos y agua. Sus sustancias purificadas, similares a las de Boivin y Mesrobeanu, estaban compuestas de polisacáridos, lípidos y proteínas.

En los años 40's, Walther F. Goebel en Nueva York, trabajando con *Shigella sonnei* y *Shigella flexneri*, mostró junto con Cloe Tal que las preparaciones bioactivas contenían un componente firmemente ligado, al cual llamaron *componente tóxico T*. Con un tratamiento ácido moderado obtuvo polisacárido O-específico hapténico (polisacárido degradado de Morgan) y proteína tóxica: *proteína T* (proteína conjugada de Morgan). En contraste, con tratamiento alcalino y fraccionamiento con alcohol fue capaz de aislar un polisacárido





tóxico O-antigénico (polisacárido T), y una proteína no tóxica (proteína simple de Morgan). En el complejo O-antigénico, sin embargo, el componente T aparece en forma de ligando entre el polisacárido O-antigénico y la proteína, así, esto dependía del procedimiento de disociación. Goebel obtuvo dos diferentes sustancias en las que T se encontraba ligada al polisacárido o a la proteína. La naturaleza química del compuesto T, sin embargo, continuaba siendo oscura pasaría un largo tiempo para ser identificada como el principio bioactivo de la endotoxina, el componente lípido-A. Goebel y sus colaboradores llamaron al material bioactivo obtenido de *Shigella flexneri*, *carbohidrato tóxico*, y al aislado de *Shigella sonnei*, *lipocarbohidrato*. Otro aspecto interesante de estos antígenos bacterianos fue descrito en 1934 por Gough y Frank M. Burnet. Estos autores aislaron extractos bacterianos consistentes principalmente de lipopolisacárido. Ellos demostraron que esta fracción de lipopolisacárido era importante no sólo por sus propiedades serológicas, sino también –y esto era nuevo– por la susceptibilidad de la bacteria a ser fagocitada.

Goebel y Burnet, como otros, usaron el término antígeno-O o antígeno somático, y de este último consideramos una breve reflexión acerca de su origen. El crédito por el descubrimiento de los antígenos O y H, se debe al microbiólogo americano Theobald Smith (1859-1934), Smith, al final de su carrera como director del Departamento de Patología de Plantas y Animales del Instituto Rockefeller para Investigación Médica de Princeton. Junto con A.L. Reagh descubre las aglutininas (anticuerpos) antibacteriales que quizá atacaban dos distintos tipos de componentes microbianos, por ejemplo, estructuras termolábiles y estructuras resistentes al calor asociadas al cuerpo (del griego, *soma*) de las bacterias. Al mismo tiempo, un estudio de A. Joos, quien trabajaba con bacterias del género *Salmonella typhi*, arrojaban datos similares.



Al principio de la década de 1940's, Murray Shear y colegas siguen los estudios de William Bradley Coley (1862-1936), un médico que trabajaba en Nueva York, quien utilizó una mezcla pirogénica altamente activa, de bacterias vivas y después muertas, compuesta por *Serratia marcescens* (*Bacillus prodigiosus*) y *Streptococcus* (toxina de Coley), para tratar a pacientes con carcinomas y sarcomas. En sus intentos por aislar el agente necrotizante tumoral de *Serratia marcescens*, el principio activo de la vacuna de Coley, un material fue obtenido por Shear, el proceso analítico del mismo indicaba la presencia principal de polisacáridos y material lipídico junto con cantidades pequeñas de proteína. Para designar a este compuesto, en 1934 Shear y sus colaboradores introducen el término *lipopolisacárido*.

Al final de los años 40's, Otto Westphal y Otto Lüderitz (Fig. 8 y 9), trabajando primero en el Wander Forschungsinstitut (Säckingen, Alemania) y después en el Instituto Max Planck de Inmunobiología (Freiburg, Alemania), iniciaron su trabajo sistemático del principio tóxico y productor de fiebre de *Salmonella entérica*, *Escherichia coli*, y otras enterobacterias. Demostraron que la actividad pirogénica reside principalmente en el complejo antígeno-O por medio de pruebas de todos los componentes característicos. El polisacárido no degradado (polisacárido T de Goebel) fue altamente pirogénico, la proteína conjugada (proteína T de Goebel) un tanto menos, mientras que el polisacárido degradado y la proteína simple estaban completamente desprovistos de actividad pirogénica. Westphal y colaboradores desarrollaron un nuevo y eficiente procedimiento para ser aplicado a una gran variedad de bacterias gram-negativas, por medio del cual, el material biológicamente activo podía ser extraído en gran cantidad y de forma pura: el método *extracción fenol-agua caliente*. El desarrollo de este método probó ser la piedra miliar en la investigación de las endotoxinas. La aplicación de este método ofrece preparaciones esencialmente libres de proteínas, y consisten sólo de carbohidratos,

fósforo y ácidos grasos. Estas preparaciones exhiben una actividad biológica extrema; con una dosis intravenosa tan pequeña como 1 ng/kg causa fiebre en seres humanos. Para designar a este material, Westphal y Lüderitz usaron el término lipopolisacárido (LPS) a lo largo de sus trabajos.

Es obvio que el término lipopolisacárido no fue generalmente aceptado en su tiempo. Otros términos como *lipopolisacárido endotóxico*, propuesto después, no recibió la amplia aceptación que después tendría el término *lipopolisacárido*. Los estudios químicos, serológicos y biológicos del equipo Westphal-Lüderitz también establecieron que la endotoxina, pirotoxina, antígeno-O, y el lipopolisacárido (LPS) eran uno y el mismo componente bacterial y que tanto las bacterias patogénicas como las no patogénicas portaban esta molécula. La disponibilidad de LPS puro permitió finalmente realizar estudios como los de la definición de aquellas regiones responsables de la endotoxicidad, pirogenicidad, y propiedades O-antigénicas del LPS, así como la clarificación de su estructura química.<sup>40</sup>



**Fig. 8. Otto Westphal**



**Fig. 9. Otto Lüderitz**

Fuente: <http://www3.ie-freiburg.mpg.de/overview/previous-directors-of-the-institute/>



## **7.2. ESTRUCTURA**

El LPS es una molécula glicolípídica anclada a la membrana externa y considerada como el antígeno de superficie más importante de las bacterias gram-negativas, se estima que una bacteria gram-negativa posee unas  $3,5 * 10^6$  moléculas de LPS que ocupan un área de  $4,9 \mu\text{m}^2$ , si la superficie aproximada de una bacteria oscila entre  $6-9 \mu\text{m}^2$  el LPS correspondería a las  $\frac{3}{4}$  partes de la superficie bacteriana, siendo así el mayor componente de la membrana externa en este tipo de microorganismos.<sup>44</sup> Como el término lipopolisacárido implica, la endotoxina se compone de un lípido y una porción de polisacárido.

La parte de polisacárido comprende a la cadena-O específica (antígeno O ó Polisacárido O) y al núcleo. La cadena-O específica es característica y única para cada cepa bacteriana y altamente antigénica. Esta determina la especificidad serológica. El núcleo oligosacárido muestra una menor diversidad.<sup>42</sup> Este a su vez se subdivide en *core externo* (formado por exosas), mediante el cual se une al antígeno O; y el *core interno* (formado por heptosas). El lípido A se une a esta porción mediante un residuo llamado KDO (ácido 2-keto-3-deoxioctanoico).<sup>45</sup> La parte lípida, denominada lípido A, constituye la porción menos variable. El lípido A, ha sido identificado como el componente del LPS responsable de la actividad endotóxica.<sup>42</sup>

### **7.2.1. LÍPIDO A**

El LPS mejor caracterizado proviene de la familia de las enterobacterias, como *Escherichia coli*.<sup>40</sup> La estructura química del lípido A expresado por *Escherichia coli* consta de un disacárido de glucosamina (GLcN2N) con enlace  $\beta$  (1-6), acilado con residuos 3-hidroxi-*miristato* (3-OH-C14) en las posiciones 2, 3, 2', 3' y fosforilado en 1 y 4'. Además, los ácidos grasos de las posiciones 2' y 3' se encuentran esterificados con otros ácidos grasos, normalmente *miristato* y *laureato*. Algunas bacterias gram-negativas expresan



variaciones de la estructura anterior. Estas variaciones se refieren tanto a la longitud, número y posición de los ácidos grasos como a la presencia de fosfatos y la composición del disacárido. En el caso de *Pseudomonas aeruginosa*, el disacárido de glucosamina está acilado con ácidos grasos 3-OH-C10 en las posiciones 2 y 2' y con ácidos grasos 3-OH-C12 en las posiciones 3 y 3'. El lípido A de *Helicobacter pylori* contiene ácidos grasos más largos, n3-OH-C16 y 3-OH-C18, que los que contienen los lípidos A de *Escherichia coli* y *Salmonella*. Otras bacterias, como *Brucella* y *Bartonella*, poseen un ácido graso inusual: 27-OHC18. En cuanto a la composición del disacárido, algunas bacterias como *Nitrobacter*, *Brucella* y *Legionella* poseen 2,3-dideoxi-2,3-diamino-D-glucosa (GlcN3N) en lugar de GlcN2N. También existen variaciones en cuanto al grado de fosforilación. Así, *Rhizobium etti*, *Francisella* y *Helicobacter pylori* expresan un lípido A monofosforilado debido a la acción de una fosfatasa.

Se ha descrito que algunas bacterias gram negativas, entre las que se encuentran *Escherichia coli* y *Salmonella enterica*, modifican el lípido A en respuesta a las variaciones del medio de cultivo. Algunas de estas modificaciones consisten en sustituciones de laureato por palmitato, hidroxilaciones de un grupo miristato, deacilaciones y/o la adición de fosfoetanolamina (pEtN), aminoarabinosa y palmitato al lípido A.<sup>46</sup>

El LPS de las bacterias orales tiene la misma estructura general del lípido A que, las mejor conocidas, del tipo enterobacterial. Sin embargo, son pocas las especies orales en que la estructura del lípido A es conocida completamente, por lo que es claro que existe una gran diversidad.<sup>40</sup>

### **7.2.2. NÚCLEO (CORE)**

Unido al lípido A se encuentra el núcleo. Éste es un oligosacárido que, a su vez, se divide en núcleo interno y núcleo externo. El núcleo interno está unido al lípido A y está formado por ácido 2-ceto-3-deoxi-D-mano-



octulosónico (Kdo) y heptosas (Hep). Los residuos Kdo presentan cargas negativas en el grupo carboxi y las heptosas a menudo están modificadas con grupos fosfato. Esta área densa de cargas negativas, junto con las cargas negativas del lípido A, constituye un lugar de unión de cationes divalentes y también de poliaminas, como la putrescina, la cadaverina, la espermina y la espermidina. El núcleo externo, que se sitúa entre el núcleo interno y la cadena O, está formado por hexosas como glucosa (Glc), galactosa (Gal) y Nacetilglucosamina (GlcNAc). La estructura del núcleo está bastante conservada, especialmente dentro de la misma familia de bacterias. A pesar de ello, la adición no estequiométrica de otros azúcares y grupos fosfatos contribuye a crear cierta heterogeneidad entre las moléculas de LPS presentes incluso dentro de un mismo cultivo bacteriano.

### **7.2.3. CADENA-O ESPECÍFICA**

La cadena O es la región del LPS más expuesta al medio externo, por lo que sus características son esenciales para la supervivencia de la bacteria en diferentes ambientes. Es un polisacárido de gran variabilidad en cuanto a la longitud y tipos de azúcar presentes, y contiene los determinantes antigénicos responsables de la especificidad serológica del microorganismo. Existen cadenas O heteropoliméricas y homopoliméricas. Las cadenas heteropoliméricas están formadas por repeticiones, entre 10 y 30, de un oligosacárido que contiene entre 2 y 8 azúcares. Dentro de una misma cepa bacteriana existen moléculas de LPS que difieren en el número de repeticiones de esa unidad básica, lo cual produce un patrón de migración característico, en “escalera”, al separar las moléculas de LPS mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE). Las cadenas homopoliméricas están formadas por repeticiones de un azúcar dando lugar a un patrón de migración característico en forma de mancha.<sup>46</sup>

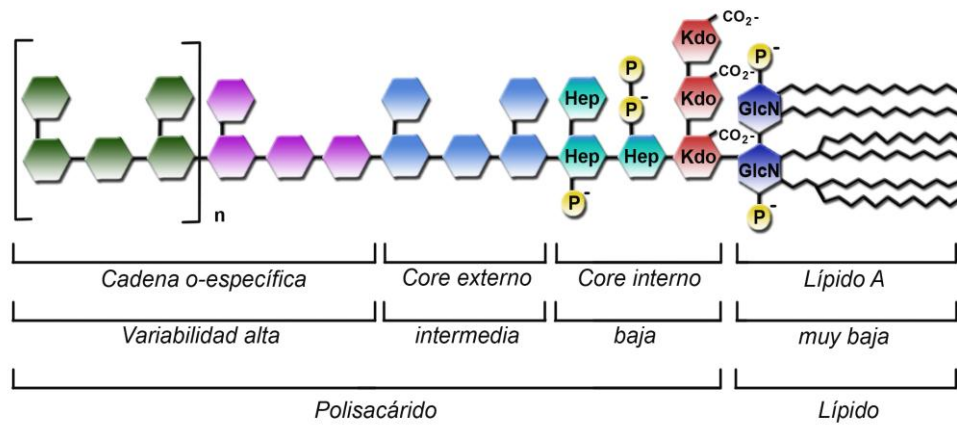


#### **7.2.4. MORFOLOGÍA**

Las cepas de las especies de *Salmonella*, *Escherichia coli* y otras bacterias gram-negativas capaces de sintetizar moléculas de lipopolisacárido completas se denominan cepas lisas, por su morfología colonial. Estos organismos reaccionan con anticuerpos específicos contra sus cadenas O, y usualmente forman colonias de apariencia lisa cuando crecen en medios sólidos. En contraste, las cepas incapaces de sintetizar polisacárido O son llamadas “rugosas”, dado que en la mayoría de los casos exhiben una morfología colonial rugosa. Los mutantes rugosos (R) de enterobacterias se originan por mutaciones que afectan cualesquiera de los diferentes pasos en la biosíntesis de la cadena O del núcleo.

La estructura mínima de lipopolisacárido necesaria para el crecimiento de *Escherichia coli* y otras bacterias gram-negativas consiste de lípido A y dos unidades de ácido 3-desoxi manooctulosónico (Kdo). Este motivo es sumamente conservado entre los distintos grupos bacterianos, y todas las porciones de la molécula distales a los residuos de Kdo no son estrictamente esenciales para el crecimiento y función celulares. Asimismo, la estructura mínima de LPS es activa como endotoxina.

No obstante, las cepas mutantes que contienen la estructura mínima de LPS son hipersensibles a antibióticos hidrofóbicos, detergentes y algunos colorantes (8), de lo cual se sugiere que el poseer la estructura completa de LPS le da ventajas evolutivas a la bacteria al ser más resistente a las condiciones ambientales.<sup>47</sup> (Fig. 10)



**Fig. 10. Estructura y variabilidad del Lipopolisacárido.** Fuente: Modificado de Beutler B., Rietschel E. Innate immune sensing and its roots: the story of endotoxin. 2003.





### **7.3. ACCIÓN ENDOTÓXICA**

El LPS es la más importante macromolécula de la superficie exterior de microorganismos gram-negativos, y se une al complejo de proteínas receptor de tipo Toll (TLR) 4-MD-2-CD14. Sin embargo, el LPS de *Porphyromonas gingivalis* difiere del LPS de las enterobacterias, en que también señala a través de TLR2 y es menos potente en la inducción de una reacción inflamatoria.

Tras el acoplamiento del receptor, el LPS desencadena una cascada de señalización intracelular, que implica la transactivación nuclear de NF- $\kappa$ B.<sup>48</sup>

La señalización a través de los receptores Toll TLR2 y TLR4, es uno de los principales mecanismos moleculares para la detección de bacterias gram-negativas y sus factores de virulencia, por las células del hospedero.

Las vías de señalización TLR2 y TLR4 involucran a una cascada de mediadores, incluyendo a la proteína o factor de diferenciación mieloide-88 (MyD88), al receptor quinasa asociado a IL-1 (IRAK) y al receptor factor-6 asociado a TNF (TRAF-6). La señalización de transducción disparada por los ligandos de receptores Toll, induce la activación de dos distintas vías.

Una vía conduce a la activación de la proteína 1-activadora, a través de la proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK), y la otra mejora la actividad del inhibidor de complejo de factor nuclear  $\kappa$ B-quinasa, que induce la liberación del factor nuclear (NF- $\kappa$ B) y la expresión de citocinas y quimiocinas.<sup>49</sup>



### **7.3.1. RECONOCIMIENTO**

Cuando el LPS es liberado de la membrana externa de la bacteria, como consecuencia de la multiplicación o lisis, y se encuentra en el interior del organismo hospedero, la proteína de unión al LPS (LBP) se liga a él y facilita el proceso de presentación a células que expresan CD14, como macrófagos y monocitos.<sup>50</sup> LBP es una glicoproteína sérica de fase aguda de 60 kDa<sup>51</sup>, que se liga al LPS y actúa como una opsonina para las bacterias gram-negativas.<sup>52</sup> CD14 es una glicoproteína, y también un antígeno de diferenciación mieloide, de aproximadamente 50 kDa, expresado en células mielomonocíticas (monocitos, macrófagos, polimorfonucleares), y también en células endoteliales, como una molécula glicosilfosfatidilinositol-anclada (anclaje GPI) a la membrana celular (mCD14), o como una molécula soluble (sCD14) en circulación.<sup>51</sup> CD14 no posee dominio intracitoplasmático y tiene como función principal transferir el LPS al complejo encargado de su reconocimiento (TLR4/MD-2).<sup>44</sup>

El receptor TLR4 (receptor toll o receptor de proteína transmembrana) requiere la presencia de una molécula de asociación, para la localización en la superficie celular y la iniciación de la señalización.<sup>53</sup>

La glicoproteína soluble, MD-2, actúa como un adaptador extracelular de proteína en la activación de TLR4, formando un complejo estable con el dominio extracelular de TLR4 y es esencial para que la señalización de LPS se produzca. Como una forma mutante (C95Y) suprime completamente las respuestas LPS.

El complejo LPS-LBP-MD-2 se asocia con el receptor TLR4 a través de repeticiones ricas en leucina de TLR4, lo que induce la agregación y transducción de señal.<sup>54</sup>

Una vez se ha formado el complejo LPS-TLR4/MD-2, el TLR4 sufre una oligomerización y recluta a sus adaptadores de cascada mediante interacciones con proteínas celulares que poseen dominios TIR (receptor Toll de interleucina-1). Los dominios TIR contienen tres



regiones altamente conservadas, por las que median interacciones proteína-proteína entre los TLRs y las proteínas adaptadoras transductoras de señal. Existen cinco proteínas celulares adaptadoras con dominios TIR, utilizadas por el TLR4: MyD88 (proteína de diferenciación mieloide); TIRAP (proteína adaptadora del dominio TIR, también conocida como Mal, adaptador similar a MyD88), TRIF (proteína adaptadora asociada al dominio TIR inductora de IFN- $\beta$ ), TRAM (molécula adaptadora relacionada con el TRIF) y SARM (proteína inhibidora de la señal del TRIF). Diferentes receptores Toll utilizan diferentes combinaciones de proteínas adaptadoras para determinar su cascada de señalización. Es interesante apuntar que TLR4 es el único TLR conocido que utiliza todas las proteínas adaptadoras.<sup>44,55</sup>

### **7.3.2. VÍAS DE TRANSDUCCIÓN**

La señal de transducción del LPS a través del TLR4 ha sido dividida en dos rutas, la vía dependiente de la proteína MyD88 y la vía independiente de MyD88 (dependiente de TRIF). La primera es responsable de la expresión de citocinas proinflamatorias, mientras que la segunda vía media la inducción de interferones.

#### **Vía dependiente de MyD88**

En adición al dominio TIR, MyD88 también contiene un dominio de muerte (DD), por medio del cual recluta a otras moléculas que contienen dominios de muerte a través de interacciones homotípicas. Una vez que LPS la estimula, MyD88 recluta y activa al dominio de muerte de quinasa-4 receptor asociado a IL-1 (IRAK-4). La evidencia bioquímica sugiere que IRAK-4 es responsable del subsecuente reclutamiento, activación y degradación de IRAK-1.

Otra proteína adaptadora TRAF6 (factor 6 asociado al receptor TNF), crítico para la vía MyD88-dependiente tras las reacciones de IRAK-4 e



IRAK-1, forma un complejo con UBC13 (enzima conjugadora-ubiquitina 13), y con UEV1A (enzima conjugadora-ubiquitina E2 variante 1 isoforma A), y activa a la quinasa 1 activada por el factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TAK-1). TAK-1 activa a IKK (quinasa I $\kappa$ B) y a la vía de las MAPK (proteínas quinasa activadas por mitógeno). IKK $\alpha$ , IKK $\beta$  e IKK $\gamma$  forman un complejo que fosforila a las proteínas I $\kappa$ B (inhibidor de la cadena ligera del gen aumentador en células B). Esta fosforilación conlleva a la degradación de las proteínas I $\kappa$ B y la subsecuente translocación del factor de transcripción nuclear (NF- $\kappa$ B), que controla la expresión de citocinas proinflamatorias, así como otros genes inmunes relacionados. La activación de la cascada de la vía MAPK conduce a la inducción de otro factor de transcripción: AP-1, el cual tiene un papel en la expresión de citocinas proinflamatorias. Adicionalmente a NF- $\kappa$ B y MAPK, I $\kappa$ B $\zeta$  e IRF5 (factor 5 de regulación de interferón) son dos importantes factores de la cascada de MyD88. En conjunto, todos estos factores colaboran para definir la cascada de reacciones de la vía MyD88, regulando la transcripción de citocinas proinflamatorias.

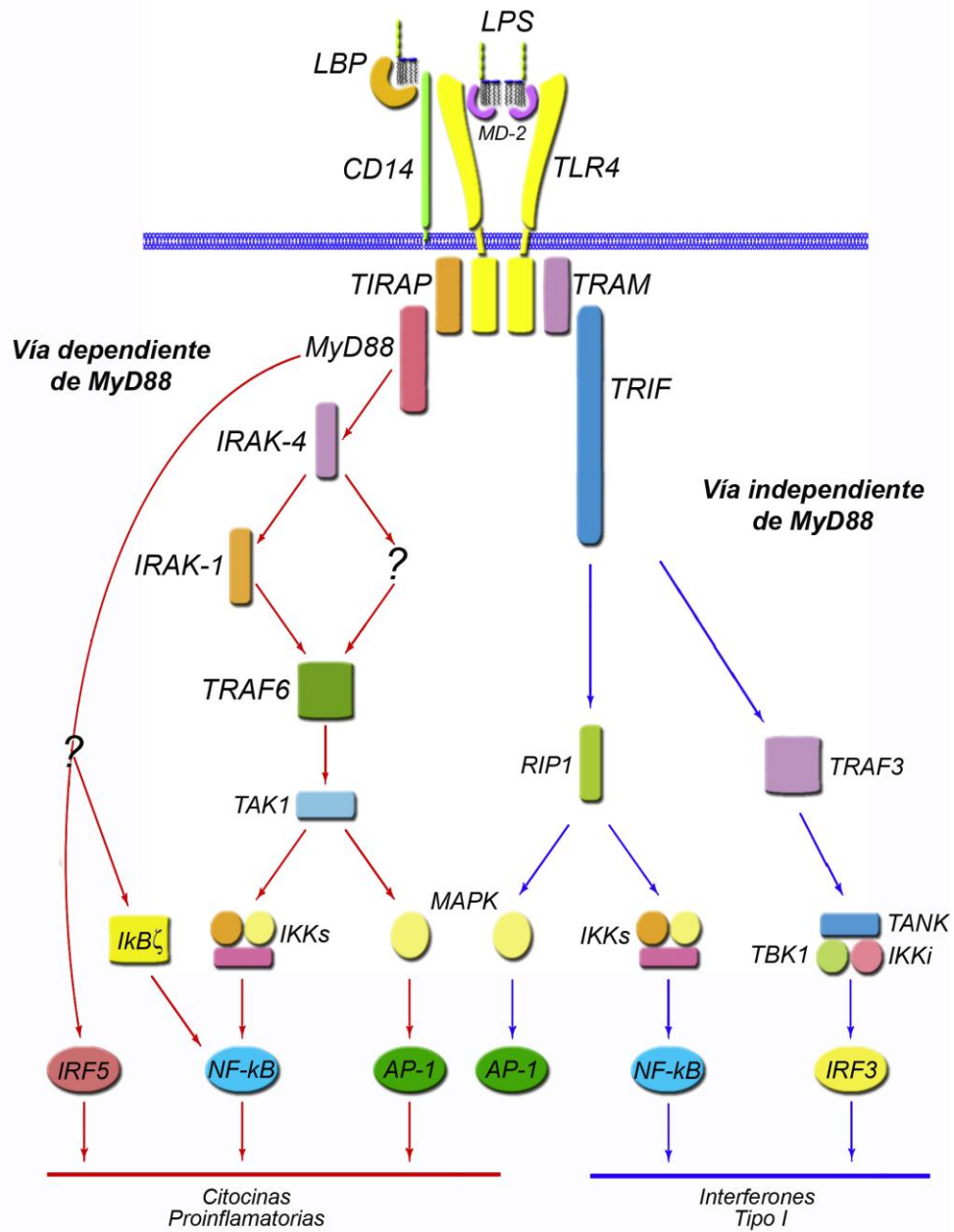
### **Vía independiente de MyD88**

TRIF es una importante proteína que media la señalización independiente de MyD88, jugando un papel clave en la activación del factor de transcripción IRF3, y la fase de activación tardía de NF- $\kappa$ B y MAPK. La región terminal C de TRIF, que contiene un motivo de interacción homotípica RIP (RHIM), media la interacción con RIP1 (receptor interactivo de proteína 1). Como una serina/treonina cinasa, RIP1 es un importante componente de la activación NF- $\kappa$ B mediada por TNF $\alpha$ . La ausencia de RIP1 conlleva a una falla de la activación NF- $\kappa$ B dependiente de TRIF. Sin embargo, RIP1 no es responsable de la activación de IRF3 inducida por LPS.

Estudios recientes sugieren que TRIF recluta a TRAF3 para activar



IRF3. TRAF3 puede asociarse con TANK (familia de miembros asociados a TRAF activadores de NF- $\kappa$ B), TBK1 (cinasa 1 ligada a TANK) e IKKi para mediar la cascada de señalización. TBK1 e IKKi son mediadores importantes para la dimerización y traslocación de IRF3. IRF3, junto con NF- $\kappa$ B, activa la transcripción de genes blanco, como los de interferones Tipo 1. La inducción de interferones Tipo 1 y los genes inductores de interferón son importantes para las respuestas antiviral y antibacteriana.<sup>55</sup> (Fig. 11)



**Fig. 11. Vías de transducción.** La vía dependiente de MyD88 activa IRAKs /TRAF6, así como los factores de transcripción NF-κB, AP y 1-5-IRF cascada abajo. Estos factores de transcripción inducen la expresión de genes citoquina proinflamatoria. La vía de independiente de MyD88. TRIF señala la inducción de Interferones de tipo I mediante el reclutamiento de TRAF3 y RIP1 para activar al factor de transcripción IRF3, así como NF-κB y 1-AP. Fuente: Modificado de Lu Y., Yeh W., Ohashi P. LPS/TLR4 signal transduction pathway. 2008.



### Cascada MAPK

El conjunto de las proteinquinasas activadas por mitógeno (MAPK) participa en gran medida en las señales intracelulares. Esta familia consta de PK (proteinquinasas) que fosforilan restos de serina-treonina y tirosina-treonina. Según diferentes estudios *in vitro*, existen al menos cuatro subgrupos de MAPK, tres de los cuales se relacionan con las respuestas inducidas por el LPS.

Una primera secuencia de activación MAPK, al parecer comienza mediante el efector Ras, que interactúa con la molécula Raf-1 para fosforilar a la quinasa-1 de la cascada, llamada MEK (MKK-1 o MEK-1), que a su vez fosforila a las ERK (quinasas reguladas por señales extracelulares). Los sustratos de éstas pueden ser los factores de transcripción ELK-1 y c-Myc entre otros, proteínas citoplasmáticas como la fosfolipasa A<sub>2</sub> citosólica (PLA<sub>2c</sub>), y diferentes PK. La fosforilación de PLA<sub>2c</sub> da lugar a la producción de ácido araquidónico, con la consecuente activación de formas no clásicas de PKC y producción de eicosanoides.

Otra vía de las MAPK incluye el conjunto proteínas que forman la subfamilia de PK del factor de transcripción c-Jun (JNK). Una vez activadas, Rac y/o Cdc42, pequeñas proteínas G (ppG), se unen y activan a la quinasa PAK1, se activa MEKK-1 (implicada en la activación de NF-κB) y se suceden fosforilaciones sucesivas de las MKK4/7 y JNK1/2 asociadas a la fosforilación de factores de transcripción, entre ellos c-Jun, AP-1 (proteína activadora 1) y CREB (proteína de unión de elementos de respuesta al adenosín monofosfato cíclico –AMPC–).

Las p38 MAPK forman la otra familia de este tipo de proteínas implicadas en la activación celular por LPS. Se sabe que MKK5 actúa sobre las MKK3/6 y éstas fosforilan a las p38.



Los sustratos de la familia p38 MAPK son diversos factores de transcripción, enzimas como la PLA<sub>2</sub>c y diversas PK, en algunos casos iguales a las activadas por ERK.<sup>45</sup>

La estimulación del receptor TLR4, la producción de interferones tipo 1 y de citoquinas proinflamatorias inducen varios tipos de respuestas en el organismo tales como, aumento en la permeabilidad vascular, aumento en la expresión de moléculas de adhesión en leucocitos y células endoteliales, estimulación de la producción de nuevas citocinas y quimiocinas, extravasación de neutrófilos para que migren a través del endotelio a los epitelios, activación del factor XII de la coagulación, la fibrinólisis y la vía clásica del complemento. Por ende deben existir vías de inhibición de la señal de transducción del LPS que tiene como fin proteger al hospedero del daño inducido por el LPS.<sup>44</sup>

### **7.3.3. REGULACIÓN NEGATIVA DE LA SEÑALIZACIÓN**

El bloqueo de la señal emitida por el TLR4 puede ocurrir a través de proteínas de superficie celular o por proteínas a nivel citoplasmático; a nivel citoplasmático se encuentran las proteínas TIRAF1 – TIRAF4 (factor 1/4 asociado al receptor de TNF) e IRAK-M (Kinasa 4 asociada al receptor de IL-1) que inhiben al NF-κB y a la proteína MyD88 respectivamente; las proteínas RP105 (radioprotector 105), ST2 L (análogo del receptor de IL-1) y la SIGIRR (molécula relacionada con la inmunoglobulina 1) se expresan en la superficie de las células e inhiben directamente al receptor TLR4, a la proteína MyD88 y al TIRAP respectivamente.<sup>44</sup> Por interacción directa con TLR4/MD-2, RP105/MD-1 puede inhibir la asociación entre LPS y TLR4/MD-2. ST2 L puede interactuar con MyD88 y TIRAP e inhibir sus funciones por medio de secuestro, lo que impide su reclutamiento por TLR4. Por último, SIGIRR inhibe la interacción de TLR4 con MyD88 a través del dominio TIR de SIGIRR.



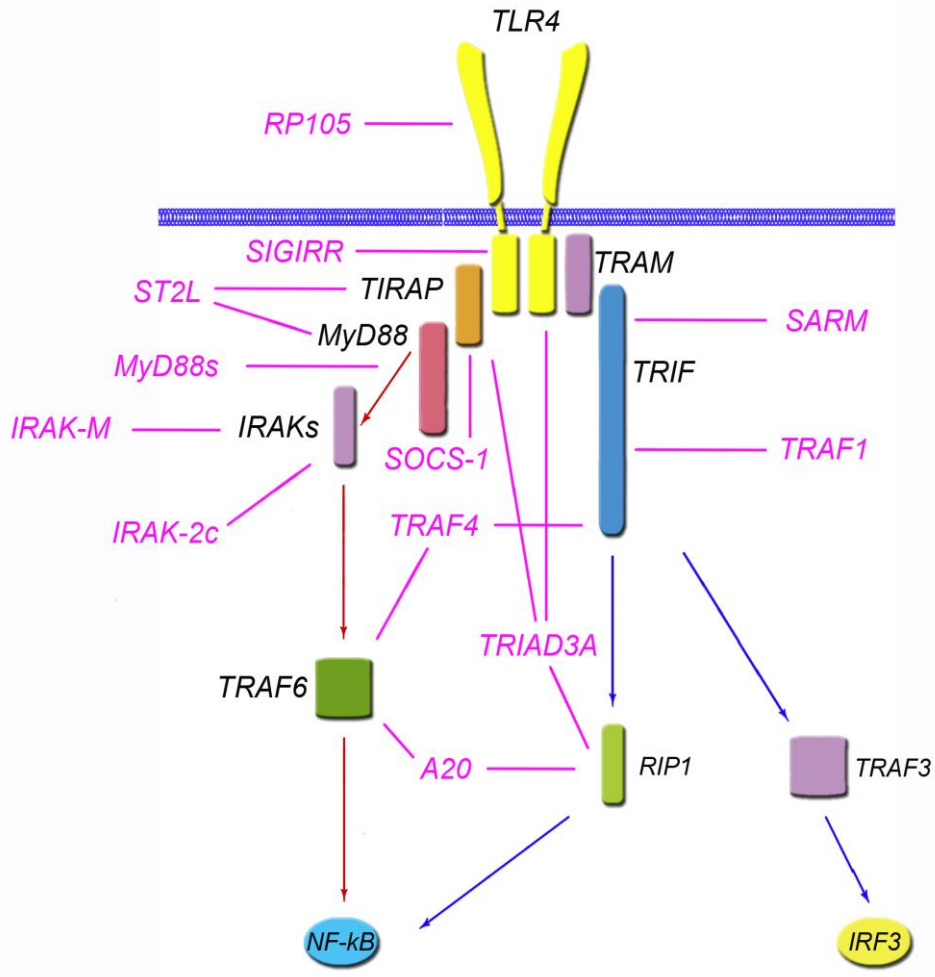


TRIAD3A (proteína 3 con dominio triada variante A) y SOCS-1 (supresor de señalización 1 citocina) son dos ligasas de proteína ubiquitina E3 involucradas en la señalización LPS/TLR4. TRIAD3A puede interactuar con ciertas proteínas que contienen dominio TIR, como TIRAP, TRIF y RIP1. La sobreexpresión de TRIAD3A puede promover la degradación de TLR4, TIRAP, TRIF y RIP1, regulando a la baja la activación de NF- $\kappa$ B. SOCS-1 puede inducir la ubiquinación de TIRAP lo que conduce a su subsecuente degradación.

Otras proteínas intracelulares reguladoras-negativas actúan más abajo en la cascada de señalización. Como IRAK-M, que pertenece a la familia IRAK pero carece de actividad quinasa. Los estudios sugieren que IRAK-M inhibe la señalización por MyD88, mediante la prevención de la disociación de los IRAKs de MyD88. IRAK-2c y MyD88s son variantes de empalme de IRAK-2 y MyD88, respectivamente, y también se involucran en la inhibición de la señalización debido a su falta de dominios funcionales. TRAF1 y TRAF4 pertenecen a la familia TRAF, pero sirven como reguladores negativos de la señalización de TLR4. TRIF induce la escisión de TRAF1 por caspasas (probablemente caspasa-8) y el fragmento escindido de TRAF1 puede inhibir la inducción de NF- $\kappa$ B por TRIF y la activación de IRF3. Interactuando como un bucle de retroalimentación negativa. La sobreexpresión de TRAF4 puede inhibir la activación de NF- $\kappa$ B posiblemente a través de interacción con TRIF y TRAF6. A20 es una enzima desubiquitinizadora, que puede eliminar restos de ubiquitina de TRAF6 para inhibir la señalización cascada abajo.

Varias proteínas inhibidoras, incluyendo A20 y IRAK-M, pueden ser inducidas por la estimulación de LPS y proporcionar potencial inhibición de los mecanismos de retroalimentación para terminar los eventos de señalización de cascada TLR4.<sup>55</sup> (Fig. 12)

Cuando los mecanismos inhibitorios se agotan y prevalecen las respuestas inducidas por el LPS, los eventos mencionados pueden terminar en *shock* endotóxico, falla multiorgánica y muerte del hospedero.<sup>44</sup>



**Fig. 12. Reguladores de señalización LPS/TLR4.** Los factores de regulación negativa tienen diversos blancos a múltiples niveles de la señalización. Algunas moléculas, RP105 y SIGIRR, inhiben la iniciación de la cascada de señalización. Otros factores actúan más adelante a través de diferentes mecanismos descritos en el texto. Fuente: Modificado de Lu Y., Yeh W., Ohashi P. LPS/TLR4 signal transduction pathway. 2008.



## **8.- CONCLUSIONES**

El LPS juega un importante papel tanto en el reconocimiento de microorganismos con potencial patogénico, como en el establecimiento de una respuesta inmune temprana por parte del organismo. El conocimiento de las funciones de esta compleja molécula en el ciclo vital de las bacterias gram-negativas y su importancia en el mantenimiento de la integridad de éstos microorganismos, así como de las respuestas que desencadena en las células del hospedero, tales como sus vías de señalización y regulación, una vez que ha sido liberado de la membrana externa bacteriana, proporciona información vital para entender los mecanismos por medio de los cuales se inicia la enfermedad periodontal, y la forma en que ésta evoluciona hasta presentar pérdida severa de tejidos, así como dental. Así mismo, el ulterior desarrollo de métodos terapéuticos, como la producción de nuevos fármacos, eficaces en el tratamiento de patologías derivadas de infecciones por bacterias gram-negativas depende en gran parte de la comprensión a fondo de su estructura química.

Por otro lado la interacción de patrones moleculares asociados a patógenos, como el LPS, con los receptores celulares, ha permitido tener un panorama más amplio de los mecanismos de la inmunidad innata, muchos de ellos aún por dilucidar, y obliga a que nociones tales como su propiedad inespecífica deban ser reevaluadas a la luz de los descubrimientos recientes.



## 9. BIBLIOGRAFÍA

---

1. Akira S., Uematsu S., Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*. 2006; 124: 783-801.
2. Royet J. Infectious non-self recognition in invertebrates: lessons from *Drosophila* and other insect models. *Mol. Immun.* 2004; 41: 1063-1075.
3. Netea M., van der Graff C., van der Meer J., Kulberg B. Toll-like receptors and the host defense against microbial pathogens: bringing specificity to the innate-immune system. *Jour. Leuk. Biol.* 2004; 75: 749-755.
4. Janeway C. Medzhitov R. Innate Immune Recognition. *Annu. Rev. Immun.* 2002; 20: 197-216.
5. Jeong E., Lee J. Intrinsic and extrinsic regulation of Innate Immune receptors. *Yons. Med. J.* 2011; 52(3): 379-392.
6. Ray A., Cot M., Puzo G., Gilleron M., Nigou J. Bacterial cell wall macroamphiphiles: Pathogen-/microbe-associated molecular patterns detected by mammalian innate immune system. *Biochim.* 2012; Epub ahead to print.
7. Akira S., Hemmi H., Recognition of pathogen-associated molecular patterns by TLR family. *Immunol. Let.* 2003; 85: 85-95.
8. Hernández-Urzúa M.A., Alvarado-Navarro A., Interleucinas e inmunidad innata. *Rev. Biomed.* 2001; 12: 272-280.
9. Castellanos R., Guevara M., Robinson R., Vázquez L., Respuestas inmunes innata y adaptativa. *MEDISAN.* 2000; 4(2): 64-74.
10. Betancor L. Temas de bacteriología y virología médica. 3ª. Ed. Montevideo, Uruguay: Oficina del libro FEFMUR, 2008. Pp. 99-114.
11. Carrillo-Esper R., Inmunidad Innata, receptores Toll y sépsis. *Cir. Ciruj.* 2003; 71: 252-258.
12. Kawai T., Akira S., Pathogen recognition with Toll-like receptors. *Curr. Opin. in Immunol.* 2005; 17: 338–344.



13. Collado V., Porras R., Cutuli M., Gómez-Lucía E. El sistema inmune innato I: Sus mecanismos. *Rev. Complut. de cienc. Veterin.* 2008; 2(1): 1-16.
14. Wolf H., Rateitschak E, Rateitschak K. *Periodoncia*. 3ª. Ed. Barcelona, España: Editorial Masson, S.A., 2005. Pp. 58-59.
15. Carranza F., Newman M., Takei H., Klokkevold P. *Carranza's Clinical periodontology*. 10<sup>th</sup> Ed. United States of America: Saunders Elsevier, 2006. Pp. 355-361.
16. Miller S., Ernst R., Bader M. LPS, TLR4 and infectious disease diversity. *Nat. Rev.* 2005; 3: 36-46.
17. Hoffmann J., Reichhart J. *Drosophila* innate immunity: an evolutionary perspective. *Nat. Immun.* 2002; 3(2): 121-126
18. Miyake K. Innate recognition of lipopolysaccharide by Toll-like receptor 4-MD-2. *Trend. in Microb.* 2004; 12: 186-192.
19. Segonzac C., Zipfel C. Activation of plant pattern-recognition receptors by bacteria. *Curr. Opin. In Microb.* 2011; 14: 54-61.
20. Mesa-Villanueva M., Patiño P. Receptores tipo Toll: entre el reconocimiento de lo no propio infeccioso y las señales endógenas de peligro. *Inmunol.* 2006; 25(2): 115-130.
21. Takeuchi O., Akira S. Pattern Recognition and Inflammation. *Cell.* 2010; 140: 805-820.
22. Kawai T., Akira S. Pathogen recognition with Toll-like receptors. *Curr. Opin. In Immun.* 2005; 17: 338-344.
23. Kumar H., Kowai T., Akira S. Pathogen Recognition by the Innate Immune system. *Intern. Rev. Immun.* 2011; 30: 16-34.
24. Juárez E., López J., Torres M., Sada E. Receptores de la inmunidad innata en procesos infecciosos pulmonares. *Rev. Inst. Nal. Enf. Resp. Mex.* 2009; 22(4): 366-378.
25. Domínguez A., Zentella A., Velázquez J. Control Molecular de la inflamación: regulación de los receptores Toll. *REB.* 2009; 28(4): 125-131.



26. Takeda K., Akira S. TLR signaling pathways. *Semin. In Immun.* 2004; 16: 3-9.
27. Manalavan B., Basith S., Choi S. Similar structures but different roles – an updated perspective on TLR structures. *Front. Phys.* 2011; 2: 1-13.
28. Guzmán K. La inmunidad innata y los receptores tipo Toll (TLR`S). *Sirivs.* 2010: 1-10.  
[http://veterinaria.unmsm.edu.pe/files/Articulo\\_guzman\\_inmunidad.pdf](http://veterinaria.unmsm.edu.pe/files/Articulo_guzman_inmunidad.pdf)
29. Moreno C., Sánchez-Ibarrola A. Receptores tipo Toll: bases moleculares de la relación entre respuestas innatas y adaptativas del sistema inmunitario. *Rev. Med. Univ. Navarra.* 2003; 47(3): 29-33.
30. Chávez D. Receptores tipo Toll (Toll like receptors). *Rev. Lat. Actual. Biomed.* 2007; 1(1): 3-9.
31. Takeda K., Akira S. Toll-like Receptors. *Ann. Rev. Immun.* 2003; 21:335-376.
32. Kolliker-Frers R., Label M. Receptores Toll-like (TLRS). *Rev. Hosp. J.M. Ramos Mejía.* 2005; 10(3) 1-10.
33. Liu T., Gao Y., Ji R. Emerging role of toll-like receptors in the control of pain and itch. *Neuros. Bull.* 2012; 28(2): 131-144.
34. Akira Shizuo. Innate immunity and adjuvants. *Phil. Trans. R. Soc. B.* 2011; 366: 2748-2755.
35. Jin M., Lee J. Structures of the Toll-like receptor family and its ligand complexes. *Immun.* 2008; 29: 182-191.
36. Mayank H., Veenu H. Toll-like receptors and their dual role in periodontitis: a review. *Jour. Oral Scien.* 2011; 53(3): 263-271.
37. Cot M., Ray A., Gilleron M., Vercellone A., Larrouy-Maumus G., Armou E. *et ál.* *PLoS One.* 2011; 6(10): e26316
38. Thompson M., Kaminsky J., Kurt-Jones E., Fitzgerald K. Pattern recognition receptors and the innate immune response to viral infection. *Virus.* 2011; 3: 920-940.



39. Williams K.L. Endotoxins. 2<sup>a</sup>. ed. United States of America: Ed. Marcel Dekker, Inc., 2001. Pp. 1-11.
40. Brade H., Opal S., Vogel S., Morrison D. Endotoxin in health and disease. United States of America: Ed. Marcel Dekker, Inc., 1999. Pp. 1-30.
41. Beutler B., Rietschel E. Innate immune sensing and its roots: the story of endotoxin. *Nat. Rev. Immun.* 2003; 3: 169-176.
42. Schletter J., Heine H., Ulmer A., Rietschel E. Molecular mechanisms of endotoxin activity. *Arch. Microbiol.* 1995; 164: 383-389.
43. Caroff M., Karibian D. Structure of bacterial lipopolysaccharides. *Carbohid. Resch.* 2003; 338: 2431-2447.
44. Romero S., Iregui C. Lipopolysaccharide. *Rev. Med. Veter.* 2010; 19: 47-45.
45. Bermejo A., Duarte J. Mechanisms of transduction of lipopolysaccharide. *Ars. Pharmac.* 2003; 44(2): 121-139.
46. Llompert C. Papel de la cadena O del lipopolisacárido en la regulación de factores de virulencia de *Yersinia enterocolitica*. Tesis doctoral; Universitat de les illes balears. 2009.
47. Rojas N. El lipopolisacárido bacteriano: Una potente endotoxina con múltiples actividades biológicas. *Rev. Cost. Cienc. Med.* 1995; 16 (3): 71-84.
48. Kraus D., Winter J., Jepsen S., Jäger A., Meyer R., Deschner J. Interactions of adiponectin and lipopolysaccharide from *Porphyromonas gingivalis* on human oral epithelial cells. *PLoS One.* 2012; 7(2): 1-10.
49. Sun Y., Li H., Yang M., Shu W., Sun M., Xu Y. Effects of aging on endotoxin tolerance induced by lipopolysaccharides derived from *Porphyromonas gingivalis* and *Escherichia coli*. *PLoS One.* 2012; 7(6): 1-9.
50. Cheng J., Li J., Zhang W., Cai Y., Wang G. Mutations in lipopolysaccharide-binding protein (LBP) gene change the susceptibility to clinical mastitis in Chinese Holstein. *Mol. Biol. Rep.* 2012; 39(10) 9601-12



51. Miyake K. Endotoxin recognition molecules, Toll-like receptor 4-MD-2. *Semin. In Immun.* 2004; 16: 11-16.
52. Tapping R. Innate immune sensing and activation of cell surface Toll-like receptors. *Semin. In Immun.* 2009; 21: 175-184.
53. Tsukamoto H., Fukudome K., Takao S., Tsuneyoshi N., Kimoto M. Lipopolysaccharide-binding protein-mediated Toll-like receptor 4 dimerization enables rapid signal transduction against lipopolysaccharide stimulation on membrane-associated CD14-expressing cells. *Intern. Immunol.* 2010; 22(4): 271-280.
54. Pálsson-Mcdermott E., O'neill L. Signal transduction by the lipopolysaccharide receptor, Toll-like receptor-4. *Immunol.* 2004; 113: 153-162.
55. Lu Y., Yeh W., Ohashi P. LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine.* 2008; 42(2) 145-151.