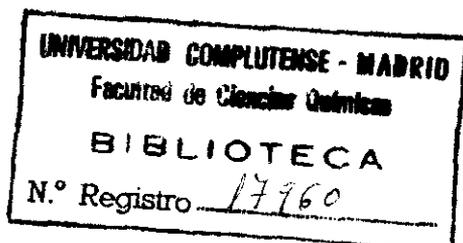


UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
Facultad de Ciencias Químicas
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I

**SHOCK ENDOTOXICO:
HEPATOTOXICIDAD. ACCION DIRECTA
DEL LIPOPOLISACARIDO DE *E. coli*
SOBRE DISTINTOS TIPOS CELULARES
HEPATICOS**



M.ª Jesús Ainaga Logroño
Madrid, 1992

Colección Tesis Doctorales. N.º 138/92

© M.ª Jesús Ainaga Logroño

**Edita e imprime la Editorial de la Universidad
Complutense de Madrid. Servicio de Reprografía.
Escuela de Estomatología. Ciudad Universitaria.
Madrid, 1992.**

Ricoh 3700

Depósito Legal: M-12223-1992



La Tesis Doctoral de D.^a. M^a JESUS AINAGA LOGROÑO

.....
Titulada SHOCK ENDOTOXICO: HEPATOTOXICIDAD. ACCION
DIRECTA DEL LIPOPOLISACARIDO DE E. COLI.
SOBRE DISTINTOS TIPOS CELULARES HEPATICOS.

Director Dr. D. R. PAGANI BALLETTI y M.T. PORTOLES
fue leida en la Facultad de CIENCIAS QUIMICAS

de la UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID, el día 20
de junio de 19⁹¹, ante el tribunal

constituido por los siguientes Profesores:

PRESIDENTE D. ANGEL MARTIN MUNICIO
VOCAL D. PEDRO GARCIA BARRENO
VOCAL D. JOSE ANTONIO SOLIS HERRUZO
VOCAL D. CARLOS BARBA SOLANA
SECRETARIO D^a ROSA MARIA ARAHUETES PORTERO

.....
habiendo recibido la calificación de APTO "CUM LAUDE"
POR UNANIMIDAD.
.....

Madrid, a 20 de junio de 1991.

EL SECRETARIO DEL TRIBUNAL.

Rosa María Arahuetes

DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA Y BIOLOGIA MOLECULAR I
FACULTAD DE C.C. QUIMICAS
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

**SHOCK ENDOTOXICO: HEPATOTOXICIDAD.
ACCION DIRECTA DEL LIPOPOLISACARIDO DE E.coli
SOBRE DISTINTOS TIPOS CELULARES HEPATICOS.**

Tesis Doctoral

que presenta

M^a Jesús Ainaga Logroño

Directores: Dra. Raffaella Pagani Balletti
Dra. M. Teresa Portolés Pérez.

A mis padres y a mi hermano
POR TODO

El presente trabajo ha sido realizado en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I de la Facultad de C.C. Químicas de la Universidad Complutense de Madrid, bajo la dirección de la Dra. Raffaella Pagani y la Dra. M^a Teresa Portolés, a quienes deseo expresar mi gratitud por su apoyo y constante preocupación por el trabajo experimental. Especialmente agradezco a la Dra. Pagani su inestimable ayuda en todo lo relativo a la microscopía, y a la Dra. Portolés las fructíferas discusiones metafísico-científicas que manteníamos. También quiero agradecer a la Dra. I. Díaz-Laviada sus importantes enseñanzas a pie de laboratorio.

Asimismo, deseo manifestar un agradecimiento especial al Prof. D. Angel M. Municio por su asesoramiento y la confianza en mí depositada.

Por otra parte, quiero hacer patente mi gratitud hacia la Dra. C. Rúa, la Dra. C. Machín (Dpto. Biología Celular, Facultad C.C. Biológicas) y el Dr. A. Fernández (Servicio de Microscopía, U.C.M.), por su ayuda en la realización de la microscopía electrónica.

Igualmente agradezco al Prof. D. E. Wisse su acogida en el "Department of Cellular Histology and Biology" (V.U.B., Bruselas), así como al Dr. H. Van Bossuyt y a C. Desmaretz por su cariño, amabilidad y sus enseñanzas sobre las células sinusoidales hepáticas y sobre las costumbres belgas.

Por último, y muy especialmente, deseo dar las gracias a las personas que han compartido conmigo más de cerca estos años de investigación, regalándome además su preciosa amistad: Carmela, Juanma, Julio, Josemi, Leizia, Luz, Isabel, Ana y Carmen.

La finalísima mención honorífica es para el "club de las tarteras", que hacía de la comida el intermedio ideal entre experimento y experimento.

INDICE

| | |
|--|--------|
| I. INTRODUCCION | 1 |
| 1. SHOCK ENDOTOXICO. ALTERACIONES FISIOPATOLOGICAS | 1 |
| 2. ENDOTOXINAS | 6 |
| 2.1. Localización y aislamiento de los lipopolisacáridos | 7 |
| 2.2. Características físico-químicas de los lipopolisacáridos | 8 |
| 2.3. Relación estructura-endotoxicidad | 10 |
| 3. ENDOTOXINAS Y HEPATOTOXICIDAD | 11 |
| 3.1. Estructura celular y funciones hepáticas | 11 |
| 3.2. Alteraciones hepáticas durante el <i>shock</i> endotóxico | 15 |
| 3.2.1. Alteraciones morfológicas | 15 |
| 3.2.2. Alteraciones metabólicas | 16 |
| 3.2.3. Regulación por hormonas pancreáticas | 21 |
| 3.2.4. Alteraciones en los mecanismos de detoxificación | 22 |
| 3.3. Hepatopatías relacionadas con las endotoxinas | 26 |
| 4. INCORPORACION Y PROCESAMIENTO INTRACELULAR DE LAS ENDOTOXINAS | 28 |
| 4.1. Interacción LPS-célula | 28 |
| 4.1.1. Membrana plasmática | 28 |
| 4.1.2. Mitocondrias | 30 |
| 4.1.3. Lisosomas | 30 |
| 4.2. Procesamiento intracelular de los lipopolisacáridos | 31 |
| 4.3. Comunicación células sinusoidales ↔ células parenquimatosas. Mediadores del <i>shock</i> | 32 |
| 5. OBJETIVOS | 36 |
| II. MATERIALES Y METODOS. | 38 |
| 1. ENDOTOXINA | 38 |
| 2. MATERIAL BIOLÓGICO | 38 |
| 3. MODELOS EXPERIMENTALES | 38 |
| 3.1. Inducción del <i>shock</i> endotóxico reversible | 38 |
| 3.2. Aislamiento de distintos tipos celulares hepáticos | 39 |
| 3.2.1. Células parenquimatosas | 39 |
| 3.2.2. Células no parenquimatosas | 41 |
| 3.3. Tratamiento de los distintos tipos celulares hepáticos con lipopolisacárido | 45 |
| 3.3.1. Células en suspensión | 45 |
| 3.3.2. Células en cultivo | 45 |

| | |
|---|----|
| 4. ESTUDIOS MORFOLOGICOS | 46 |
| 4.1. Microscopía óptica | 46 |
| 4.2. Microscopía electrónica de transmisión | 46 |
| 4.2.1. Control ultraestructural | 46 |
| 4.2.2. Marcaje con proteína A-oro | 47 |
| 5. INCORPORACION DE [¹⁴ C]-LPS | 48 |
| 6. INCORPORACION DE DIACETATO DE FLUORESCENA | 48 |
| 6.1. Microscopía de fluorescencia | 48 |
| 6.2. Citometría de flujo | 49 |
| 6.3. Espectrofluorimetría | 49 |
| 7. ESTUDIOS DE MICROVISCOSIDAD DE MEMBRANA MEDIANTE POLARIZACION DE FLUORESCENCIA | 50 |
| 7.1. Determinación de la microviscosidad de membranas plasmáticas hepáticas | 52 |
| 7.2. Determinación de la microviscosidad de la membrana de distintos tipos celulares hepáticos | 52 |
| 8. INCORPORACION DE [¹⁴ C]-2-DESOXIGLUCOSA | 54 |
| 9. ENSAYOS DE UNION E INTERNACION DE INSULINA Y DE LDL | 55 |
| 9.1. Unión de [¹²⁵ I]-insulina | 55 |
| 9.2. Unión de [¹²⁵ I]-LDL | 55 |
| 9.3. Internación de [¹²⁵ I]-insulina y de [¹²⁵ I]-LDL | 56 |
| 10. VALORACION DE ACTIVIDADES ENZIMATICAS | 56 |
| 10.1. Lactato deshidrogenasa (LDH) | 57 |
| 10.2. Glucoquinasa (GK) | 57 |
| 10.3. Fosfatasa ácida (FA) | 57 |
| 10.4. Glutamato-oxalacetato transaminasa (GOT) | 58 |
| 10.5. Superóxido-dismutasa (SOD) | 58 |
| 11. CAPACIDAD OXIDATIVA INTRACELULAR | 59 |
| 12. VALORACION DE LOS NIVELES DE MALONIL-DIALDEHIDO | 59 |
| 13. DETERMINACION DE LOS NIVELES DE CITOCROMO b ₅ Y P450 | 61 |
| 13.1. Citocromo b ₅ | 61 |
| 13.2. Citocromo P450 | 62 |
| 14. DETERMINACION DE LA CONCENTRACION DE CALCIO CITOSOLICO | 62 |
| 14.1. Espectrofluorimetría | 62 |
| 14.2. Citometría de flujo | 63 |
| 15. DETERMINACION DEL pH INTRACELULAR | 64 |
| 16. VALORACION DE PROTEINAS | 65 |
| 17. ANALISIS ESTADISTICO | 65 |

| | |
|---|-----|
| III. RESULTADOS. | 66 |
| 1. MODELOS EXPERIMENTALES | 66 |
| 1.1. Caracterización del modelo de <i>shock</i> endotóxico reversible | 66 |
| 1.2. Caracterización de modelos <i>in vitro</i> con distintos tipos celulares hepáticos | 67 |
| 1.2.1. Células parenquimatosas | 68 |
| 1.2.2. Células no parenquimatosas | 68 |
| 2. ACCION DEL LPS <i>IN VIVO</i> | 69 |
| 2.1. Superóxido dismutasa (SOD) | 70 |
| 2.2. Peroxidación lipídica | 70 |
| 2.3. Niveles de citocromo b ₅ | 71 |
| 3. ACCION DEL LPS <i>IN VITRO</i> | 73 |
| 3.1. Morfología de las células no parenquimatosas hepáticas | 73 |
| 3.1.1. Microscopía óptica | 73 |
| 3.1.2. Microscopía electrónica | 73 |
| 3.2. Localización intracelular e incorporación de [¹⁴ C]-LPS en células no parenquimatosas hepáticas | 80 |
| 3.3. Propiedades físicas de la membrana plasmática de células hepáticas | 85 |
| 3.3.1. Liberación de lactato deshidrogenasa (LDH) | 85 |
| 3.3.2. Incorporación de diacetato de fluoresceína (FDA) | 86 |
| a) Microscopía óptica de fluorescencia | 86 |
| b) Citometría de flujo | 88 |
| c) Espectrofluorimetría | 91 |
| 3.3.3. Microviscosidad | 92 |
| a) Efecto del LPS | 93 |
| b) Efecto de sales biliares | 98 |
| 3.4. Funcionalidad de la membrana plasmática de células hepáticas | 102 |
| 3.4.1. Incorporación de [¹⁴ C]-2-desoxiglucosa | 102 |
| 3.4.2. Unión e internación de [¹²⁵ I]-insulina | 104 |
| 3.4.3. Unión e internación de [¹²⁵ I]-LDL | 107 |
| 3.5. Parámetros bioquímicos intracelulares | 111 |
| 3.5.1. Glucoquinasa (GK) | 112 |
| 3.5.2. Fosfatasa ácida (FA) | 113 |
| 3.5.3. Superóxido dismutasa (SOD) y capacidad oxidativa intracelular | 114 |
| 3.5.4. Peroxidación lipídica | 119 |
| 3.5.5. Niveles de citocromo b ₅ | 121 |
| 3.5.6. Concentración de calcio citosólico | 121 |
| a) Espectrofluorimetría | 122 |
| b) Citometría de flujo | 124 |
| 3.5.7. pH intracelular | 127 |
| 3.6. Interacción células no parenquimatosas ↔ células parenquimatosas | 128 |

| | |
|--|-----|
| IV. DISCUSION. | 131 |
| 1. ACCION DEL LPS <i>IN VIVO</i> . | |
| MODELO DE <i>SHOCK</i> ENDOTOXICO REVERSIBLE | 131 |
| 1.1. Superóxido dismutasa (SOD) | 132 |
| 1.2. Peroxidación lipídica | 133 |
| 1.3. Niveles de citocromo b ₅ | 134 |
| 2. ACCION DEL LPS <i>IN VITRO</i> . | |
| UTILIZACION DE DISTINTOS TIPOS CELULARES HEPATICOS | 135 |
| 2.1. Alteraciones morfológicas | 136 |
| 2.2. Incorporación y localización intracelular del LPS | 137 |
| 2.3. Propiedades físicas de la membrana plasmática | 138 |
| 2.3.1. Liberación de LDH | 138 |
| 2.3.2. Retención intracelular de fluoresceína | 139 |
| 2.3.3. Microviscosidad. Efecto de la endotoxina | 141 |
| 2.3.4. Microviscosidad. Efecto de sales biliares. | 143 |
| 2.4. Funcionalidad de la membrana plasmática | 147 |
| 2.4.1. Incorporación de [¹⁴ C]-2-desoxiglucosa | 147 |
| 2.4.2. Unión e internación de [¹²⁵ I]-insulina | 148 |
| 2.4.3. Unión e internación de [¹²⁵ I]-LDL | 150 |
| 2.5. Parámetros bioquímicos intracelulares | 152 |
| 2.5.1. Glucoquinasa | 153 |
| 2.5.2. Fosfatasa ácida | 153 |
| 2.5.3. Superóxido dismutasa (SOD) y capacidad oxidativa intracelular | 154 |
| 2.5.4. Peroxidación lipídica | 155 |
| 2.5.5. Niveles de citocromo b ₅ | 156 |
| 2.5.6. Homeostasis del calcio intracelular | 157 |
| 2.5.7. pH intracelular | 159 |
| 2.6. Interacción células no parenquimatosas ↔ células parenquimatosas | 160 |
| V. CONCLUSIONES. | 162 |
| VI. BIBLIOGRAFIA. | 167 |

I. INTRODUCCION.

I. SHOCK ENDOTOXICO. ALTERACIONES FISIOPATOLOGICAS.

El término *shock* se utiliza actualmente para definir la situación de extrema gravedad que sigue a cualquier tipo de agresión contra el organismo (*Hinshaw & Cox, 1972; Kovach et al., 1973*) y que se caracteriza por una disminución del flujo sanguíneo, hipoxia tisular y alteración del metabolismo celular (*Hardaway, 1966; Suteu et al., 1977; Altura et al., 1983*).

Esta serie continuada de manifestaciones patológicas, cada una más grave que su predecesora (*Dunham, 1982*), ha sido clasificada por *Hardaway (1966)* en dos etapas, atendiendo a los fenómenos vasculares, celulares y metabólicos característicos de cualquier tipo de *shock (Majerus, 1984)*:

- 1^º) *Shock* reversible o *shock* moderado, y
- 2^º) *Shock* irreversible o *shock* severo.

Cuando los mecanismos homeostáticos no pueden contrarrestar estas alteraciones, tiene lugar una serie de procesos descompensatorios que van en detrimento de la recuperación y hacen que se instaure un estado de *shock* irreversible (*Bond, 1984*).

El término *shock* fue utilizado por primera vez por el médico francés Le Dran en 1743 y desde entonces hasta la actualidad se han desarrollado numerosas aproximaciones experimentales para intentar esclarecer la compleja fisiopatología de los fenómenos de *shock (Tabla I)*

Desde el punto de vista etiológico, el *shock* no es un síndrome único sino que bajo este término se incluyen una serie de alteraciones que aparecen en casos de hemorragias graves, infarto de miocardio, obstrucción cardíaca, embolia pulmonar generalizada, traumatismos, quemaduras e infección bacteriana masiva; clasificándose cada tipo de *shock* según su etiología en hemorrágico, cardiogénico, neurogénico, traumático y séptico.

El término *shock* séptico o septicemia, puede considerarse análogo al de *shock* endotóxico o endotoxiosis y designa el estado de disfunción metabólico-circulatoria aguda (*Hinshaw et al., 1983*) que se desencadena tras la liberación en el organismo de endotoxinas bacterianas, secundaria a un proceso séptico principal (*Berry, 1977*), o subsiguiente a la administración experimental de endotoxinas aisladas (*Hinshaw et al., 1972; Rietschel et al., 1982*), respectivamente.

Tabla I: PERSPECTIVAS HISTORICAS DEL SHOCK

| | |
|--------------------------------|--|
| (1743) LE DRAN | Usa por primera vez la palabra "choc", para indicar las secuelas clínicas de pacientes que han sufrido un trauma severo. |
| (1867) E.A.MORRIS | Usa por primera vez el término "shock" y publica la monografía: "Un tratamiento práctico en el shock tras operaciones y lesiones". |
| (1899) G.W.CRILE | Comienza la era experimental con la publicación de "Una investigación experimental en el shock quirúrgico". |
| (1899) BRILL Y LIBMAN | Describen por primera vez casos clínicos de bacteremias Gram-negativas. |
| (1938) V.H.MOON | Comienza la investigación en la fisiopatología del shock y se publica: "Shock y fenómenos capilares relacionados". |
| (1948) SPINK | Indica por vez primera que las endotoxinas participan en la instauración del shock. |
| (1950) WIGGERS | Llega la era moderna en la investigación del shock con la aparición de "La fisiología del shock". |
| (1951) WAISBREN | } Documentan la asociación entre bacteremia y shock endotóxico. |
| (1951) BORDEN Y HALL | |
| (1953) BRAUDE | |
| (1956) STUDDIFORD Y DOUGLAS | |
| (1957 a 1990) | |

Los síntomas clínicos que aparecen en el shock séptico y/o endotóxico incluyen un aumento de la temperatura corporal, taquicardia con pulso débil, hipotensión, dolor muscular, alteraciones neuropsíquicas, vómitos, diarreas, anorexia y bloqueo del vaciado gástrico.

La respuesta fisiológica se manifiesta en una serie de alteraciones patológicas que afectan prácticamente a todos los órganos, con variaciones en parámetros hemodinámicos, factores de coagulación, sistema del complemento, sistema cardiovascular-pulmonar, tracto gastrointestinal, sistema nervioso, músculo esquelético y sistemas endocrino y renal.

En la instauración y progresión de este tipo de shock, se pueden distinguir dos fases considerando tanto las características cardiovasculares como las metabólicas (Weil, 1972; Hinshaw, 1972; Nishijima et al., 1973; Beisel, 1975):

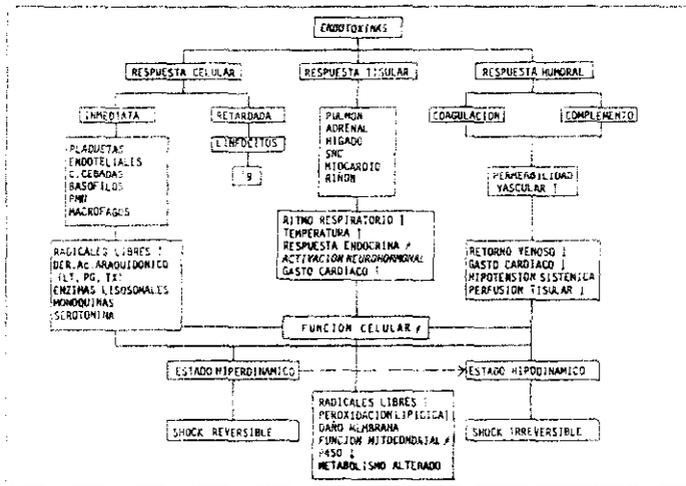
1ª) Fase inicial (Altura, 1983) o shock hiperdinámico (Majerus, 1984):

- Se eleva la potencia cardíaca y disminuye la resistencia vascular.
- Se activa la movilización de sustratos metabólicos, con hiperglicemia y aumento de la concentración de ácidos grasos libres.

2ª) Fase final (Altura, 1983) o shock hipodinámico (Majerus, 1984):

- Disminuye la potencia cardíaca conduciendo a hipotensión, y aumenta ligeramente la resistencia vascular.

Si el proceso continúa se produce una reducción del suministro de energía a los tejidos periféricos apareciendo una marcada hipoglucemia, hipoxia y acidosis metabólica que desembocan en un estado crítico con síndrome de distress respiratorio agudo (ARDS), coagulación intravascular diseminada (DIC) (Hale et al, 1986; Zimmerman & Dietrich, 1987) y fracaso general del organismo.

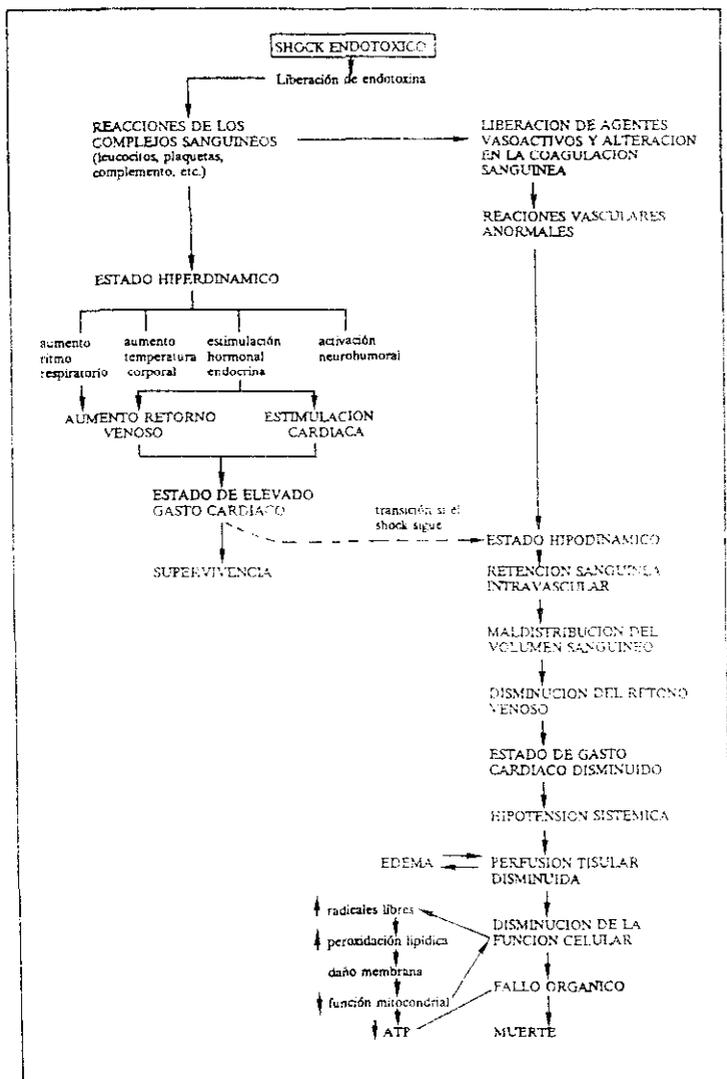


FISIOPATOLOGIA DEL SHOCK (Pagani et al., 1990)

Así pues, desde un punto de vista clínico, los factores hemodinámicos son los que dominan el cuadro patológico (Fig. 1), conduciendo a un estado final caracterizado por hipotensión, perfusión tisular inadecuada (McGovern & Tüller, 1980) y una grave disfunción generalizada que ocasiona lesiones celulares (Trump et al., 1982; Schumer, 1983) cuya magnitud determina la reversibilidad o irreversibilidad del shock.

En la actualidad existe una preocupación creciente ante el incremento en el número de casos de shock séptico. Desde el estudio presentado por Waisbren en 1951, en el que se señalaban 29 casos de bacteremia, se llegó en 1974 a 330000 casos originados por bacterias Gram-negativas, de los que 132000 condujeron a la muerte (McCabe, 1974). En 1979 la mortalidad de este tipo de shock se estimó entre un 10 y un 50% (Schumer, 1979),

Figura 1: FASES HEMODINAMICAS QUE SE PRODUCEN DURANTE EL SHOCK.



ascendiendo en 1983 hasta un 45-80% (*Veterans Administration Cooperative Study N°209*). Son, por tanto, las infecciones agudas que producen mayor morbilidad y mortalidad en los países desarrollados (*Veterans Administration Cooperative Study N°209; United States Department of Health and Human Services*). En Estados Unidos en los años 80, se produjo un incremento del 26.1% de septicemias respecto a un 1.6% de enfermedades cardiovasculares y un 0.6% de casos de cáncer (*Hamill & Maki, 1986*).

La mayor incidencia de los procesos de *shock* séptico se asocia a la aparición de cepas resistentes a la acción de diversos antibióticos que favorecen las infecciones hospitalarias producidas por bacterias Gram-negativas, Gram-positivas, gérmenes oportunistas, hongos, protozoos, virus y espiroquetas. Existe además un aumento del número de pacientes con alto riesgo de infección debido a los tratamientos con inmunosupresores, a las técnicas de mantenimiento artificial y a la afección por virus HTLV.

En España se ha producido una evolución en cuanto al tipo de infección, siendo en los años 50 más frecuentes las infecciones por bacterias Gram-negativas, en los 70 por bacterias Gram-positivas aumentando de nuevo a partir de 1980, las infecciones por bacterias Gram-negativas y por gérmenes anaerobios.

La importancia clínica del *shock* séptico hace imprescindible el estudio de las bases fisiológicas y moleculares de los múltiples procesos que se desencadenan por la acción de las endotoxinas bacterianas en el organismo.

Para ello se han desarrollado distintos modelos experimentales de inducción del *shock*, mediante la administración de endotoxinas. Aunque Wichterman *et al* (1980) ponían en duda el paralelismo entre el modelo experimental del *shock* endotóxico y el problema clínico de la sepsis, en la actualidad está generalmente aceptado que la endotoxina bacteriana es el factor fundamental que desencadena el *shock* séptico (*Cavanagh et al, 1977; Oettinger et al, 1987; Fink & Heard, 1990*), aunque también puedan contribuir otros mecanismos que requieran la presencia de bacterias vivas (*Waishren, 1964; Spink, 1972*). De hecho, el tratamiento de animales de experimentación con endotoxinas aisladas, reproduce muchas de las alteraciones hematológicas, hemodinámicas y metabólicas características de pacientes con infecciones bacterianas que desencadenan el *shock* séptico (*Galanos et al, 1977*). Así por ejemplo se observa fiebre, taquicardia, output cardíaco elevado, hipotensión, baja resistencia vascular sistémica, leucocitosis, linfopenia, elevadas concentraciones circulantes de hormonas del *stress* (corticotropina, cortisol, hormona del crecimiento y catecolaminas) y elevado consumo de oxígeno (VO₂) (*Suffredini et al, 1987; Revhaug et al, 1988*).

Las endotoxinas producen una gran diversidad de respuestas biológicas tanto *in vivo* como *in vitro* (*Hitchcock et al, 1986*) y son la base de la mayor parte de los actuales modelos experimentales.

La inducción *in vivo* de estados de *shock* endotóxico se ha realizado en distintos animales de experimentación, siendo problemática la elección de éstos dada la diferente sensibilidad que presentan las distintas especies a la endotoxina. Tradicionalmente en estudios de toxicología se han utilizado perros (*García-Barreno & Balibrea, 1977; Balibrea et al, 1978a; Balibrea et al, 1978b; García-Barreno & Balibrea, 1978a; García-Barreno & Balibrea, 1978b*)

y en la actualidad se han intentado aproximaciones experimentales con primates y cerdos *minipig* (Cano et al., 1988). Dada la complejidad del manejo de estos animales se recurre cada vez más a modelos de *shock* endotóxico en ratas (Deaciuc & Spitzer, 1988).

Entre los modelos experimentales *in vitro*, destaca la utilización de poblaciones celulares puras: plaquetas (Moscat et al., 1987; Grabarek et al., 1990), macrófagos peritoneales (Issekutz et al., 1987; Morris & Moore, 1987), pneumocitos (Aracil F.M. et al., 1985; Bosch et al., 1990), células adrenocorticales (García et al., 1985; García et al., 1990a), hepatocitos (Pagani et al., 1981; Pagani et al., 1988), células de Kupffer (Van Bossuyt & Wisse, 1988). Este tipo de estudios permiten simplificar el sistema y profundizar en las alteraciones producidas por la endotoxina específicamente sobre cada tipo celular.

2. ENDOTOXINAS.

Aisladas y descritas por primera vez por Boivin y Mesrobeanu (1933), las endotoxinas son complejos macromoleculares constituidos por lipopolisacáridos (LPS) y proteínas, que se liberan al torrente circulatorio en dependencia del sistema de complemento (Tesh et al., 1986), durante la lisis o los períodos de crecimiento activo de bacterias Gram-negativas.

Los términos endotoxina y LPS se usan indistintamente debido a que los LPS poseen todas las actividades biológicas de las endotoxinas (Hitchcock et al., 1986) y, aislados, ejercen una gran variedad de efectos agudos característicos del *shock* endotóxico (Morrison & Ulevitch, 1978; Tesh et al., 1986). Por esta razón, se utilizan comúnmente LPS purificados en los estudios relativos a la patología de la endotoxemia (Berry, 1982; Rietschel et al., 1982).

En la *Tabla 2* se resumen los efectos biológicos más característicos de las endotoxinas. Junto a las acciones negativas que inducen, también existen algunas consideradas beneficiosas. Así por ejemplo, el tratamiento agudo y crónico con LPS protege de la colestasis causada por clorpromazina (Utili et al., 1981; Gaeta et al., 1986). También el efecto inmunopotenciador del LPS es ampliamente conocido (Raetz et al., 1988) y supone un aumento de la resistencia a infecciones así como al desarrollo de tumores. En Hungría se ha preparado un LPS destoxificado por irradiación (*Tolerin[®]*) debido a su actividad inmunoestimuladora y las endotoxinas han sido, de hecho, el primer agente antitumoral empleado en este siglo (Fox et al., 1990b).

Tabla 2: ACTIVIDADES BIOLÓGICAS DE LAS ENDOTOXINAS.

| | |
|-------------------------------|--|
| Pirogenicidad | Activación del factor Hagemann |
| Sinergismo con hepatotoxinas | Inducción del activador del plasminógeno |
| Leucopenia | Acidosis |
| Leucocitosis | Toxicidad letal |
| Alteración de la coagulación | Actividad mitogénica para las células B |
| Reacción de Schwartzman local | Actividad necrótica de tumores |
| Activación del complemento | Actividad adyuvante |
| Hipotensión | Activación de macrófagos |

2.1. LOCALIZACIÓN Y AISLAMIENTO DE LOS LIPOPOLISACARIDOS.

Las bacterias Gram-negativas están delimitadas por una membrana citoplasmática interna, una capa de peptidoglicanos y una membrana externa (Fig. 2). Es en esta última donde se encuentran los LPS junto con proteínas y fosfolípidos, en una relación en peso 0.3:1.1:0.3, respectivamente (Bladen & Mergenhausen, 1964). Es, por tanto, una bicapa lipídica con proteínas distribuidas en su interior y los LPS dispuestos exclusivamente en su cara más externa.

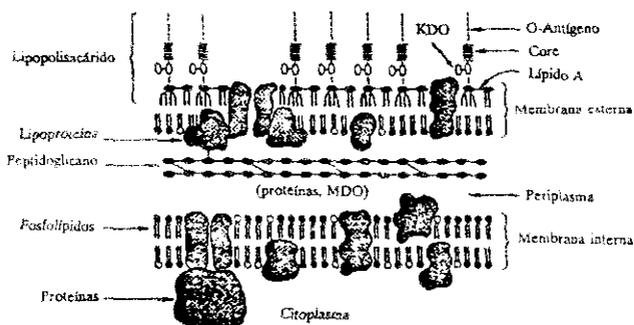


Figura 2. MODELO GENERAL PARA LA PARED CELULAR DE UNA BACTERIA GRAM-NEGATIVA.

El método de aislamiento de los LPS es un punto de gran importancia ya que la presencia de contaminantes (particularmente proteínas) puede inducir una diferente respuesta celular (Hitchcock et al., 1986). Entre los distintos procedimientos existentes, basados en la extracción con disolventes orgánicos, cabe destacar:

a) Método de Boivin y Mesrobeanu (1933): TCA 0.25M, 4°C. El LPS obtenido contiene un polipéptido mitogénico para la estirpe de ratones C3H/HeJ resistentes genéticamente a la endotoxina (Bradley, 1979).

b) Método de Westphal *et al.* (1952): Fenol/H₂O (45:55, V/V) a 68°C. Proporciona LPS libre del contaminante anterior.

2.2. CARACTERISTICAS FISICO-QUIMICAS DE LOS LIPOPOLISACARIDOS.

La molécula de lipopolisacárido consta de dos regiones con características fisico-químicas diferentes (Fig. 3):

- a) Una región hidrofílica que a su vez presenta dos zonas:
 - La cadena lateral O-específica también llamada O-antigénica.
 - El núcleo basal (core) de oligosacárido.
- b) Una región hidrofóbica llamada lípido A. que se encuentra unida covalentemente a la primera.

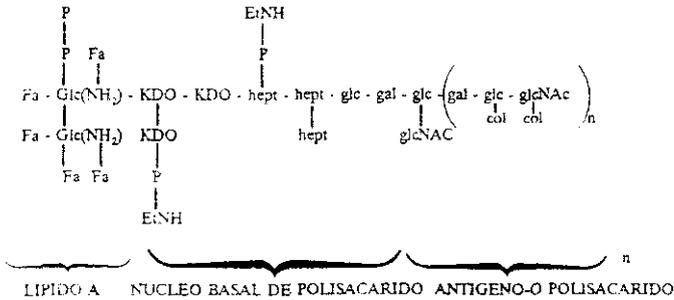


Figura 3: ESTRUCTURA QUIMICA DEL LPS DE *E.coli* 0111:B4.

- Cadena lateral O-especifica (Ghuysen, 1977; Luderitz *et al.*, 1982; Brade *et al.*, 1988):

Constituida por un número variable (2-10) de unidades repetidas de oligosacárido, formado a su vez por 3 ó 4 unidades diferentes de azúcares (a menudo desoxihexosas en las posiciones 3 y/ó 6). La secuencia de monosacáridos es característica de cada especie bacteriana y por tanto es la portadora de la especificidad serológica de cada LPS. Hay una gran variedad de azúcares que pueden formar parte de esta secuencia, incluyendo los derivados desoxi- y metilados, los aminoazúcares y los ácidos urónicos. Además pueden presentar grupos fosfatos, acilos, acetilos, lactilos o glicerilos. Esto da lugar a un gran número de O-antígenos potenciales.

- Núcleo basal (Fox et al., 1990b):

Es mucho más corto y menos heterogéneo que el O-antígeno. Está dividido en dos regiones, una externa compuesta normalmente por glucosa, galactosa y N-acetilglucosamina y otra interna constituida por ácido 2-ceto-3-desoxioctanóico (KDO) y heptosas. Este núcleo interno contiene a menudo residuos fosfato cargados. La variabilidad del núcleo basal es mucho menor que la de la cadena O-antigénica, siendo casi constante la región interna. La unión del núcleo con el lípido A es un enlace entre KDO y glucosamina, lábil al tratamiento ácido.

- Lípido A (Rietschel et al., 1984):

La estructura común de todos los lípidos A es un disacárido de B-D-glucosaminil-(1-6)- α -D-glucosamina, fosforilado en la posición 4' del residuo glucosaminil y en la posición 1 de la glucosamina. Estos fosfatos son importantes para la solubilidad de la molécula y necesarios para su toxicidad. Las posiciones 2 y 3 de ambos azúcares están sustituidas con grupos 3-hidroxi-ácidos. Estos residuos son ácidos grasos de 12, 14 ó 16 carbonos. Además, 2 ó 3 de los hidroxilos pueden estar sustituidos con ácidos grasos no hidroxilados de 12 a 16 átomos de carbono. Tanto los fosfatos como los residuos lipídicos, son importantes para la actividad biológica de la molécula.

Puesto que los LPS tienen naturaleza anfipática, tienden a formar agregados polidispersos cuando se suspenden en soluciones acuosas. Esto explica que se hayan descrito pesos moleculares que oscilan entre 1×10^6 D y 20×10^6 D. En el caso del LPS de *E. coli* O111:B4, el peso molecular considerado como válido es 1MD (McIntyre et al., 1969; Morrison & Ulevitch, 1978; Van Lenten et al., 1986).

Morfológicamente estos agregados se asemejan a las bicapas de las membranas biológicas (Kabir et al., 1978), siendo esta estructura la responsable de su afinidad por las membranas naturales y artificiales (Stry, 1978; Morrison, 1985).

La estructura de los agregados del LPS depende no sólo de su composición química particular sino también de las condiciones del medio (pH, cationes metálicas, temperatura). Han sido propuestas un gran número de estructuras tridimensionales, que incluyen estados micelares y lamelares (Fig. 4) (Hayter et al., 1987; Naumann et al., 1987; Brandenburg & Seydel, 1988; Labischinski et al., 1989; Seydel et al., 1989). La razón fundamental de las discrepancias existentes radica en la dificultad de asignar una estructura tridimensional definitiva a los resultados experimentales, dado que se trata de estructuras postuladas en condiciones no fisiológicas (Labischinski et al., 1985).

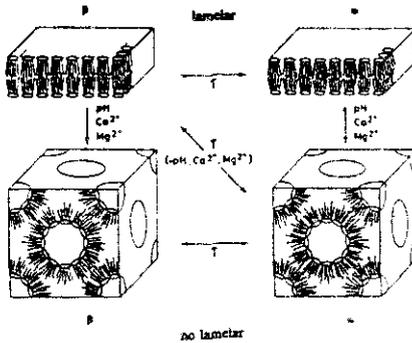


Figura 4: ESTRUCTURAS LAMELARES Y NO LAMELARES DE LOS AGREGADOS DE LPS.

2.3. RELACION ESTRUCTURA-ENDOTOXICIDAD

En 1954, Westphal y Lüderitz propusieron que el lípido A es la estructura mínima necesaria para la actividad endotóxica. Estos estudios de identificación del grupo toxóforo del LPS suministraron pruebas concluyentes en el caso de mutantes bacterianos rugosos. Dichos mutantes presentan defectos en genes que codifican glucosil o fosforil-transferasas, y por lo tanto producen moléculas de LPS truncadas, con la región de polisacárido incompleta (Hitchcock *et al.*, 1986). Así el LPS del mutante *S. minnesota R595* sólo tiene KDO y lípido A en su molécula y, puesto que posee todas las propiedades tóxicas de los LPS completos obtenidos de bacterias lisas, pone de manifiesto el papel dominante del lípido A en la endotoxigenidad (Kabir *et al.*, 1978; Morrison & Aving, 1984; Rietschel *et al.*, 1987; Yoshida *et al.*, 1989).

Recientemente se ha obtenido lípido A sintético que presenta las mismas propiedades biológicas que el bacteriano (Galanos *et al.*, 1984; Shiba & Kusumoto, 1984; Kotani *et al.*, 1985; Takada *et al.*, 1985; Rietschel *et al.*, 1987). El descubrimiento de precursores del lípido A, proporciona información adicional en la determinación de los mínimos requerimientos moleculares para la actividad mitogénica y endotóxica de los LPS (Morrison & Aving, 1984; Grabarek *et al.*, 1990; Tanamoto *et al.*, 1990). El fraccionamiento y análisis estructural de preparaciones de lípido A, que son heterogéneas tras la hidrólisis ácida del LPS, y el desarrollo de los análogos sintéticos del lípido A, han permitido notables avances en la comprensión de su relación estructura-función (Nowotny, 1987; Grabarek *et al.*, 1990).

A pesar de la heterogeneidad molecular de los LPS dependiendo de su procedencia, el centro endotóxico activo (lípido A) conserva en un grado elevado su estructura química lo cual parece indicar un común modo de acción para todos los LPS (Rietschel *et al.*, 1984).

Se ha sugerido que el polisacárido modula la actividad bioquímica del lípido A, además de mantener la identidad inmunológica del LPS de cada organismo individual y transportar

el conjunto de la molécula (Hitchcock et al., 1986; Rietschel et al., 1987). No obstante, otros estudios sugieren que, bajo ciertas condiciones, el polisacárido también puede manifestar actividad endotóxica por sí mismo (Vukajlovich & Morrison, 1985).

También se ha puesto de manifiesto la importancia de los ácidos grasos en la endotoxigenidad de los LPS al observarse una cierta actividad tóxica de N-acil derivados de glucosamina (Behling et al., 1976) y complejos de ácido mirístico con albúmina y concanavalina A, dimetilmiristamida con concanavalina A y esfingosina con albúmina (Bradley, 1976; Bradley et al., 1977).

Otro aspecto a tener en cuenta es la estructura supramolecular del LPS ya que podría existir correlación entre ésta y los efectos biológicos inducidos por la endotoxina (Seydel et al., 1989; Brandenburg & Seydel, 1990). De hecho, la interacción del LPS con membranas celulares puede implicar la intercalación del primero en la membrana (Carr & Morrison, 1984; Jacobs & Price, 1987), lo cual dependerá, al menos en parte, de la estructura tridimensional del lipopolisacárido. La expresión de algunos de los efectos de la endotoxina está también estrechamente relacionada con la fluidez de la molécula del LPS, de manera que cuanto menor es la temperatura de transición de fase (T_m) (mayor fluidez a 37°C), mayor actividad biológica presenta el LPS (Brandenburg & Seydel, 1990; Lüderitz et al., 1989).

3. ENDOTOXINAS Y HEPATOTOXICIDAD.

Estudios experimentales en los que se administra endotoxina por vía intravenosa, demuestran que esta molécula es eliminada de la circulación sistémica principalmente por el hígado ya que el 80% del LPS unido a órganos se encuentra en el hígado y sólo el resto en bazo, pulmón, riñón, adrenales y músculo (Zydaszuk & Moon, 1976; Walker & Snyder, 1978; Kuttner, 1983). Usando [¹²⁵I]-LPS de *E.coli* o de *S.minnesota Re595*, Mathison y Ulevitch (1979) observaron que la eliminación de ambos tipos de LPS es bifásica, presentando una fase rápida de aproximadamente 15 minutos y una fase lenta que dura horas. Se supone que durante la fase rápida inicial, el LPS es eliminado de la circulación sistémica por el hígado directamente como LPS y que durante la lenta segunda fase se elimina asociado a lipoproteínas de alta densidad (Freudenberg et al., 1980; Ulevitch et al., 1981). De cualquier modo, el papel central del metabolismo hepático en la resistencia al LPS es un hecho indiscutible (Kuttner, 1983; Nolan, 1989; Fox et al., 1990b).

3.1. ESTRUCTURA CELULAR Y FUNCIONES HEPATICAS.

El hígado es una glándula exo y endocrina, recubierta por una delgada cápsula de tejido conectivo (Glisson) y formada por un parénquima lobular en el que se insertan los tractos portales. Dicho parénquima está constituido por hepatocitos (células parenquimatosas, Pc),

que representan el 65% de la población celular total, dispuestos en placas anastomosadas unas con otras y que rodean los sinusoides hepáticos. En el seno de la zona parenquimatosa se distribuyen:

- Los espacios porta, que engloban conducto biliar, arteria hepática y vena porta, inmersas en tejido conjuntivo.
- Secciones de las venas centrolobulillares, que dan lugar por confluencia a las venas suprahepáticas.

La disposición espacial de espacios porta y venas centrolobulillares, limitan territorios parenquimatosos denominados lobulillos hepáticos (Fig. 5) (Kessel & Kardon, 1979), que son la unidad funcional del hígado.

Las células endoteliales (Ec) junto con las células de Kupffer (Kc), las células acumuladoras de grasa (*Fat-storing*, FSc) y las células *pit*, representan los cuatro tipos de células sinusoidales o no parenquimatosas hepáticas (Sc, Npc) y fueron estudiadas ultraestructural y citoquímicamente en los años 70.

Las células parenquimatosas (Pc) no están en contacto directo con la sangre sino que el espacio perisinusoidal de Disse y las células endoteliales actúan como *harrera hepatocito-sangre* (BHB).

Las células endoteliales hepáticas poseen *fenestrae* o poros ($\phi=150\text{nm}$), a menudo agrupados (Wisse *et al.*, 1985). Una de las misiones de las *fenestrae* es la filtración de la sangre, permitiendo sólo a partículas menores que ellas alcanzar las células parenquimatosas o abandonar el espacio de Disse. Se cree que el diámetro de las *fenestrae* es afectado por ciertas hormonas (Wisse *et al.*, 1979), influyendo de este modo en el intercambio entre sangre y Pc. Se ha demostrado que en el hígado alcohólico existe alteración de la BHB postulándose que la lesión del parénquima hepático ocurre secundariamente a la pérdida o modificación de las *fenestrae* de las Ec y posterior acúmulo de colágeno en el espacio de Disse (Hom & Christoffersen, 1988).

Las células acumuladoras de grasa contienen numerosas gotas lipídicas, con un elevado contenido en vitamina A. Se conocen también como células *Ito*, lipocitos, pericitos o incluso células perisinusoidales por su posición entre las Pc y la capa de endotelio. Muestran un RER muy desarrollado semejante al de fibroblastos. Son células productoras de colágeno y, por tanto, pueden intervenir en la fibrosis hepática (Wisse *et al.*, 1989).

Las células *pit* fueron descritas por Wisse *et al.* en 1976. Estas pequeñas células semejantes a lipocitos, poseen una polaridad típica, estando casi todos sus orgánulos a un lado del núcleo. Recientemente se ha demostrado que las células *pit* son células *natural killer* (Bouwens *et al.*, 1987).

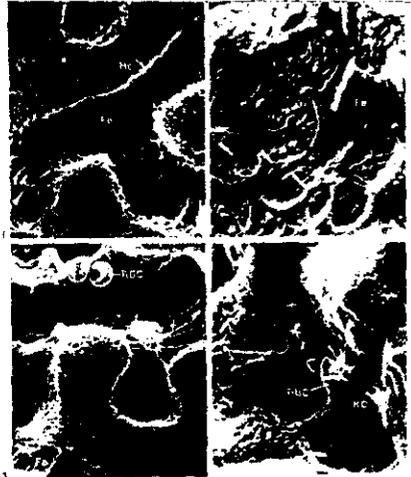
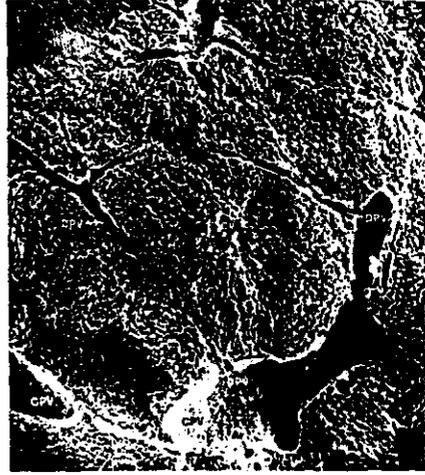


Figura 5. ESTRUCTURA Y ORGANIZACION CELULAR HEPATICA.

En la microfotografía electrónica de transmisión (A1) se puede observar la disposición de casi todos los constituyentes celulares hepáticos: hepatocitos (Hc) formando el parénquima y, en los sinusoides (S), células de Kupffer (KC), endoteliales (EC) y acumuladoras de grasa (FSC). Además se aprecian algunos orgánulos subcelulares: retículo endoplásmico (ER), lisosomas (L), mitocondrias (M). También se distinguen los canalículos biliares (BC). La microfotografía electrónica de barrido (A2) muestra aspectos de la organización intracelular de hepatocitos, destacándose el núcleo (N). La microfotografía B ilustra los vasos sanguíneos característicos del lobulillo hepático: vena central (CV), vena porta conductora (CPV) que se ramifica en venas porta distribuidoras (DPV), arteria hepática (Ar) y venas sublobulares (SLV) que son tributarias de las venas centrales. La microfotografía C muestra en detalle la disposición relativa de Hc y EC (C1) y cómo los microvilli de los primarios sobresalen por las fenestras de las segundas (C2). Las células de Kupffer (KC) se disponen aleatoriamente con formas irregulares y atravesando a veces completamente el sinusoides (C3 y C4). Algún glóbulo rojo (RBC) puede quedar atrapado.

Aproximadamente el 25% de las Sc del hígado de rata, son células de Kupffer. A finales del siglo XIX, Von Kupffer describió un tipo celular hepático que se teñía con cloruro de oro y era capaz de ingerir carbón coloidal. La ultraestructura de los macrófagos del hígado se describió en los años 70 y pudo hacerse una clara distinción respecto de las Ec (Wisse *et al.*, 1974; Wisse, 1977) ya que hasta entonces se suponía que Ec y Kc representaban expresiones funcionales diferentes de un mismo tipo celular.

Actualmente, las Kc se consideran la mayor población de macrófagos tisulares. Poseen las características ultraestructurales típicas de los macrófagos: baja relación núcleo/citoplasma, numerosas protuberancias citoplásmicas, lisosomas y fagosomas de distinto tamaño y densidad electrónica. La caracterización bioquímica implica el estudio de enzimas lisosomales, cuya actividad puede ser visualizada gracias a ensayos citoquímicos. Entre ellos el más característico de las células de Kupffer es la actividad peroxidasa endógena localizada en el RER y en la envoltura nuclear (Wisse *et al.*, 1974). Otro método ampliamente utilizado para la caracterización de las Kc es la fagocitosis de partículas de látex ($\geq 0.8 \mu\text{m}$ de diámetro) (Wisse, 1977).

Estos macrófagos están situados en el conducto sanguíneo sinusoidal (existe un mayor número en el área periportal que en la zona centrolobulillar) y su función es depurar la sangre procedente del intestino.

De entre las numerosas funciones hepáticas, algunas parecen desarrollarse de forma completa en las células del parénquima, como por ejemplo la producción y almacenamiento de reservas energéticas, la síntesis y secreción de proteínas plasmáticas, los mecanismos de detoxificación dependientes de citocromos y la eliminación de compuestos nitrogenados mediante el ciclo de la urea. Otras dependen de la compleja organización estructural del lobulillo, como la síntesis y secreción de sales biliares.

El sistema secretor de bilis está constituido por el canalículo biliar, el espacio pericanalicular y las membranas y vesículas del aparato de Golgi. La mayoría de los ácidos biliares (AB) que segrega el hepatocito proceden de la circulación enterohepática y son captados de la sangre sinusoidal. Los ácidos biliares penetran a través de la membrana del hepatocito desde la sangre sinusoidal por un transportador de Na^+ -anión, que permite que el anión (AB) se acumule en el interior de la célula contra un gradiente electroquímico. Los ácidos biliares son entonces transportados hacia el polo biliar del hepatocito mediante un proceso en el que se supone están implicados el citoesqueleto y vesículas formadas en el aparato de Golgi (Boyer, 1976).

Ha sido postulado que la ausencia de sales biliares en el intestino favorece la absorción de endotoxina intestinal pudiendo desembocar en un estado endotóxico (Shibayama, 1989). De hecho, la endotoxemia aparece a menudo relacionada con procesos de ictericia obstructiva (Tabla 5, *apdo.* 3.3.). Por otra parte, el concepto de endotoxemia de origen intestinal ha cobrado auge, considerándose el LPS procedente del intestino un factor clave en la lesión hepática asociada a la sepsis (Nolan, 1989). Todo ello parece indicar que las sales

biliares constituyen una barrera que, además de la intestinal, ha de superar la endotoxina para acceder al hígado (Kocsar et al., 1969; Cahill et al., 1987).

Por otra parte, hay que resaltar que el metabolismo de sales biliares está relacionado con el de lipoproteínas. La relación mejor conocida entre ambos se refiere a la influencia que la velocidad de síntesis de sales biliares ejerce sobre la expresión de la actividad del receptor de LDL (R_{LDL}). Puesto que las sales biliares se sintetizan a partir de colesterol en el hígado, una síntesis aumentada implica un aumento de la demanda de colesterol. En respuesta a ello el R_{LDL} (apo B,E) ve incrementada su expresión para facilitar la incorporación de LDL (principal transportador sérico de colesterol) (Brown & Goldstein, 1986).

Una segunda relación SB-Lp, se refiere a la interacción físico-química entre sales biliares y lipoproteínas (Savioli et al., 1985; Malavolti et al., 1989).

Por último, se ha demostrado que algunos ácidos biliares estimulan directamente la actividad del R_{LDL} posiblemente alterando la fluidez de la membrana (Fromm, 1989).

En la importante función destoxicadora ejercida por el hígado durante el shock endotóxico participa el Sistema Reticulo Endotelial (RES), fundamentalmente las células de Kupffer (Mori et al., 1973; Praaning-Van-Dalen et al., 1981) y además los hepatocitos (Willerson et al., 1970; Freudenberg et al., 1984). En este sentido, la integridad del RES es crítica para la sensibilidad del huésped al LPS. Cuando la capacidad de acción del RES está disminuida, la sensibilidad al LPS aumenta significativamente y, si se estimula la actividad del RES, el huésped es protegido frente a la endotoxina (Beeson, 1974; Rasenack et al., 1974).

3.2. ALTERACIONES HEPATICAS DURANTE EL SHOCK ENDOTOXICO.

3.2.1. Alteraciones morfológicas.

Durante los procesos de shock endotóxico el hígado sufre severas alteraciones morfológicas atribuidas principalmente a la hipoxia tisular generalizada (Siegel et al., 1982). Durante la fase aguda del shock se aprecia necrosis centrolobulillar, dilatación de sinusoides y microtrombos pudiendo aparecer en los hepatocitos edema y un incremento del tamaño del retículo endoplasmático. Estas alteraciones, aparecen en pacientes desde los 15 minutos hasta las 2 horas de la instauración del shock, modifican la secreción de proteínas plasmáticas y pueden conducir a un fracaso hepático irreversible y a la muerte.

Aunque la hipoxia sea un importante factor desencadenante de las alteraciones morfológicas hepáticas, se ha observado que los LPS por sí mismos producen alteraciones en hepatocitos en cultivo, induciendo una acusada retracción citoplasmática y lesión mitocondrial (Pagani et al., 1988).

3.2.2. Alteraciones metabólicas.

Las alteraciones morfológicas se asocian con una regulación alterada de los procesos metabólicos que se inicia con un déficit de energía periférica con la subsiguiente intervención del hígado para suministrar glucosa. El desarrollo de hipoglucemia y la disminución de las reservas hepáticas de glucógeno, son las primeras alteraciones metabólicas producidas por las endotoxinas (Filkins & Cornell, 1974).

La acción de las endotoxinas sobre el metabolismo de hidratos de carbono se refleja, por tanto, en una hiperglucemia temprana y transitoria seguida de una acusada hipoglucemia. La hiperglucemia inicial se debe a la estimulación de la gluconeólisis hepática y/o a la acción de hormonas hiperglucemiantes como glucagón y adrenalina (Frayn, 1985). Posteriormente, cuando se agotan las reservas de glucógeno, aparece una marcada hipoglucemia, característica de la segunda fase del shock. Existe controversia sobre si el principal cambio que ocurre entonces es un consumo acelerado de glucosa por los tejidos periféricos, o un deterioro de la gluconeogénesis hepática. Parece que ambos factores influyen, disminuyendo la velocidad de producción de glucosa por debajo de los valores normales en el estado preterminal (Frayn, 1985, Heath, 1985). Se ha podido comprobar un efecto directo de la endotoxina de *E. coli* en hepatocitos aislados de rata, ya que el LPS disminuye la gluconeogénesis a partir de lactato aun en presencia de glucagón (Pagani et al., 1985).

En todo este proceso la hipoxia también activa la glicólisis (efecto Pasteur), contribuyendo aún más a la hipoglucemia y a la acidosis celular por un incremento en la concentración de ácido láctico que activa la fosfoglucoquinasa.

La alteración de los intermediarios glicolíticos hepáticos resultante ha sido interpretada como la consecuencia de una inhibición de la fructosa-difosfatasa y/o una activación de la fosfofructoquinasa (Balibrea et al., 1978b). Se ha propuesto también una activación directa de la piruvato-quinasa por el LPS (Schumer, 1983).

Por su parte, algunos autores (Rippe & Berry, 1972) señalan que la endotoxina inhibe la inducción de la enzima gluconeogénica clave, fosfoenolpiruvatocarboxiquinasa (PEPCK), indicando McCallum y Berry (1973) una inhibición paralela de la activación de la glucógeno sintasa.

La cepa C3H/HeJ de ratón se muestra resistente a muchos de los efectos fisiopatológicos que suceden en el cuadro de shock endotóxico, entre ellos los relacionados con el metabolismo de los hidratos de carbono (Rosenstreich et al., 1977). Rippe y Berry (1972), apuntan que el fracaso de la gluconeogénesis y la hipoglucemia secundaria a ello, tras la administración de la endotoxina, es un acontecimiento secundario y no un efecto directo del LPS. Moore et al. (1978) han identificado un factor (factor antagonista de glucocorticoides, GAF) en el sobrenadante de cultivos de macrófagos incubados en presencia de endotoxina, que inhibe la síntesis de PEPCK inducida por glucocorticoides. McCallum y Pontius (1979) señalan que la cepa C3H/HeJ de ratón muestra una alteración en la respuesta de macrófagos y linfocitos T a la endotoxina, no produciendo ni liberando GAF. Todo ello justificaría la respuesta anómala de estos animales. Se propone que una alteración en la interacción entre el LPS y

la membrana celular podría ser el mecanismo responsable del fracaso inductor de la endotoxina.

En cuanto al **metabolismo protéico**, el hígado responde ante un trauma, infección o inflamación, aumentando la síntesis de algunas proteínas plasmáticas. Estas son las llamadas proteínas de fase aguda (proteína C-reactiva, α_1 -glicoproteína ácida, α_2 -antitripsina, α -fetoproteína, α_2 -macroglobulina, ceruloplasmina,...). Se desconoce el mecanismo por el que se estimula su producción, la única relación conocida entre todas ellas es su síntesis por los hepatocitos y su alto contenido en hidratos de carbono, pero no parece existir ninguna otra semejanza estructural o funcional que explique la simultánea elevación de sus niveles.

En la *Tabla 3* se muestran las principales proteínas de fase aguda, algunas propiedades y su posible función.

Posiblemente esta respuesta esté mediada por algún factor liberado por leucocitos y macrófagos, pudiendo estar implicadas las monoquinas (IL-1), prostaglandinas, componentes del sistema del complemento, cortisol y otros sin determinar en la actualidad (*Loda et al, 1984; Smüh-Erickhsen et al, 1984*).

En la respuesta aguda, sin embargo, disminuyen la transferrina y la albúmina. Esta última es la proteína plasmática más abundante y su disminución puede considerarse un buen parámetro sérico en el seguimiento de los estados de *shock in vivo* (*Smüh-Erickhsen et al, 1984; Bosch et al, 1988*). Aunque la disminución de los niveles de albúmina en plasma se relacionan generalmente con un incremento de la permeabilidad vascular y de su catabolismo, se ha podido demostrar que sueros de animales en fase aguda, añadidos a hepatocitos de rata en cultivo, disminuyen la secreción y la síntesis de albúmina (*Koj et al, 1985*), apoyando por tanto la acción de los distintos mediadores en la regulación de los mecanismos de síntesis protéica en hígado.

El **metabolismo lipídico** también se ve alterado durante el *shock*. El tejido adiposo y el hígado se encargan de proveer y procesar las reservas lipídicas. La lipólisis, mediante la lipasa sensible a hormonas, de los triglicéridos almacenados, da lugar a la liberación de ácidos grasos libres y glicerol. Estos sustratos se usan en varios tejidos directamente para la obtención de energía o indirectamente siguiendo la conversión en el hígado a cetonas o a glucosa. En condiciones normales los FFA y los cuerpos cetónicos se oxidan principalmente en el músculo esquelético y en el cardíaco. Los FFA que se oxidan en el hígado son incorporados a lipoproteínas. Las VLDL se secretan por el hígado a la circulación sanguínea y las moléculas de ácidos grasos que poseen son incorporadas por el tejido adiposo, músculo esquelético y miocardio vía lipoproteína lipasa (*Fig. 6*). Todos estos pasos del metabolismo lipídico en el organismo, son alterados por las endotoxinas (*Spitzer, 1985*).

La principal característica de las alteraciones lipídicas durante el *shock* endotóxico es una marcada hipertriacilgliceridemia (*Kauffmann et al, 1976*) y una elevada concentración de ácidos grasos libres en plasma en la fase inicial e hiperdinámica del *shock* (*Printen et al, 1974; Kauffmann et al, 1976*). Este aumento en ácidos grasos libres se debe a una mayor lipólisis por parte del tejido adiposo (*Spitzer, 1979*) ya que la endotoxina no afecta a la eliminación de ácidos grasos (*Romanosky et al, 1980*).

Tabla 3: PRINCIPALES PROTEINAS DE FASE AGUDA.

| | Proteína | Peso molecular | Contenido hidrocarbónico (%) | Concentración normal en el plasma humano (mg/100ml) | Animales en los que es APF | Función |
|----------------------------|------------------------|----------------|------------------------------|---|------------------------------|--|
| Aumentan más de 100 veces | CRP | 5x21000 | 0 | 0.05 | Hombre, conejo. | - Puede unir hemo. - Unión a receptores Fc de monocitos y linfocitos. - Inhibe la agregación plaquetaria. - Activa al complemento |
| | SAA | 20000 | ? | 0 | Hombre, conejo, ratón. | - Interviene en la formación de hemoproteínas - Interacciona con fosfolípidos. |
| Aumentan entre 2 y 4 veces | α -AGP | 44000 | 41.4 | 75-100 | Hombre, conejo, rata. | - Se une a progesterona. - Lleva carbohidratos a los tejidos dañados. - Inhibe la transformación de protrombina en trombina. |
| | α -Antitripsina | 54000 | 12.4 | 210-287 | Hombre, conejo, ratón, rata. | - Inhibe a la tripsina. - Inhibe proteasa de leucocitos. |
| | Fibrinógeno | 341000 | 2.5 | 200-600 | Hombre, conejo, ratón, rata. | - Coagulación. |
| | Haptoglobina | 99000 | 19.3 | 170 | Hombre, conejo, ratón, rata. | - Unión a hemoglobina. |
| | α -FP | - | - | 0 | Rata | - Transporte. |
| | α_2 -MG | 220000 | 8.4 | 240 | Rata | - Inhibe a la tripsina. |
| Aumentan el 50% | Ceruloplasmina | 130000 | 8.0 | 27-63 | Hombre | - Necesaria para procesos oxidativos. |
| | C ₃ | - | - | 110 | Hombre | - Sistema de complemento. |
| Disminuyen | Transferrina | 77000 | 5.9 | 230 | Hombre, conejo. | - Transporte de hierro |
| | Albumina | 66000 | 0 | 4000 | Hombre, conejo, ratón. | - Transporte |

Después de esta primera fase, la concentración de ácidos grasos libres en plasma disminuye (Spitzer & Spitzer, 1982), probablemente debido a una disminución de la lipólisis y a un aumento de la reesterificación por parte del tejido adiposo causada por el aumento en la captura de glucosa y la elevación en la concentración de insulina (Neufeld et al., 1980). En el shock severo, la elevada concentración de lactato también estimula la reesterificación (Heath, 1985).

La disminución de ácidos grasos libres explica la baja concentración de cuerpos cetónicos observada en esta segunda fase del shock (Wannemacher et al., 1979).

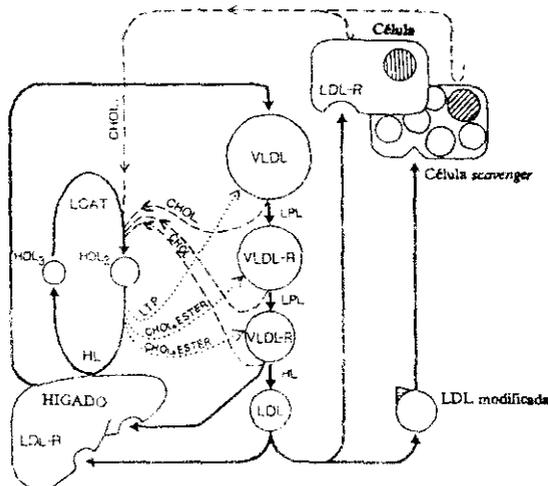


Figura 6: TRANSPORTE PLASMÁTICO DE COLESTEROL

..... Flujos de colesterol desde las células y las VLDL hasta las HDL, para dar lugar a HDL₂ mediante la *lecitina:colesterol aciltransferasa* (LCAT).

..... Transferencia de colesterol esterificado mediante transporte lipídico proteico (LTP) desde HDL₂ hasta VLDL y VLDL-R; seguido de la conversión de HDL₂ en HDL₃ catalizada por la *lipasa hepática* (HL).

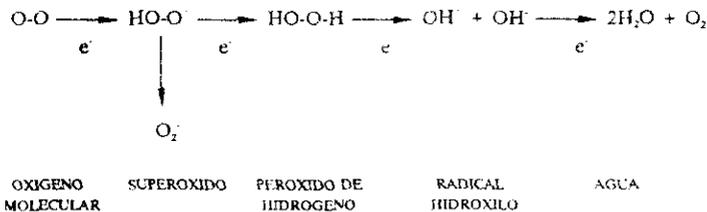
LPL. *Lipoproteína lipasa*; LDL-R *Receptor de LDL*.

Es de gran importancia la interacción LPS-Lp que, posiblemente, transcurre a través de una asociación lípido A-fosfolípidos (Van Lenten et al., 1986), tal como se ha sugerido para la interacción del LPS con membranas celulares (Pagani et al., 1981; Rietschel et al., 1985; Pagani et al., 1988). El complejo LPS-Lp formado es muy estable y tiene un significado funcional que otorga a las lipoproteínas el papel de transportadoras de la endotoxina en sangre, reduciendo además, marcadamente, sus efectos citotóxicos (Munford et al., 1981; Van Lenten et al., 1986; Vosbeck et al., 1990). También se ha descrito la posibilidad de una

regulación de la toxicidad del LPS mediante la producción de una glicoproteína de fase aguda denominada "proteína unidora de LPS" (LBP) (Tobías *et al.*, 1986) que a su vez, controla la formación de complejos LPS-Lp (Warren *et al.*, 1988).

Conviene destacar aquí que la LDL se une también a la α -toxina de *Staphylococcus aureus*, lo cual da otra muestra de la importancia de las LDL en el transporte de toxinas en la circulación (Bhakdi *et al.*, 1983). El R_{LDL} ubicuo en las células de mamíferos (Goldstein & Brown, 1977), podría dar sentido a una rápida incorporación del LPS por las células vía interacción LPS-LDL con el mencionado receptor. Esto ha sido demostrado para el caso de monocitos humanos (Van Lenten *et al.*, 1986).

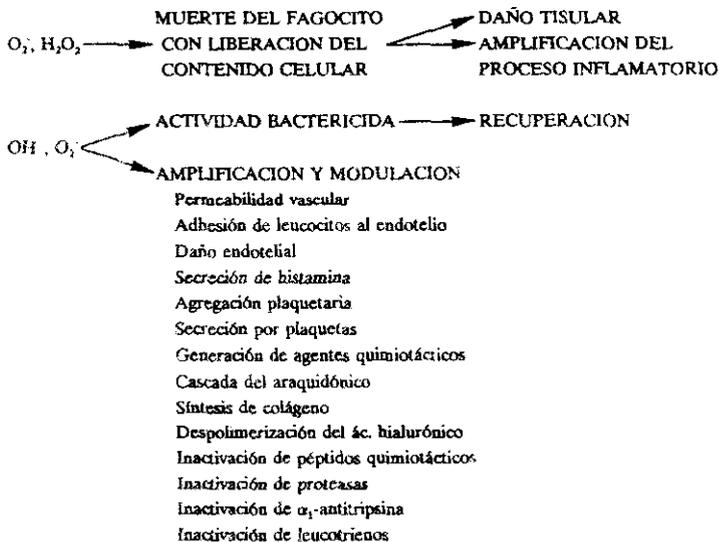
Por otra parte, es de gran importancia en las alteraciones metabólicas desarrolladas en el shock endotóxico la **formación de radicales libres de oxígeno**. Las enzimas responsables de la activación del oxígeno para favorecer su posterior reducción, se encuentran en las membranas biológicas y son capaces de captar los reactivos intermedios (superóxido, peróxido de hidrógeno y radical hidroxilo) hasta que se transfieren los cuatro electrones requeridos para la producción de H_2O . Sin embargo, este acopiamiento no es siempre perfecto, y en condiciones hipóxicas como las ocasionadas en el estado de shock se liberan los intermedios, causando en la célula daños irreversibles que pueden conducir a la muerte



El anión superóxido es capaz de inducir la peroxidación lipídica, despolimerizar polisacáridos, inactivar enzimas y romper DNA. La base química de la toxicidad del superóxido es su gran reactividad en las reacciones de intercambio de un electrón.

En la *Tabla 4* se muestran los principales efectos biológicos de los radicales libres que median el proceso inflamatorio (Rossi *et al.*, 1986).

Tabla 4: PRINCIPALES EFECTOS BIOLÓGICOS DE LOS RADICALES LIBRES.



Durante la endotoxemia se incrementa la formación de radicales libres de oxígeno en la mayoría de las células del organismo, sobre todo en macrófagos y granulocitos (Rossi *et al.*, 1986). Como consecuencia aumenta excesivamente la peroxidación lipídica, que causa daño celular contribuyendo a la letalidad del *shock* endotóxico (Ogawa & Fugita, 1982). Actualmente se intentan tratamientos con antioxidantes (Sugino *et al.*, 1987; Innes *et al.*, 1988) y con enzimas que contrarrestan la formación de oxirradicales como la superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa (Kunimoto *et al.*, 1986), para proteger a los animales endotoxémicos de la excesiva peroxidación, obteniéndose resultados muy favorables.

3.2.3. Regulación por hormonas pancreáticas.

El páncreas se ve afectado durante los procesos de endotoxicosis, en los que existe una profunda dishomeostasis del metabolismo de la glucosa. En 1932, Cuthbertson asoció la hiperglucemia de la fase temprana de la endotoxicosis con una hipoinsulinemia absoluta o relativa y con un aumento de los niveles de glucagón, glucocorticoides y catecolaminas. Se ha sugerido que puede existir inhibición de la secreción de las células β -pancreáticas, probable-

mente como resultado de los efectos α -adrenérgicos de epinefrina y norepinefrina (Hinshaw et al., 1983).

En cuanto al mecanismo de acción de la insulina sobre sus células diana, se discute si se ve alterado o no en el *shock* endotóxico. Algunos autores opinan que no se modifica, por lo que las alteraciones en la concentración de la hormona dependerían únicamente de su velocidad de secreción (Trachte, 1983). Otros datos indican sin embargo la existencia de un aumento de la unión a receptores que, junto con la inhibición de la síntesis de insulina, podría explicar la disminución de los niveles plasmáticos de la hormona observada en la fase hipodinámica del *shock*. Se habla también de un fenómeno de pseudodiabetes ya que los niveles de insulina son anormalmente bajos en relación con la concentración de glucosa sanguínea en la primera fase del *shock* (Frayn, 1985).

Por el contrario, en la fase tardía, los niveles de insulina aumentan en parte debido a una hipersecreción de las células β (Yelich & Filkins, 1982) y en parte a una resistencia periférica a insulina (Gump, 1983; Hinshaw et al., 1983; Heath, 1985) disminuyendo la captura de glucosa por los tejidos.

Se desconoce si la resistencia a insulina es de naturaleza puramente hormonal, o si incluye daños en la membrana (cambios permanentes en los receptores de insulina) (Heath, 1985). Existe controversia en torno a este tema, incluso se ha descrito que la endotoxina aumenta la afinidad de la insulina por sus receptores en adipocitos, por lo que, tanto la hormona como los agentes que estimulan su liberación, potencian los efectos tóxicos del LPS, probablemente vía hipoglucemia (Trachte, 1983). En este sentido la endotoxina (Holley & Spitzer, 1980; Raymond et al., 1981), o mediadores producidos *in vivo* (Filkins & Buchanan, 1977), pueden tener efectos análogos a la insulina (Frayn, 1985).

En hepatocitos de rata en cultivo primario y en suspensión, se ha puesto de manifiesto que la unión de insulina y glucagón es menor en presencia de endotoxina de *E.coli*, disminuyendo las constantes de afinidad y el número de receptores de baja afinidad (Pagani et al., 1985).

3.2.4. Alteraciones en los mecanismos de detoxificación.

El hígado desempeña un importante papel en las reacciones de biotransformación de xenobióticos, en las cuales participan las monooxigenasas de función mixta dependientes de citocromo P450. Tras estas reacciones se obtienen compuestos no tóxicos (detoxificación), o bien productos más tóxicos que los iniciales (bioactivación).

El mecanismo de actuación tiene dos fases:

- 1ª) El compuesto experimenta reacciones de oxidación, reducción e hidrólisis.
- 2ª) La presencia de los grupos funcionales adquiridos en la primera fase, hace posible su participación en reacciones de conjugación (glucuronidación, sulfatación y conjugación con glutatión), por las cuales se combinan con metabolitos endógenos.

En cada una de estas fases el compuesto se hace más polar, soluble a pH fisiológico y eliminable por el riñón.

El sistema enzimático de oxidación-reducción más importante en el hígado, es el sistema del citocromo P450. Se ha demostrado que gran variedad de xenobióticos son transportados activamente e introducidos en los hepatocitos, interaccionando inmediatamente con el citocromo P450 (Grundin et al., 1975). Este citocromo actúa también sobre muchos compuestos endógenos catalizando la hidroxilación de sustratos esteroidicos (testosterona, androstanodiona, estradiol, vitamina D3) (Andersson et al., 1983; Waxman et al., 1983; Wood et al., 1983), ácidos grasos (Gibson et al., 1980) y prostaglandinas (Vatsis et al., 1982; Schwartzman et al., 1990).

Con el nombre de citocromo P450 se designa a una familia de hemoproteínas que desempeñan una misión clave en procesos de carcinogénesis química y toxicidad (Nebert & González, 1987). Estas proteínas contienen el grupo protohemo y muestran una banda de absorción entre 447nm y 454nm en el espectro de diferencia entre muestras tratadas con CO y reducidas con ditionito (Sato & Omura, 1978). El citocromo P450 fue descrito por primera vez en la fracción microsomal de hígado de mamíferos, aunque se ha detectado en casi todas las formas de vida. En mamíferos se ha encontrado en la membrana del retículo endoplasmático de hígado, riñón, intestino delgado, pulmón, corteza adrenal, piel, testículos, placenta y otros tejidos. Sin embargo, otros órganos como el cerebro, músculo y glándula tiroidea, parecen carecer de este tipo de hemoproteína.

Los citocromos P450, participan en varios tipos de reacciones redox. De estas reacciones, la monooxigenación de una serie de sustratos es su principal función, utilizando para ello el oxígeno molecular y electrones derivados de NADPH (o NADH).

Debido a que la hemoproteína es incapaz de reaccionar directamente con nucleótidos de piridina reducidos, para que tenga lugar la reacción ha de existir un mecanismo de cooperación por el cual los electrones sean transferidos desde el NADPH hasta el citocromo P450. En las membranas hepáticas los electrones se transfieren en primer lugar a una flavoproteína, la citocromo P450 reductasa, que contiene FAD y FMN como grupos prostéticos y que posee una elevada actividad citocromo-c-reductasa.

Todo esto determina que los citocromos y las reductasas estén estrechamente unidos en la membrana, interacción que, por otra parte, requiere la presencia de fosfatidilcolina (Levin et al., 1986).

Un esquema detallado del mecanismo molecular del citocromo P450, se muestra en la Figura 7.

Estas reacciones de monooxigenación, que se localizan principalmente en el retículo endoplasmático de las células hepáticas, pueden reconstruirse *in vitro* con preparaciones microsomales y la presencia de factores adecuados, en especial NADPH. En experimentos de este tipo con sistemas reconstituídos, se ha demostrado que existe un requerimiento total (Vatsis et al., 1982; Canova-Davis & Waskell, 1984), parcial (Chiang, 1981; Imai, 1981; Waxman & Walsh, 1983) o nulo (Lu et al., 1974; Kuwahara & Omura, 1980), por el citocromo b₅ en

dependencia de la isoenzima del citocromo P450 utilizada y del sustrato escogido (Kuwahara & Omura, 1980; Morgan & Coon, 1984).

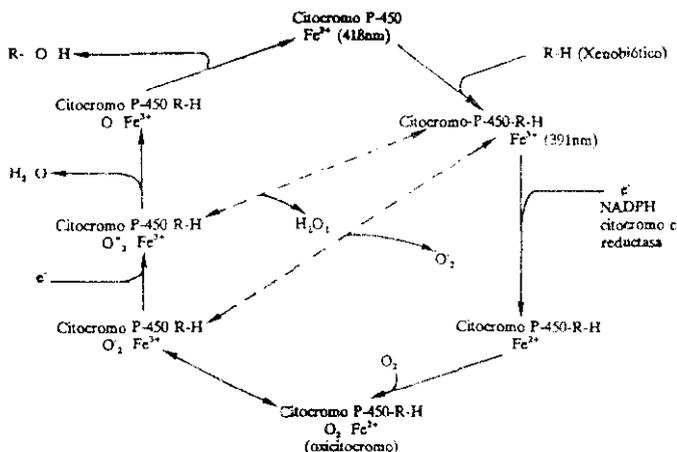


Figura 7: MECANISMO PROPUESTO PARA LA BIOTRANSFORMACION DE XENOBIOICOS POR EL SISTEMA DEL CITOCROMO P450.

El citocromo b_5 , es una proteína transportadora de electrones que posee un grupo hemo unido no covalentemente (protoporfirina IX) como grupo prostético. Se encuentra como proteína integral en la cara citoplasmática de la membrana del retículo endoplasmático hepático, funcionando como un componente del sistema δ^9 -estearilCoA-desaturasa NADH-dependiente (Strittmatter et al., 1974).

También está implicado, en las reacciones de hidroxilación microsomal NADPH-dependientes (oxidasas de función mixta). Recientemente se ha demostrado que el citocromo b_5 es capaz de aumentar específicamente las actividades monooxigenasas en células intactas (Aoyama et al., 1990). Este efecto potenciador de la oxidación de determinados sustratos no parece estar mediado por un aumento de la velocidad de interacción del sustrato con el centro activo del P450 (Lipka & Waskell, 1989). De hecho la mayoría de los estudios *in vitro* sugieren que con ciertas formas de P450 y con ciertos sustratos, el citocromo b_5 proporciona electrones al intermedio oxigenado más rápidamente que la NADPH-citocromo P450 reductasa (Lu et al., 1973; Ingelman-Sundberg & Johansson, 1980; Pompon & Coon, 1984; Gorsky & Coon, 1986; Jansson & Schenkman, 1987). Esto va acompañado de una disminución en la formación de H_2O_2 (Gorsky & Coon, 1986; Jansson & Schenkman, 1987) por lo que en reacciones catalizadas por ciertas formas de P450 en ausencia de b_5 , se puede generar un exceso de O_2 y H_2O_2 , que podría dañar la célula (Aoyama et al., 1990).

Así pues los dos sistemas de transporte electrónico microsomal implicados en la desaturación y elongación de ácidos grasos y en la oxidación de esteroides, drogas y otros xenobióticos son:

- Uno NADH dependiente que incluye la NADH-citocromo b_5 reductasa (EC 1.6.2.2).
- Otro NADPH dependiente que incluye la NADPH-citocromo P450 reductasa (EC 1.6.2.4).

Originalmente se supuso que estos dos sistemas eran independientes, pero múltiples estudios han demostrado que están estrechamente relacionados por un mediador electrónico, el citocromo b_5 , dado que tanto la citocromo b_5 reductasa como la P450 reductasa, pueden reducir al citocromo b_5 (Enoch & Strittmatter, 1979) por lo que la P450 reductasa puede estar implicada en la estearoil-CoA desaturación (Dailey & Strittmatter, 1980). Además, algunas reacciones mediadas por el P450 requieren la aportación de un segundo electrón del citocromo b_5 (Noshiro *et al.*, 1981).

Estos datos indican que el citocromo b_5 puede funcionar en ambos sistemas recibiendo electrones del NADH o del NADPH a través de las respectivas reductasas (Tamura *et al.*, 1990) (Fig. 8).

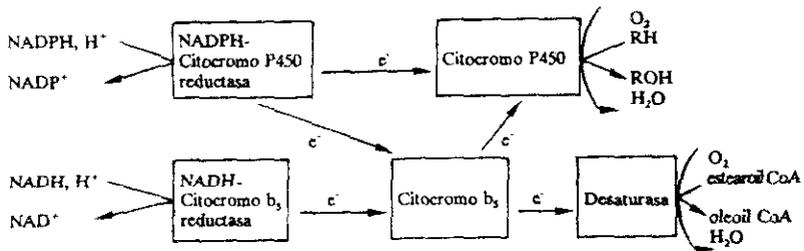


Figura 8. SISTEMA MICROSOMAL TRANSPORTADOR DE ELECTRONES.

En este sentido se ha planteado la existencia de una interacción proteína-proteína entre citocromo P450 y citocromo b_5 (Jarsson *et al.*, 1985), y de hecho se ha demostrado que algunas isoenzimas del P450 forman un complejo equimolecular relativamente fuerte con el citocromo b_5 (Bonfils *et al.*, 1981; Tamburini & Gibson, 1983; Pompon & Coon, 1984). Tamburini *et al.* (1985, 1986) han estudiado la naturaleza de las fuerzas que determinan la formación de este complejo concluyendo que existe una atracción electrostática mediada por los grupos propionato del hemo del citocromo b_5 y grupos del citocromo P450 cargados positivamente. Esto ha sido posteriormente confirmado e incluso se ha propuesto un modelo tridimensional del complejo P450- b_5 (Stayton *et al.*, 1989).

El efecto de la administración de endotoxina sobre los niveles de citocromo P450 ha sido estudiado recientemente en hígado, pulmón y glándula adrenal, utilizando como modelo

experimental la inducción *in vivo* del estado de *shock* endotóxico reversible en rata (Bosch *et al.*, 1988). Los resultados muestran una progresiva disminución de los niveles de este citocromo tras la inyección del LPS, pudiendo relacionarse con una aceleración de la degradación del grupo hemo del citocromo (Bissel & Hammaker, 1976), una disminución de la actividad δ -ALASintetasa y/o un aumento de la hemooxigenasa (Yoshida *et al.*, 1982).

Recientes estudios *in vivo* indican que el LPS reprime la expresión de los citocromos P450 constitutivos disminuyendo los niveles de su mRNA (Morgan, 1989). La IL-1 ha sido implicada en la depresión de los niveles hepáticos de citocromo P450 tras la inyección de LPS. Los ratones C3H/HeJ, que no secretan IL-1 en respuesta a la endotoxina, no muestran efecto ante el LPS en lo que al metabolismo de detoxificación hepática se refiere y sin embargo responden a la inyección de IL-1 disminuyendo los niveles de citocromo P450 y las actividades enzimáticas relacionadas (Ghezzi *et al.*, 1986).

El cultivo primario de hepatocitos, modelo útil para estudios *in vitro* de toxicidad (Guillouzo, 1986; Moldeus, 1987; Wortelboer *et al.*, 1990), ha puesto de manifiesto que la endotoxina disminuye los niveles de citocromo P450 mediante una acción directa sobre las células (Pagani *et al.*, 1987).

3.3. HEPATOPATIAS RELACIONADAS CON LAS ENDOTOXINAS.

En el intestino existe una gran cantidad de bacterias Gram-negativas que, a su vez, liberan grandes cantidades de LPS. Esta endotoxina de origen intestinal sigue en el organismo un proceso fisiológico que podría resumirse en su eliminación de la sangre portal y su detoxificación por el hígado. Si este mecanismo de eliminación se ve alterado, se producen alteraciones a nivel hepático (Fox *et al.*, 1990b).

El lipopolisacárido atraviesa difícilmente la barrera intestinal, pero en estados de inflamación, alcoholemia, hipoperfusión o anoxia, la pared intestinal permite una absorción mucho más elevada de esta macromolécula (Bode *et al.*, 1987; Van Deventer *et al.*, 1988).

Por ello, además del papel de la endotoxina en la patofisiología del *shock* endotóxico, el LPS parece intervenir en otras enfermedades. Así, numerosas hepatopatías están asociadas con frecuencia a una endotoxemia periférica (Tabla 5) (Van Bossuyt, 1989), por lo que la endotoxina intestinal ha sido propuesta como un mediador de la lesión hepática (Liehre, 1980; Nolan, 1989; Fox *et al.*, 1990b).

Tabla 5: FRECUENCIA DE ENDOTOXEMIA PERIFERICA ASOCIADA CON DISTINTAS HEPATOPATIAS.

| Hepatitis viral | Cirrosis | Ascitis | Hepatitis activa crónica | Hepatitis alcohólica | Fallo hepático fulminante | Ictericia obstructiva | Colangitis | Cirrosis biliar primaria |
|-----------------|----------|---------|--------------------------|----------------------|---------------------------|-----------------------|------------|--------------------------|
| — | 2/2 | — | — | — | 1/1 | — | — | — |
| — | 2/10 | — | — | — | 3/3 | 4/16 | 4/4 | — |
| — | 14/18 | — | 4/4 | — | — | 6/12 | — | 1/1 |
| — | 16/36 | 16/20 | — | — | — | — | — | — |
| 13/35 | 135/170 | 29/39 | 6/12 | 6/6 | 13/35 | — | — | — |
| 7/17 | — | — | — | — | — | — | — | — |
| — | — | — | — | — | — | 13/24 | — | — |
| — | — | — | — | — | — | 12/20 | — | — |
| — | — | — | — | — | — | 10/22 | — | — |
| — | 28/30 | — | 12/15 | — | — | — | — | — |
| — | 34/72 | — | 7/32 | — | — | — | — | — |

Algunas de las complicaciones vasculares de la cirrosis pueden ser consecuencia de un estado endotoxémico de origen intestinal (*Hopf et al., 1989*). Durante la ictericia obstructiva, la endotoxina causa las alteraciones postoperatorias de la función renal e incluso la muerte (*Pain et al., 1985*). El efecto antiendotoxina de las sales biliares en este sentido (*Diamond et al., 1990*) queda patente ya que la administración preoperatoria de sales biliares previene la endotoxemia y las alteraciones renales ligadas a la ictericia obstructiva (*Cahill, 1983*).

Aunque es difícil concluir si la endotoxemia es la causa o el resultado de algunas hepatopatías, en el caso de la ictericia obstructiva se ha comprobado que es una consecuencia, la cual a su vez determina un círculo vicioso ya que la lesión hepática inducida por la endotoxina es potenciada por el infarto biliar (*Shibayama, 1989*).

Por otra parte, el LPS puede actuar sinérgicamente con factores hepatotóxicos como el etanol (*Bhagwandeem et al., 1987*), el CCl₄ (*Nolan et al., 1980*) o la D-galactosamina (*Camera et al., 1983*); relacionándose la sensibilidad a hepatotoxinas con la sensibilidad al LPS. Esto ha sido demostrado para el caso de la D-galactosamina utilizando ratones C3H/HeJ, resistentes a la endotoxina y C3H/HeN, histocompatibles con los anteriores pero sensibles a la endotoxina. La transferencia de macrófagos de la estirpe sensible a la resistente, transfirió tanto la sensibilidad al LPS como a la D-galactosamina (*Freudenberg et al., 1986*).

La gran importancia de los macrófagos en la relación hepatotoxicidad ↔ endotoxicidad ya fue indicada por Nolan en 1975. Este investigador propuso entonces la siguiente hipótesis en relación al papel del LPS intestinal en las manifestaciones hepáticas y extrahepáticas de una lesión del hígado:

- 1) La función de las células sinusoidales del hígado es crítica para la viabilidad de los hepatocitos.

- 2) Si una hepatotoxina afecta a las células de Kupffer, disminuye la capacidad hepática para procesar y eliminar la endotoxina.
- 3) Esta primera lesión de las células sinusoidales convierte al hígado en excesivamente sensible a cantidades normalmente inocuas de LPS absorbido desde el intestino.
- 4) Ello da lugar a una segunda agresión al hígado que de nuevo ve disminuida su capacidad detoxificadora de LPS. Todo conduce a la presencia masiva de esta macromolécula en la circulación sistémica, ocasionando así manifestaciones extrahepáticas de la lesión.

Hoy en día esta hipótesis es aceptada, pero no obstante queda mucho por conocer sobre la contribución relativa de la **hepatotoxina** por sí misma, la **endotoxina** procedente del intestino y los **productos derivados de macrófagos**, en el daño infringido al hepatocito (Nolan, 1989; Fox et al., 1990b).

4. INCORPORACION Y PROCESAMIENTO INTRACELULAR DE LAS ENDOTOXINAS EN EL HIGADO.

Un estudio detallado, realizado en ratas, sobre la acumulación hepática del LPS, mostró que se asocia en primera instancia a las células de Kupffer y posteriormente en los hepatocitos (Freudenberg et al., 1984). La intervención directa de los macrófagos de Kupffer en la incorporación de LPS por el hígado ha sido demostrada por numerosos autores (Praaning Van-Dalen et al., 1981; Ruiter et al., 1981).

4.1. INTERACCION LPS-CELULA.

4.1.1. Membrana plasmática.

La interacción del LPS con la superficie celular constituye la etapa inicial en el mecanismo de su acción. A pesar de los numerosos estudios realizados, se conoce poco sobre las bases moleculares del proceso. No obstante existe un modelo clásico propuesto en 1973 por Shands y basado en una estructura trilaminar de los LPS (Fig. 9):

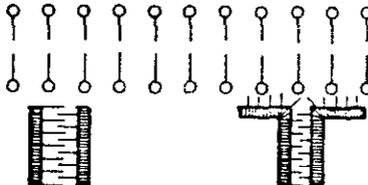


Figura 9: MODELO PARA LAS INTERACCIONES DEL LPS CON UNA BICAPA LIPIDICA.

Posteriormente se ha propuesto la existencia de dos pasos en la interacción endotoxina-membrana celular de mamíferos (Price & Jacobs, 1986):

- 1) *Adherencia*: Etapa reversible, de naturaleza iónica e independiente de la temperatura, que determina la especificidad celular del LPS.
- 2) *Coalescencia*: Etapa irreversible, temperatura-dependiente y que supone la inserción del lípido A en la bicapa lipídica.

En el caso concreto de las células de Kupffer la incorporación de LPS implicaría un mecanismo de pinocitosis adsortiva (Mathieson & Ulevitch, 1979; Fox et al., 1987; Fox et al., 1988) aunque hay datos que indican la existencia de sitios específicos de unión (Van Bossuyt & Wisse, 1988).

Los macrófagos peritoneales poseen un sistema mediado por receptor para la endocitosis de la endotoxina (Fax et al., 1987). Dicho receptor ha sido aislado y es una proteína de ≈ 80 KDa (Hunt et al., 1989), frente a la cual se han obtenido anticuerpos monoclonales que son capaces de activar *in vitro* efectos tumorocidas en macrófagos (Chen et al., 1990). Sin embargo, y utilizando los mismos animales, en las células de Kupffer no ha sido posible detectar la existencia de este receptor específico para la endotoxina (Fax et al., 1990a).

En cuanto a los hepatocitos, estudios de saturación y desplazamiento con [14 C]-LPS revelan que la unión a la membrana celular es un proceso no saturable, que no parece responder a la existencia de receptores funcionales específicos sino a interacciones físico-químicas con determinados componentes de la superficie celular (Pagani et al., 1981; Praaning Van-Dalen et al., 1981; Pagani et al., 1988).

Dijkstra et al. (1989) han propuesto que para impulsar eficientemente los efectos biológicos del LPS, es necesaria la interacción directa del lípido A con ciertos constituyentes de la membrana plasmática. Así, si la endotoxina no se utiliza aislada sino insertada en la bicapa de liposomas artificiales, disminuye de 100 a 1000 veces su potencia tóxica medida en términos de secreción de IL-1 y TNF, actividad tumorocida en macrófagos, liberación de H_2O_2 , y letalidad en ratones (Dijkstra et al., 1989). Todo ello no es debido a una menor incorporación celular de la endotoxina (Dijkstra et al., 1987), sino a la inserción estable del LPS en la membrana liposomal, que previene de la interacción del lípido A con las estructuras clave de la membrana plasmática celular.

Esta interacción directa endotoxina-membrana plasmática celular, origina alteraciones en su microviscosidad (Portolés et al., 1987), lo cual ha sido observado en estudios *in vivo* e *in vitro* y puede inducir alteraciones en la recepción y transducción de señales hormonales (Pagani et al., 1985), así como en los mecanismos de transporte iónico (Portolés, 1984) e incorporación de [14 C]-2-desoxiglucosa (Pagani et al., 1988).

4.1.2. Mitocondrias.

Se han apreciado cambios ultraestructurales desencadenados en estos orgánulos por la interacción directa con el LPS tras su incorporación en las células (Greer & Melazzo, 1975). Estas alteraciones morfológicas se localizan en la membrana interna y suponen desorganización de las crestas mitocondriales que originan así desequilibrios en el control respiratorio. Parece estar inhibida la actividad ATPasa mitocondrial de manera que se imposibilita el transporte de ADP y ATP a través de la membrana mitocondrial, con lo que se paraliza la síntesis de ATP (Schumer, 1983).

La acción de la endotoxina sobre mitocondrias hepáticas modifica también la incorporación de calcio así como la activación de la fosfolipasa A₂ por este catión, dando lugar a hidrólisis de fosfolípidos de la membrana interna y originando un incremento en la permeabilidad mitocondrial (Conde et al., 1981). En este sentido, ha sido descrito un incremento del contenido total de calcio en el hígado durante el shock endotóxico (Deaciuc & Spitzer, 1987). También se ha comprobado que la administración de bloqueantes de calcio reduce la mortalidad de ratas endotoxémicas (Lee & Lum, 1986).

Los ácidos grasos de la molécula del LPS parecen estar directamente implicados en los efectos mencionados sobre la funcionalidad mitocondrial (Bradley, 1979).

Además de las consecuencias celulares de la posible interacción directa LPS-mitocondria, hay que tener en cuenta los efectos de otros dos factores concurrentes en el shock endotóxico (Heath, 1985):

- La hipoxia, postulada como la etiología común en todos los daños mitocondriales.
- La liberación de enzimas lisosomales, que pueden destruir la estructura y por tanto alterar la funcionalidad de la membrana mitocondrial.

4.1.3. Lisosomas.

Estos orgánulos están asociados tanto a la propagación como a la patogénesis del shock. Se ha observado que el tratamiento con LPS aumenta su fragilidad (Bradley & Bond, 1975), siendo ésta una de las más importantes consecuencias de la endotoxina en el hígado (Kettner et al., 1983). Además se observa la aparición de vacuolas relacionadas con procesos de autofagocitosis y degradación de orgánulos subcelulares.

Por otra parte, no sólo se promueve la liberación de enzimas lisosomales (Szilagyi et al., 1976), sino que la actividad de algunas de ellas (como la β -glucuronidasa y la fosfatasa ácida) es estimulada *in vivo* por el LPS (McGivney & Bradley, 1977).

Es probable por tanto que la estabilidad lisosomal y la distribución de enzimas lisosomales tengan papeles muy significativos en la endotoxemia, en la cual concurren además una serie de estímulos fisiopatológicos (aumento de la temperatura, disminución de la pO₂, disminución del flujo sanguíneo y presencia de radicales libres) que pueden convertir la actividad lisosomal en acciones nocivas (Leffer, 1983). La mayoría de estas acciones están relacionadas

con el sistema circulatorio e implican aumento de la permeabilidad vascular, necrosis o pérdida de la musculatura lisa vascular y alteraciones cardíacas que pueden ocasionar arritmias o fallo cardíaco. Otras incluyen modificaciones en las propiedades de las plaquetas y leucocitos, promueven coagulación o adherencia a los vasos sanguíneos, daño del parénquima pulmonar y activación del sistema de complemento. Esto último puede a su vez cerrar el ciclo induciendo ruptura lisosomal.

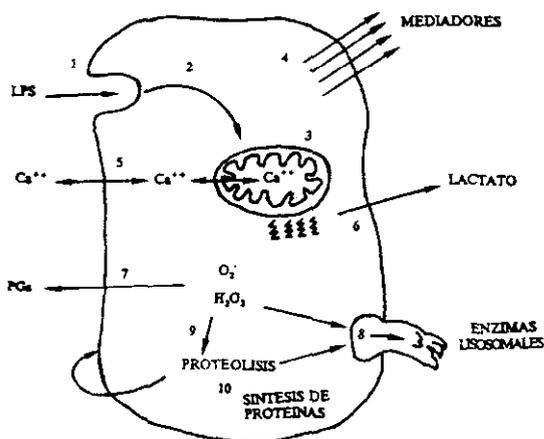


Figura 10: BASES CELULARES DE LA ACCION DEL LPS (Bradley, 1985).

(1) Incorporación (2) Translocación del LPS a través del citoplasma (3) El grupo toxóforo del LPS se une a la membrana mitocondrial (4) Se liberan mediadores durante y tras la incorporación de la endotoxina (5) Los flujos de calcio se alteran durante la captura del LPS y por lesión mitocondrial (6) ADP y NADH se acumulan en el citoplasma, estimulando la producción de lactato (7) Radicales superóxidos y peróxido de hidrógeno oxidan lípidos, produciendo prostaglandinas (8) Los lisosomas se activan y liberan enzimas lisosomales (9) Se oxidan proteínas intracelulares, degradándose (10) Es estimulada la síntesis de proteínas.

4.2. PROCESAMIENTO INTRACELULAR DE LOS LIPOPOLISACARIDOS.

Diversos estudios han indicado que el hígado modifica la endotoxina por desacilación, pero ello no elimina la toxicidad de la molécula (Freudenberg et al., 1984; Freudenberg & Galanos, 1985).

Mientras los macrófagos peritoneales alteran la porción de ácidos grasos de la molécula del LPS (Munford & Hall, 1985), en las células de Kupffer la modificación se realiza preferentemente sobre el componente polisacárido (Fox et al., 1989). En ninguno de los dos

casos la molécula pierde su toxicidad pero sin embargo parece dar lugar a una mayor velocidad de incorporación por los hepatocitos (Fox et al, 1990).

Las células parenquimatosas procesan *in vitro* la endotoxina bacteriana mediante desacilación, habiéndose demostrado por otra parte que el hepatocito interna preferentemente el LPS de mutantes bacterianos rugosos (región de polisacárido incompleta) (Fukuda et al, 1989).

Todo ello parece sugerir que el procesamiento hepático del LPS requiere la intervención de varios tipos celulares: las Kc que lo desglicosilan y las Pc que seguidamente lo desacilan para quizás eliminar completamente su toxicidad mediante una desfosforilación final (Fox et al, 1990). Este esquema es similar al descrito para la eliminación y metabolización del antígeno carcinoembrionario (Toth et al, 1985) y del complejo hemoglobina/haptoglobina (Wada et al, 1970) y puede representar un mecanismo bioquímico seguido por el hígado para secuestrar y eliminar antígenos derivados del intestino.

En la actualidad, sólo en neutrófilos humanos ha sido demostrada la existencia de una modificación intracelular de la endotoxina bacteriana que implique la pérdida completa de su toxicidad. Dicha modificación supone la eliminación de ácidos grasos no hidroxilados del lípido A (Munford & Hall, 1986). Este proceso puede representar un mecanismo secundario de seguridad que entra en juego si el LPS escapa a los mecanismos de destoxificación hepáticos (Fox et al, 1990).

4.3. COMUNICACION CELULAS SINUSOIDALES ↔ CELULAS PARENQUIMATOSAS. MEDIADORES DEL SHOCK.

Ya ha sido mencionado (Introducción, apdo. 3.3.) que la función de las células sinusoidales es crítica para la viabilidad de los hepatocitos, destacando la importancia de los macrófagos de Kupffer en la comunicación Sc ↔ Pc durante los estados de hepatotoxicidad-endotoxicidad (Nolan, 1975).

Las células de Kupffer constituyen la población de macrófagos más cercana a los hepatocitos. La proximidad física entre estas dos poblaciones hace que se comuniquen tanto en condiciones normales como en estados sépticos, contribuyendo esta interacción no sólo a cambios en la función del hepatocito sino también a modular algunas de las respuestas específicas de las células de Kupffer (Ding & Nathan, 1988; Laskin et al, 1988).

Existen evidencias de que los macrófagos hepáticos pueden modular la síntesis de proteínas y el suministro de glucosa por los hepatocitos (Kuiper et al, 1987; Billiar et al, 1989). En un sistema de co-cultivo Kc/Pc, las células de Kupffer inducen a los hepatocitos a sintetizar más proteína que si se cultivan solos. Además, la endotoxina, que no tiene efecto sobre la síntesis proteica en el caso de cultivos puros de Pc, inhibe dicha síntesis mediante activación de las células de Kupffer en el caso de co-cultivos Kc/Pc. Esta inhibición tiene lugar vía un mecanismo dependiente de L-arginina y no está asociado con muerte de las células parenquimatosas (Billiar et al, 1989).

Por otra parte, las Kc, como cualquier macrófago, liberan tras ser expuestas al LPS una serie de factores (TNF α , IL-1, IL-6, IFN γ , PGs) que regulan algunas funciones del hepatocito (Darlington *et al.*, 1986; Brass *et al.*, 1987; Gauldie *et al.*, 1987; Koj *et al.*, 1987; Tsutsumi *et al.*, 1989).

Recientemente se han establecido una serie de criterios que han de cumplir esas sustancias para poder considerarse como mediadores liberados en la endotoxemia. Estos criterios atienden a su concentración, a su acción fisiopatológica durante el shock y al comportamiento de sus inhibidores o antagonistas respecto a la supervivencia (Haglund, 1983). De acuerdo con esto, los eicosanoides (TXA $_2$, LTC $_4$, LTD $_4$), las interleuquinas y de un modo especial el TNF α , cumplen todos los requisitos supuestamente necesarios para intervenir en la propagación del shock (Bond, 1984; Filkins, 1985) (Figs. 11, 12 y 13).

Figura 11: ACCION DE LOS EICOSANOIDES EN EL SHOCK.

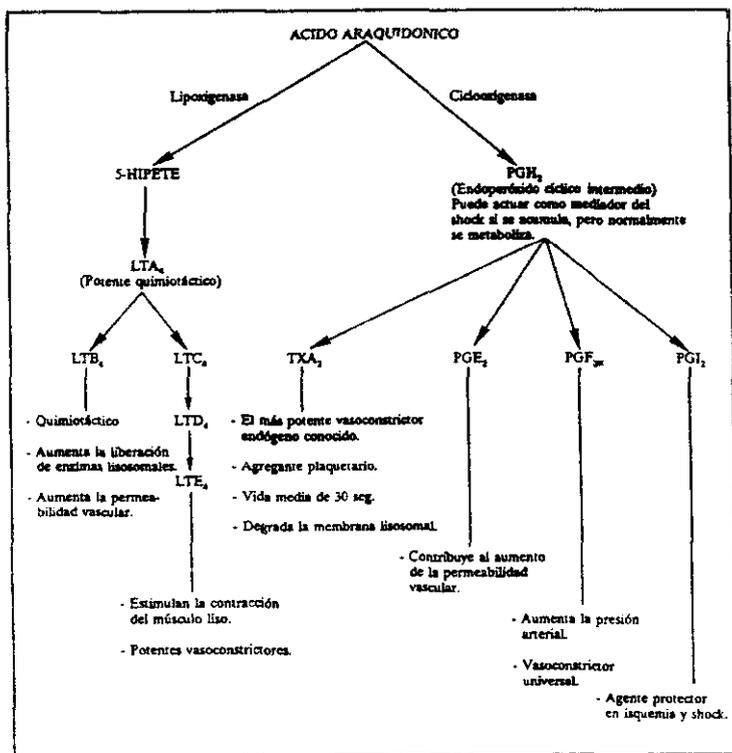
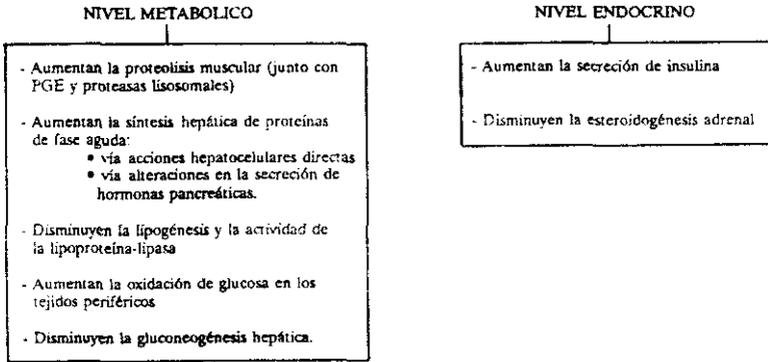
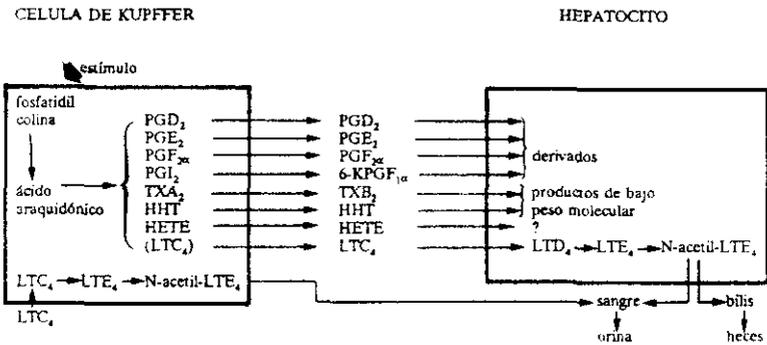


Figura 12: ACCIONES DE LAS MONOQUINAS EN EL SHOCK



En la comunicación Kc ↔ Pc queda pues patente el efecto de las células de Kupffer sintetizando y liberando determinados factores solubles, sobre la función de los hepatocitos. Sin embargo, la hipótesis de que las Pc puedan también modular la respuesta de las Kc ante un estímulo, está menos extendida. No obstante, Billiar *et al* (1990) han apoyado esta teoría, remarcando la importancia de la PGE₂ en las interacciones Kc ↔ Pc.

Figura 13: CONTRIBUCION DE LAS Kc Y LAS Pc A LA SINTESIS Y DEGRADACION DE METABOLITOS DEL ACIDO ARAQUIDONICO.



Teniendo en cuenta todo lo expuesto, y aunque existen numerosos resultados sobre aspectos parciales de la fisiopatología del *shock endotóxico*, no hay una teoría global que permita explicar el proceso en su conjunto. Las nuevas aproximaciones experimentales permitirán esclarecer cada vez más los mecanismos moleculares del *shock* y con ello avanzar en su tratamiento clínico.

5. OBJETIVOS

Dada la complejidad de la fisiopatología del *shock endotóxico*, el estudio de los mecanismos primarios implicados en su desarrollo requiere la utilización de distintos modelos experimentales complementarios tanto *in vivo* como *in vitro*.

El objetivo del presente trabajo es aportar nuevos datos sobre las alteraciones hepáticas inducidas por el lipopolisacárido de *E.coli* 0111:B4 (LPS) *in vivo*, y sobre las producidas por el tratamiento directo, *in vitro*, con la endotoxina, de distintas poblaciones celulares: células parenquimatosas y células sinusoidales enriquecidas en macrófagos de Kupffer.

Mediante el modelo *in vivo* de *shock endotóxico reversible*, se analizarán diversos aspectos de la acción del LPS que pueden ser los principales responsables de la hepatotoxicidad:

- Actividad de la enzima superóxido dismutasa, ya que los radicales libres de oxígeno contribuirían a la propagación y desarrollo del *shock*.
- Peroxidación lipídica, directamente relacionada con los radicales libres y que puede ocasionar lesiones en la membrana plasmática celular.
- Niveles de citocromo b₅, implicados en los mecanismos de reparación de membrana y destoxificación celular.

Con el fin de determinar la importancia del LPS *per se* como agente directo causante de las lesiones hepáticas observadas *in vivo*, se analizará su acción *in vitro* sobre las células del parénquima y sobre las sinusoidales, distinguiéndose de este modo la contribución relativa de cada tipo celular en la lesión. Los aspectos concretos que se estudiarán son:

- Aislamiento y caracterización morfológico-funcional de los cultivos de células sinusoidales hepáticas enriquecidas en macrófagos de Kupffer.
- Incorporación y localización intracelular de la endotoxina en dichos macrófagos, así como las alteraciones morfológicas que ello ocasione.
- Propiedades físicas de la membrana plasmática: liberación de lactato deshidrogenasa, incorporación de diacetato de fluoresceína y microviscosidad.
- Propiedades funcionales de la membrana plasmática: incorporación de 2-desoxiglucosa, unión e internación de insulina y de LDL.

- *Parámetros bioquímicos intracelulares: actividad de la glucoquinasa, fosfatasa ácida y superóxido dismutasa; radicales superóxido, peroxidación lipídica, niveles de citocromo b₅, homeostasis del calcio y pH intracelular.*

Con todo ello y ensayos complementarios de interacción células sinusoidales ↔ células parenquimatosas, se plantea el estudio de distintos parámetros que puedan modular la respuesta celular frente al lipopolisacárido.

II. MATERIALES Y METODOS.

I. ENDOTOXINA.

La endotoxina utilizada en todos los ensayos es el lipopolisacárido de la cepa de *E.coli* serotipo 0111:B4 (ATCC), obtenido por el método de *Westphal et al. (1952)* (Difco, Detroit, MI, U.S.A.).

Para comprobar la pureza del LPS usado, respecto de la posible presencia de RNA, se realizan los espectros de absorción U.V. de cada una de las preparaciones de endotoxina, en un intervalo de longitudes de onda entre 330 y 230 nm. Valores del cociente A_{260}/A_{280} superiores a 1.2 indican contaminación de RNA (*Romanowska, 1970*). En las preparaciones de LPS utilizadas, la relación anterior fue menor o igual a 1.2.

2. MATERIAL BIOLÓGICO.

Tanto para el estudio de la acción endotóxica *in vivo* como *in vitro*, se utilizan ratas macho *Wistar* de un peso comprendido entre 150 y 200g.

3. MODELOS EXPERIMENTALES.

3.1. INDUCCIÓN DEL SHOCK ENDOTOXICO REVERSIBLE.

Las ratas se mantienen con H₂O y dieta convencional hasta las 9:30 h, momento en el que son anestesiadas con éter para evitar al máximo cualquier estrés. Se administra entonces por inyección intravenosa (i.v.) (en la vena dorsal o ventral de la cola) una solución de LPS en suero fisiológico (NaCl 0.9%), agitada y sonicada previamente durante 5min en baño Ultrasons a temperatura ambiente. La dosis inyectada es de 1.6mg LPS/0.2ml/100g de peso. A las ratas control se les inyecta una solución de NaCl (0.9%) en la misma proporción.

A distintos tiempos se sacrifican las ratas descerebrándolas. Mediante punción cardíaca se toma sangre para la posterior medida de parámetros séricos (*Resultados, apdo. 1.1.*). Inmediatamente después se extrae el hígado y se perfunde con NaCl (0.9%) para eliminar los glóbulos rojos y evitar la contaminación de hemoglobina en las muestras, que alteraría las posteriores determinaciones espectrofométricas (*Materiales y Métodos, apdos. 10.5, 12 y 13*).

Las muestras se mantienen a -20°C hasta su posterior análisis.

3.2. AISLAMIENTO DE DISTINTOS TIPOS CELULARES HEPATICOS.

3.2.1. Células parenquimatosas.

En el hígado, las células del parénquima (hepatocitos, Pc) son, con mucho, las mayoritarias. Se calcula que el 65% del total de células de este órgano son células parenquimatosas (Weibel *et al.*, 1969). Son además, las de mayor tamaño ($\approx 100\mu\text{m}$ de diámetro, $\approx 78\%$ del volumen hepático), por lo que presentan una gran tendencia a sedimentar, por la simple acción de la gravedad, en 1-2min. Por todo ello su aislamiento requiere las técnicas de separación y purificación celulares que se describen a continuación.

a) Aislamiento y purificación.

Los hepatocitos se aíslan mediante la perfusión *in situ* del hígado de rata con colagenasa (tipo I, Sigma, St. Louis, MO, U.S.A.) al 0.035%, según el método de Berry y Friend (1969) modificado.

Las ratas, ayunadas y mantenidas con H_2O *ad libitum* 18 horas antes de la perfusión (9:00 a.m.), se anestesian en primer lugar con éter para evitar el estrés y la vasoconstricción periférica hepática que puede inducirse por la liberación de catecolaminas, y posteriormente con pentotal sódico (10mg/100g de peso/100 μl solución salina) (Abbott International, Ltd., U.S.A.) inyectado intraperitonealmente.

Se practica una laparotomía amplia hasta el diafragma y se retira la capa de piel y músculo para apartar la masa visceral y dejar el hígado y los vasos sanguíneos bien visibles. A continuación se preparan dos ligaduras alrededor de la vena porta: una anterior a la entrada de la vena mesentérica superior, y otra posterior. Entre estos dos puntos se introduce en la vena porta una cánula conectada al circuito de perfusión accionado por una bomba peristáltica (Millipore, Bedford, MA, U.S.A.) de flujo regulable. Se tensan las ligaduras e inmediatamente se hace un corte en la vena cava inferior que permita la salida del líquido de perfusión. Lentamente se va incrementando el flujo, mínimo durante la canulación, hasta alcanzar 26ml/min.

Durante el proceso se utilizan secuencialmente dos tipos de soluciones Krebs-Ringer-Bicarbonato (KRB-I y KRB-II) (Tabla 6). Ambos líquidos se mantienen a 37°C y se gasean con carbógeno (95% O_2 :5% CO_2) de forma permanente durante el transcurso de la perfusión.

En primer lugar, se hace pasar el líquido de lavado, KRB-I (126ml), libre de calcio y magnesio, y que lleva en disolución 45mg de EDTA. Este agente quelante, al desplazar el calcio, evita la coagulación y hace que el tejido sea más susceptible a la posterior disgregación enzimática (Seglen, 1972). Seguidamente se perfunde con la solución KRB-II (131ml), a la que se añaden 39mg de colagenasa. El KRB-II contiene calcio, que activa a la enzima, y está libre de magnesio, que inhibe a la enzima (Seglen, 1973).

Una vez finalizada la perfusión, se extrae el hígado y se coloca sobre una placa Petri que contiene KRB-III (con calcio y magnesio) a 0°-4°C.

Tabla 6: Composición de los KRB.

| SALES | % | VOLUMEN (ml) | MOLARIDAD (mM) | MOLARIDAD FINAL (mM) |
|--------------------------------------|------|-----------------|-------------------|----------------------------|
| NaCl | 0.90 | 100 | 154 | 118.40 |
| NaHCO ₃ | 1.30 | 21 | 154 | 24.87 |
| KCl | 1.15 | 4 | 154 | 4.73 |
| KH ₂ PO ₄ | 2.10 | 1 | 154 | 1.18 |
| MgSO ₄ ·7H ₂ O | 3.82 | 1 | 154 | 1.18 |
| CaCl ₂ ·2H ₂ O | 1.62 | 3 | 110 | 2.53 |

KRB-I (126ml): KRB sin Ca⁺⁺ y sin Mg⁺⁺ + 45mg de EDTA + 125µl de antibióticos.

KRB-II (131ml): KRB sin Mg⁺⁺ + 5ml de CaCl₂·2H₂O + 39mg de colagenasa + 125µl de antibióticos.

KRB-III(260ml): KRB completo + 125µl de antibióticos. Se mantiene a 0°-4°C.

Estas disoluciones han de prepararse inmediatamente antes de ser utilizadas, gaseándose durante 15min con carbógeno y agitación magnética fuerte. El pH óptimo es de 7.5 y no debe descender de 7.3.

La solución de antibióticos contiene 2x10⁷U.I. de Penicilina y 40mg de Estreptomicina (Antibióticos S.A., León, E.) por ml de H₂O estéril.

Todas las operaciones posteriores se realizan en condiciones estériles en una cámara de flujo laminar horizontal (Telstar, CAM 700-I).

Se separa la cápsula de Glisson que envuelve al hígado y a continuación se trocea la masa hepática para facilitar la liberación de las células. La mezcla se pasa a un contenedor estéril y se agita y gasea durante 5min con carbógeno. Posteriormente se filtra a través de gasa doble, para eliminar trozos de tejido no disgregado, y se centrifuga a 165g durante 20seg a 4°C en una centrifuga Sorvall RT6000 (rotor angular). De este modo se separan con el sobrenadante las células no parenquimatosas, hematíes y células muertas que pueda haber en la preparación. El sedimento se lava 2 ó 3 veces con medio de cultivo William's E estéril (Flow Laboratories, Irvine, Ayrshire, U.K.). El último *pellet* se resuspende en un volumen conocido (3-5ml) de medio de cultivo si se van a cultivar las Pc, o del tampón adecuado si se procede a trabajar con ellas en suspensión.

El material usado durante todo el proceso ha de ser estéril y preferentemente de plástico para no dañar las células.

b) *Determinación de la viabilidad celular y recuento de células.*

La viabilidad celular se determina mediante la prueba de exclusión del azul tripán: a 50 μ l de la suspensión de células se le añaden 900 μ l de KRB-III y 100 μ l de una solución de azul tripán al 1% en NaCl (0.9%). Se mezclan y se realiza el recuento en una cámara Neubauer (0.0025mm²/0.10mm) bajo un microscopio Leitz mod. Laborlux K.

También se ha realizado la prueba de incorporación de la sonda FDA (*Materiales y Métodos, apdo. 6.1.*).

Las suspensiones de células utilizadas presentan viabilidades de $90 \pm 5\%$, obteniéndose $100 \times 10^6 \pm 20 \times 10^6$ Pc/hígado.

c) *Cultivo primario.*

Los cultivos se realizan en botellines de plástico estériles Corning (25cm², 50ml) o en microplacas de 24 pocillos (Costar, Cambridge, MA, U.S.A.), conteniendo en algunos casos cubreobjetos Bellco rectangulares (13x54mm ó 6x24mm) o circulares (12mm de diámetro), respectivamente. Las condiciones son las siguientes:

- Medio William's E con 2.20g/l de bicarbonato y sin glutamina (Flow Laboratories, Irvine, Ayrshire, U.K.).
- Suero bovino fetal (Flow Laboratories, Irvine, Ayrshire, U.K.) descomplementado (56°C/60min), al 10%.
- La cantidad de células añadidas es de 6×10^6 Pc/botella y 3×10^5 Pc/pocillo.
- En todos los casos se añaden 2.5 μ l de una solución concentrada de antibióticos (500U.I. Penicilina/ml medio y 100 μ g Estreptomina/ml medio), por cada ml de medio.
- El volumen final de medio de cultivo es de 4.5ml/botella y 0.5ml/pocillo.

Una vez añadidos el medio y las células a los botellines o microplacas, éstos se mantienen en atmósfera de carbógeno a 37°C (Heraeus B5061) durante 4 horas, periodo tras el cual se han adherido las células viables. A continuación se procede a lavarlas suavemente, se retira el sobrenadante y se añade igual cantidad de medio nuevo. Seguidamente se mantienen los cultivos a 37°C y en atmósfera de carbógeno durante 24 horas, para realizar después los ensayos correspondientes.

3.2.2. Células no parenquimatosas.

Las células no parenquimatosas (células sinusoidales, Sc, NPc) están constituidas por cuatro tipos celulares diferentes: células de Kupffer (Kc, macrófagos), células endoteliales (Ec), células acumuladoras de grasa (*fat-storing*) y células *pit*. Todas ellas constituyen aproximadamente el 35% del número total de células del hígado (*Weibel et al., 1969*), siendo los macrófagos de Kupffer sólo un 25% del total de NPc (en rata). Las semejanzas en tamaño y forma entre los 4 tipos de células sinusoidales determinan la necesidad de utilizar un

procedimiento complejo de aislamiento y purificación celulares, con el fin de obtener preparaciones de NPC enriquecidas en células de Kupffer.

a) Aislamiento y purificación.

Se lleva a cabo mediante la perfusión recirculante del hígado de rata con collagenasa (tipo H, Boehringer, Mannheim, G.) al 0.04% y pronasa (proteasa E, EC 3.4.24.4., Merck, Darmstadt, G.) al 0.04%, según el método de *Van Bossuyt y Wisse (1988)*, modificado como se describe a continuación:

El pretratamiento de las ratas (ayuno y anestesia) antes de iniciar la operación, es idéntico al realizado en el caso de la obtención de Pc (*Materiales y Métodos, apdo. 3.2.1.a*). De igual modo se practica una laparotomía amplia y, tras retirar la capa de piel y músculo, se aparta cuidadosamente la masa visceral dejando el hígado y los vasos sanguíneos perfectamente accesibles. A continuación se prepara una ligadura alrededor de la vena porta, concretamente entre la entrada de la vena mesentérica superior y el hígado. Por debajo de este punto se introduce en la vena porta una cánula de plástico flexible con una aguja metálica en su interior. La cánula está conectada al circuito de perfusión accionado por una bomba peristáltica de flujo regulable (Millipore, Bedford, MA, U.S.A.). Se tensa la ligadura e inmediatamente ha de hacerse un corte en la vena cava inferior que permita la salida del líquido de perfusión. Lentamente se incrementa el flujo, que era mínimo durante la canulación, hasta alcanzar 20ml/min. Se quita entonces la aguja interna de la cánula, reconectando el circuito. Cuando se observa que el hígado está completamente lavado, se detiene la bomba y se extrae el órgano que se coloca sobre una placa Petri que presenta un orificio conectado al circuito, permitiendo, de este modo, recoger y recircular o no el líquido con el que desde ahora se perfunde. A partir de este momento todas las operaciones se realizan en condiciones estériles en una cámara de flujo laminar vertical (Telstar MicroV).

Durante el proceso se utilizan secuencialmente dos tipos de soluciones *Gey's-Balanced-Salt-Solutions* (GBSS) (KCl 5mM, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2mM, KH_2PO_4 0.2mM, NaHCO_3 3mM, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1mM, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3mM, NaCl 138mM, glucosa 0.1% (p/v) y en el GBSS-II $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1.6mM; pH 7.4), mantenidas a 37°C, esterilizadas mediante filtración (Sterivex-GV, 022µm, Millipore) y a las que se les añade Penicilina (400U.I./ml), Estreptomicina (100µg/ml) y Gentamicina (50µg/ml) (Antibióticos S.A., León, E.).

En primer lugar se hace pasar el líquido de lavado, GBSS-I (200ml). Está libre de calcio y lleva en disolución 75mg de EDTA por las mismas razones que en el aislamiento de hepatocitos (desplazar al calcio, evitar la coagulación y hacer así que el tejido sea más susceptible a la posterior disgregación enzimática).

Seguidamente se perfunde con GBSS-II (100ml), que lleva calcio (1.5mM) y las enzimas collagenasa H (0.04%), que digiere la matriz de colágeno, y pronasa E (0.04%), que destruye selectivamente las Pc. Comienza en este momento la recirculación. Esta se mantiene durante 25-30min, para la completa digestión de la matriz extracelular.

Una vez finalizada la perfusión, se desconecta el hígado del circuito y se pasa a una placa Petri con GBSS-II para separar la cápsula de Glisson y favorecer la salida de las células al

medio. El tejido disgregado ha de incubarse durante 30min con colagenasa (0.025%) y pronasa (0.025%) en GBSS-II suplementado con Hepes 20mM (100ml). La incubación se lleva a cabo a 37°C en un baño (ORBIT, Lab-Line Inst., Melrose Park, IL, U.S.A.) con agitación rotatoria (100rpm) para favorecer la destrucción de los hepatocitos. Posteriormente se añade una pequeña cantidad (0.0002%) de DNasa (Merck, Darmstadt, G.) a la suspensión celular y se incuba en el mismo baño durante 10min (37°C, 100rpm). De este modo se evita la formación de geles de DNA que atraparían células en su interior lo cual disminuiría el rendimiento del método.

La suspensión es entonces filtrada a través de gasa de nylon (106 μ m) (Small Parts Inc., Florida, U.S.A.) para eliminar los trozos de tejido no disgregado y posibles agregados de Pc. Seguidamente se centrifuga el filtrado a 200g durante 10min (centrifuga Sorvall RT6000, rotor flotante), resuspendiéndose el sedimento en GBSS-II. La mayor parte de los hepatocitos que aún pueden estar presentes en la preparación, se separan por sedimentación. La mezcla se reparte en 4 tubos (Falcon, Becton Dickinson, NJ, U.S.A.) completando hasta 50ml con GBSS-II. Se agitan suavemente y se dejan sedimentar a 1g durante un máximo de 6min. Tras recoger cuidadosamente el sobrenadante, se somete a 200g/10min.

A continuación se lleva a cabo una centrifugación en gradiente de nycodenz (NYCOMED AS, Oslo, N.) al 17.5%, para lo cual el sedimento anterior ha de ser resuspendido en un volumen de GBSS-II igual a $n \times 5$ ml y bien mezclado con $n \times 7$ ml de nycodenz al 30% (en GBSS libre de NaCl); siendo n el número de gradientes a realizar, que depende del número de células obtenido al llegar a este punto del aislamiento (generalmente $n=3$). La densidad final de la mezcla así obtenida es de 1.089g/ml. Cada uno de los n gradientes ha de ser cubierto cuidadosamente (interfase nítida) con 1ml de GBSS-II/tubo (Costar, Cambridge, MA, U.S.A.). Después de centrifugar a 1400g durante 15min, los glóbulos rojos y restos celulares sedimentan, mientras que las NPc (células de Kupffer y endoteliales fundamentalmente) quedan flotando en la capa superior del gradiente, protegidas de la sequedad por el tampón añadido previamente.

Dicha banda superior del gradiente es recogida y lavada dos veces con DMEM (Dubelcco's Minimal Essential Medium, con glutamina 548mg/l, Hepes 20mM y NaHCO₃ 10mM), para eliminar los restos de nycodenz. El último sedimento se resuspende en un volumen conocido de DMEM (10-15ml), procediéndose al recuento de las células.

Es importante que el material usado durante todo el proceso sea estéril y preferentemente de plástico, dada la facilidad de los macrófagos de Kupffer para adherirse al vidrio.

b) Determinación de la viabilidad celular y recuento de células.

Al igual que en el caso de Pc (*Materiales y Métodos, apdo. 3.2.1.b*), la viabilidad celular se determina mediante la prueba de exclusión del azul tripán: a 50 μ l de la suspensión de células se le añaden 50 μ l de solución de azul tripán al 1% en NaCl (0.9%). El recuento se realiza en una cámara Neubauer (0.0025mm²/0.10mm) bajo un microscopio Leitz mod. Laborlux K.

También se ha realizado la prueba de incorporación de la sonda FDA (*Materiales y Métodos, apdo. 6.2*).

Las suspensiones de células utilizadas presentan viabilidades de $93 \pm 5\%$, siendo el rendimiento de $100 \times 10^6 \pm 20 \times 10^6$ NPc/hígado y el porcentaje relativo de células de Kupffer y células endoteliales $\approx 40\%$ y 60% , respectivamente.

c) *Cultivo primario.*

El cultivo se realiza en botellines de plástico estériles (25cm^2 , 50ml), en microplacas de 4 ó 24 pocillos (13mm de diámetro) o en microplacas de 6 pocillos (35mm de diámetro) (Costar, Cambridge, MA, U.S.A.), conteniendo en algunos casos de acuerdo con la finalidad de los ensayos cubreobjetos circulares Bellco (12mm de diámetro) (Bellco Glass, Vineland, NJ, U.S.A.). Las condiciones son las siguientes:

- Medio compuesto por
 - 2/3 partes de DMEM con glutamina 584mg/l, Hepes 20mM, y NaHCO_3 10mM (Flow Laboratories, Irvine, Ayrshire, U.K.).
 - 1/3 parte de RPMI 1640 con glutamina 300mg/l y Hepes 20mM (Flow Laboratories, Irvine, Ayrshire, U.K.).
- Suero bovino fetal (Flow Laboratories, Irvine, Ayrshire, U.K.) previamente descomplementado ($56^\circ\text{C}/60\text{min}$), al 20%.
- La cantidad de células añadida es de 10×10^6 NPc/botellaín, 3.75×10^6 NPc/pocillo-35mm y 10^6 NPc/pocillo-12mm.
- Se añade Penicilina y Estreptomicina (10000U.I./ml, 10mg/ml; Flow Laboratories, Irvine, Ayrshire, U.K.) a razón de 2ml/100ml de medio (concentración final = 200U.I. Penicilina/ml y $200\mu\text{g}$ Estreptomicina/ml). Se complementa con Gentamicina (5mg/ml; Flow Laboratories, Irvine, Ayrshire, U.K.) a razón de 1ml/100ml de medio (concentración final = $50\mu\text{g}/\text{ml}$).
- El volumen final de medio de cultivo es de 4ml/botellaín, 1.5ml/pocillo-35 y 0.4ml/pocillo-12.

La preparación celular utilizada está constituida fundamentalmente por Ec ($\approx 60\%$) y Kc ($\approx 40\%$). Las células de Kupffer son las que se adhieren al sustrato más fácilmente, por lo que un vigoroso lavado de las monocapas a las 20 horas, proporciona cultivos muy enriquecidos en Kc ($\approx 80\%$) (*adherencia diferencial*).

Las células se mantienen a 37°C en atmósfera de carbógeno ($5\% \text{CO}_2$; $95\% \text{O}_2$) (Heraeus B5061) para ser utilizadas a las 48 horas de la siembra.

3.3. TRATAMIENTO DE LOS DISTINTOS TIPOS CELULARES HEPATICOS CON LIPOPOLISACÁRIDO.

3.3.1. Células en suspensión.

El último sedimento de células se resuspende en tampón y alícuotas de esta suspensión son mezcladas con un volumen adecuado de solución de LPS previamente agitada y sonicada 5min en baño Ultrasons a temperatura ambiente. A las alícuotas de células control se les añade un volumen igual de tampón sin lipopolisacárido.

3.3.2. Células en cultivo.

Una vez formada la monocapa, se retira el sobrenadante de los cultivos y se añade el mismo volumen de medio (sin suero fetal) conteniendo LPS que ha sido previamente agitado, sonicado 5min y esterilizado por filtración a través de microfiltros Millipore (Millex-65, 0.22 μ m). Los botellines control contienen una cantidad equivalente de medio sin lipopolisacárido.

También se han tratado los cultivos de hepatocitos con sobrenadantes procedentes de células sinusoidales en cultivo, preincubadas en presencia o ausencia de LPS (100 μ g/ml) durante distintos tiempos e incubadas posteriormente en algunos casos, con medio libre de endotoxina durante 48 horas (*Resultados, apdo. 3.6*).

Además, y con el fin de obtener suspensiones de NPC altamente enriquecidas en células de Kupffer, se tripsinizaron cultivos (48h) enriquecidos en dichos macrófagos mediante incubación con tripsina (Merck, Darmstad, G.) al 0.25% (p/v) en PBS durante 6min a 37°C. La inactivación de la enzima se lleva a cabo añadiendo suero bovino fetal (Flow Laboratories, Irvine, Ayrshire, U.K.) a la solución de tripsinización (1ml FCS/4ml tripsina). Tras una resuspensión enérgica, las células se lavan dos veces (200g/7min) (centrifuga Sorvall RT6000, rotor flotante) con KRH (*Resultados, apdos. 3.3.2.b, 3.5.3. y 3.5.6.b*).

Las concentraciones de LPS habitualmente usadas en ambos tipos de ensayos son: 10, 50, 100, 200 y 500 μ g/ml; siendo el tiempo de incubación con el lipopolisacárido variable según el experimento.

4. ESTUDIOS MORFOLOGICOS.

4.1. MICROSCOPIA OPTICA.

La estructura de las células en cultivo se observa mediante microscopía óptica en campo claro y en contraste de fases, con un microscopio de óptica invertida Leitz mod. Diavert (objetivos Phaco 10/0.25, Phaco L32/0.40 y EF 40/0.65, oculares Periplan NOF 10xM).

Las microfotografías se realizan con un equipo Wild MPS 20.

4.2. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN.

Las células en cultivo, tras el tratamiento con o sin LPS, se lavan con PBS a 4°C para detener el proceso. En algunos casos se realiza entonces la prueba citoquímica de la peroxidasa. Para ello se incuban las NPc con diaminobenzidina (DAB) (Sigma, St. Louis, MI, U.S.A.) al 0.1% en tampón cacodilato 0.1M pH 7.2 y que contiene H₂O₂ (0.01%) (Merck, Darmstad, G) añadido inmediatamente antes de la incubación. La solución de DAB ha de ser previamente sonicada (5min) y filtrada por papel Whatman. Tras 60min de incubación a temperatura ambiente y en oscuridad, se lavan las células y se procede a su fijación.

La fijación se realiza con una solución de glutaraldehído 0.5% y ácido tánico 2% en PBS, en la que se mantienen 10min a temperatura ambiente. Las células son entonces despegadas del sustrato y centrifugadas en microfuga durante 1-2s. El sedimento obtenido se lava dos veces con PBS a temperatura ambiente y finalmente se le añade 1ml de cloruro amónico 0.2M a 4°C. Tras 5-10min se vuelve a sedimentar en microfuga y a lavar el sedimento con PBS.

Después de esta etapa de fijación, se incluyen las muestras. Para ello se somete a deshidratación con soluciones de porcentajes crecientes de 30%, 50%, 70% y 100% en pases de 1 hora. La deshidratación con alcohol a partir de 70% y la inclusión en la resina de polimerización ha de hacerse a -20°C.

A continuación se procede a la impregnación en la resina Lowicryl K4M en soluciones de Lowicryl/etanol al 50, 70 y 100% en pases de 1 hora a -20°C (Carleman *et al.*, 1982). La resina Lowicryl evita cambios conformacionales que se pueden producir en los epítomos con otras resinas, y proporciona menor fondo a la muestra (Roth, 1982).

La polimerización de la resina se realiza con radiación ultravioleta (360nm) durante 3 días a -20°C y 2 días a temperatura ambiente.

4.2.1. Control ultraestructural.

Las muestras incluidas en la resina se tallan y se cortan con un ultramicrotomo Sorvall Porter-Blum MT2-B, obteniéndose cortes de 100nm recogidos en rejillas de cobre. Se incuban

los cortes con acetato de uranilo a saturación durante 10-15min, se lavan con agua destilada y se tiñen con plomo Reynolds (*Reynolds, 1963*) durante 5min. Se vuelven a lavar con agua y se observan al microscopio electrónico (UCM, ZAISS 902).

4.2.2. Marcaje con proteína A-oro.

Esta técnica fue propuesta por Faulk y Taylor en 1971 y consiste en localizar un antígeno mediante un doble marcaje, primero uniéndolo a su anticuerpo y luego a la proteína A unida al oro.

El oro coloidal de 5nm se prepara según el método de Faulk y Taylor (*1971*), modificado por Romano *et al.* (*1974*). Se añaden 37 μ l de tetracloruro aúrico al 4% a 12ml de agua bidestilada y a 100 μ l de fósforo blanco (dietil éter: fósforo saturado, 4:1) en un erlenmeyer siliconado. Se ajusta el pH a 6.9 con K₂CO₃ 0.2M, se agita la mezcla durante 15min a temperatura ambiente y luego se calienta a reflujo aproximadamente 15min hasta que se observa el color rojo vino.

El cálculo de la mínima cantidad de proteína A que satura al oro coloidal se realiza según el método de Horisberger *et al.* (*1975*), con la modificación de Roth y Binder (*1978*) basado en el cambio de color que se produce cuando se precipita el complejo con NaCl 5M. Una vez añadida la pA correspondiente, se agita y se añade 1ml de Carbowax 1% (20M Fluka) y se centrifuga 2 veces a 150000g durante 1 hora a 4°C. Se resuspende el sedimento rojo y se conserva a 4°C para su posterior utilización.

Se obtienen, luego, cortes de las muestras de espesor inferior a 80nm y se montan en rejillas de níquel. Se incuban en insulina desnaturalizada al 1% en PBS durante 15min para saturar las uniones inespecíficas. Después se incuban con el anti-LPS^{*} diluido a 1/100 en insulina/PBS al 1% durante 24 horas a 4°C en cámara húmeda con lo que se consigue una reacción antígeno-anticuerpo más lenta pero más específica.

Una vez realizada la incubación, se lavan las muestras en PBS y se incuban con la proteína A-Au (5nm) diluida a 1/20 en PBS, durante 1 hora a temperatura ambiente. Se lavan con PBS y con agua y se secan a 37°C. Después se tiñen las muestras con acetato de uranilo a saturación, durante 5min, se lavan, se secan a 37°C y se observan en un microscopio electrónico ZAISS 902.

A la vez, se realizan todos los controles necesarios (incubación sin antisuero específico o con un suero inespecífico, incubación sin proteína A para detectar la posible existencia de precipitados,...).

* Anti-LPS obtenido por el Dr. Díaz-Espada (Hospital Puerta de Hierro, Madrid).

5. INCORPORACION DE [¹⁴C]-LPS.

Estos ensayos se han realizado con cultivos (48h) de células no parenquimatosas enriquecidas en células de Kupffer (10⁶Npc/0.4ml/pocillo). Tras lavar las células con medio de cultivo, se incuban con concentraciones crecientes de LPS sin marcar (0, 10, 100 y 500µg/ml) y una concentración constante de [¹⁴C]-LPS marcado uniformemente en todos los carbonos (2.44µg/pocillo/0.25ml, A.E. = 4.5x10³µC/µg). Después de 2 horas de incubación a 37°C, el ensayo se detiene retirando el medio y lavando las células con medio de cultivo. A continuación, las células se despegan del sustrato mediante incubación con una disolución acuosa de dodecil sulfato sódico (SDS) (1%) (250µl/pocillo) durante 10min a temperatura ambiente. La suspensión obtenida se pasa a viales que contienen 3ml de H₂O y se les añaden 15ml del siguiente líquido de centelleo: tolueno - tritón X-100 - H₂O (2:1:0.2 ; v:v:v) con 5g/l de PPO y 0.3g/l de POPOP. Tras agitar fuertemente se determina la radiactividad de las muestras por centelleo líquido en un contador Packard Tri-Carb 3255.

6. INCORPORACION DE DIACETATO DE FLUORESCINA.

El diacetato de fluoresceína o FDA (Sigma, St. Louis, MI, U.S.A.) es una sonda ampliamente utilizada en ensayos de viabilidad celular. El ester apolar penetra fácilmente en las células donde es hidrolizado para dar lugar a fluoresceína, compuesto que se acumula en el interior celular cuando la membrana plasmática está intacta. El efecto del LPS en la producción y acúmulo intracelular de fluoresceína, es estudiado mediante las técnicas de microscopía óptica, citometría de flujo y espectrofluorimetría.

6.1. MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA.

Se utilizan hepatocitos en suspensión que, tras ser tratados con distintas dosis de LPS y durante distintos intervalos de tiempo, son incubados con FDA (1µg/ml PBS) a 37°C durante 3min. Posteriormente se observa el número de células viables mediante microscopía de fluorescencia, y el número de células totales mediante microscopía óptica en campo claro. La relación entre ambos determina la viabilidad de la muestra.

Además, se utilizan monocapas de hepatocitos cultivados sobre cubreobjetos rectangulares (13x54mm) y preincubados durante 20min a 37°C en presencia o ausencia de 500µg LPS/ml de medio de cultivo. Se retira el medio de preincubación y se añade igual volumen de tampón PBS. Seguidamente la disolución concentrada de FDA (5mg/ml acetona) es diluida 1/1000 en PBS y se adicionan 200µl/ml PBS (1µg FDA/ml PBS).

Tras 7min de incubación en oscuridad y a 37°C, la monocapa es observada con un microscopio de fluorescencia (Leitz Ortholux 12 (Ploemopak 2.5)).

6.2. CITOMETRIA DE FLUJO.

Mediante la técnica de citometría de flujo se ha podido determinar semicuantitativamente la intensidad de fluorescencia que presentan los hepatocitos (10^6 Pc/ml PBS) o las células sinusoidales enriquecidas en células de Kupffer (10^6 Sc/ml PBS) de una suspensión, incubada durante 3min con FDA ($0.05 \mu\text{g/ml}$ PBS), y preincubada en presencia o ausencia de distintas dosis de LPS (10, 100, 200 y $500 \mu\text{g/ml}$) durante 15min.

Los principios básicos de operación del citómetro de flujo utilizado (Facsan, equipado con láser de argón de 5W; Becton Dickinson, CA, U.S.A.) son:

- 1º) Hacer pasar la suspensión de células por una cámara de flujo, donde dicha suspensión es rodeada por una envolvente líquida que protegerá las células del entorno y las hará circular según un flujo laminar.
- 2º) Descomponer esa corriente laminar en una serie de gotas microscópicas, cada una de las cuales puede contener si se desea una única célula.
- 3º) Conducir las células, a la velocidad de 10.000 células/s, hacia un campo de detección donde son excitadas por un láser, emitiéndose entonces fluorescencia y dispersándose la luz en todas las direcciones.
- 4º) Medir los parámetros deseados, que en este caso son la intensidad de fluorescencia en la dirección perpendicular al láser y la dispersión de la luz en la dirección del láser. Este último parámetro está directamente relacionado con el tamaño celular.

Las medidas se hacen con una población de 20.000 células de cada muestra, a temperatura ambiente y a $\lambda_{\text{exc}} = 488\text{nm}$ $\lambda_{\text{em}} = 530\text{nm}$.

6.3. ESPECTROFLUORIMETRIA.

Mediante espectrofluorimetría es posible cuantificar la intensidad de fluorescencia emitida por la fluoresceína intracelular y la debida a la fluoresceína liberada al medio, tanto en presencia como en ausencia de LPS.

Se realizan medidas puntuales a distintos tiempos, manteniendo fijas las longitudes de onda de los máximos de excitación y de emisión de la fluoresceína ($\lambda_{\text{exc}} = 488\text{nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 525\text{nm}$).

El espectrofluorímetro empleado es un Perkin-Elmer MPF-44E y la temperatura de las cubetas se mantiene constante (37°C) con un baño termostatzado Lauda.

Para la medida de la fluorescencia total se utilizan hepatocitos cultivados sobre cubreobjetos rectangulares ($13 \times 54\text{mm}$) introducidos en los botellines de cultivo. Dichos

ubreobjetos son incubados en botellines de vidrio con 3ml de medio William's, en presencia o ausencia de distintas dosis de LPS, durante 15min a 37°C. A continuación se lavan cuidadosamente con PBS a 37°C y se colocan en el interior de la cubeta del espectrofluorímetro con la orientación que se indica en la Fig. 14. En la parte superior de la cubeta son introducidas dos piezas de teflón a ambos lados del cubreobjetos, con el fin de mantenerlo fijo.

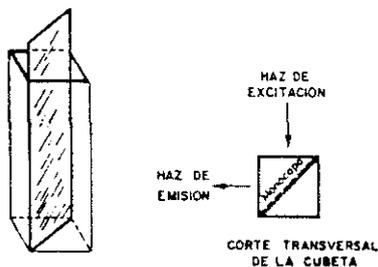


Figura 14: Orientación del cubreobjetos en la cubeta del espectrofluorímetro.

Previamente a la introducción del cubreobjetos, la cubeta del espectrofluorímetro se ha preparado con una disolución de FDA (0.025 μ g/ml PBS), todo ello a temperatura de 37°C. Tras 2min de incubación se procede a medir la intensidad de fluorescencia a distintos tiempos.

Para la medida de la fluorescencia liberada al medio se han empleado igualmente hepatocitos cultivados en botellines, a los que se ha sometido a una preincubación con o sin LPS (distintas dosis) durante 15min a 37°C. A continuación se elimina el medio, se añade una disolución de FDA (0.125 μ g/ml PBS) y se incuban 7min a 37°C en oscuridad. Transcurrido este tiempo, se retira ese volumen y se añade otro igual de PBS sin FDA. Se recogen alícuotas (300 μ l) a distintos tiempos y se pasan a la cubeta del espectrofluorímetro (preparada con 1.5ml de PBS a 37°C) para proceder a la medida de la intensidad de fluorescencia que presentan.

7. ESTUDIOS DE MICROVISCOSIDAD DE MEMBRANA MEDIANTE POLARIZACION DE FLUORESCENCIA.

Se han analizado los cambios de microviscosidad inducidos por el LPS y/o distintos agentes, óxido de fenilarsina (PhAsO) y sales biliares (SB), en diferentes modelos experimentales (membranas hepáticas y células en suspensión, Pc y NPc).

Para ello se ha utilizado la técnica de polarización de fluorescencia en estado estacionario, que consiste en incorporar un compuesto fluorescente en la muestra y excitarlo con luz

polarizada, midiendo entonces el grado de polarización de la emisión fluorescente. Este grado de polarización depende de:

- El tiempo de vida medio del compuesto fluorescente en estado excitado (τ).
- La movilidad rotacional de la sonda durante dicho intervalo de tiempo τ .

A su vez, la movilidad de la sonda depende directamente de la fluidez de su entorno, de tal modo que un aumento de la fluidez (disminución de la microviscosidad η) implica un aumento de la movilidad de la sonda y ello disminuye el grado de polarización de la emisión fluorescente (P). Por el contrario si disminuye la fluidez, aumentará P .

La polarización de fluorescencia ha sido medida, en todos los casos, en un espectrofluorímetro Perkin-Elmer MPF-44E, equipado con un baño termostatzado Lauda.

El grado de polarización de la emisión fluorescente viene dado por la siguiente expresión:

$$P = \frac{I_{VV} - G \cdot I_{VH}}{I_{VV} + G \cdot I_{VH}}$$

donde I_{VV} e I_{VH} son los componentes vertical y horizontal, respectivamente, del haz de luz fluorescente cuando la muestra es excitada por el componente vertical. G es un factor de corrección ($G = I_{HV}/I_{HH}$), que da cuenta de la polarización introducida por el monocromador de emisión.

La microviscosidad η se calcula a partir de P según la fórmula:

$$\eta = \frac{2P}{(0.46 - P)}$$

Con el fin de conocer la fluidez en las distintas zonas de la membrana plasmática de las células hepáticas, se han utilizado dos sondas:

- 1,6-difenilhexa-1,3,5-trieno (*DPH*), que se intercala en la porción hidrofóbica de la bicapa lipídica, proporcionando información de la microviscosidad de la zona interna de la membrana (*Shinitzky & Barenholz, 1978*).
- 1-[4-(trimetilamino)fenil]-6-fenilhexa-1,3,5-trieno (*TMA-DPH*), que, dada su carga catiónica, se ancla en la interfase lípido-H₂O, ofreciendo información de la microviscosidad de la zona externa de la membrana (*Prendergast et al, 1981*).

Las longitudes de onda utilizadas son, para ambas sondas: $\lambda_{em} = 365\text{nm}$ y $\lambda_{em} = 425\text{nm}$. La anchura de rendija de los monocromadores es de 6 y 5nm, respectivamente.

7.1. DETERMINACION DE LA MICROVISCOSIDAD DE MEMBRANAS PLASMATICAS HEPATICAS.

El aislamiento previo de las membranas plasmáticas hepáticas se lleva a cabo según el método de *Kelly et al. (1984)* con algunas modificaciones (*Fig. 15*). Las actividades 5'-nucleotidasa y la glucosa-6-fosfatasa se determinaron como índice de la pureza de las preparaciones.

La incorporación de la sonda (DPH, TMA-DPH) a las membranas aisladas del hígado se realiza mediante incubación en oscuridad a 37°C y con agitación continua (Unitronic 320 OR, Selecta, E.) durante 30min, de la preparación de membranas plasmáticas y una disolución estable de la sonda.

La preparación de membranas plasmáticas se diluye en tampón Tris-HCl 5mM con sacarosa 0.25M pH 7.4, hasta una densidad óptica de 0.28 a 365nm (equivale a $\approx 100\mu\text{g}$ proteína/ml tampón). De este modo se evitan posibles interferencias en las posteriores medidas de P, como consecuencia de la dispersión. Para el ajuste se utiliza un espectrofotómetro Cary mod. 118.

La disolución estable de la sonda en el tampón anterior determina una concentración final de 9 μM . Para ello se prepara una disolución concentrada del DPH (stock = 20mM) en THF o del TMA-DPH (stock = 10mM) en etanol, disolventes en los que son perfectamente solubles, y de ahí se toma una pequeña alícuota que se disuelve en el tampón mediante agitación fuerte y sonicación en baño Ultrasons durante 5min.

Tras la preincubación con la sonda, las membranas son sedimentadas por centrifugación a 30000g durante 15min entre 0° y 4°C (Sorvall mod. RC2-B, rotor SS-34), eliminando así la sonda no incorporada (sobrenadante). El sedimento se resuspende en el mismo volumen de tampón en que se encontraba ($D.O._{365} = 0.28$).

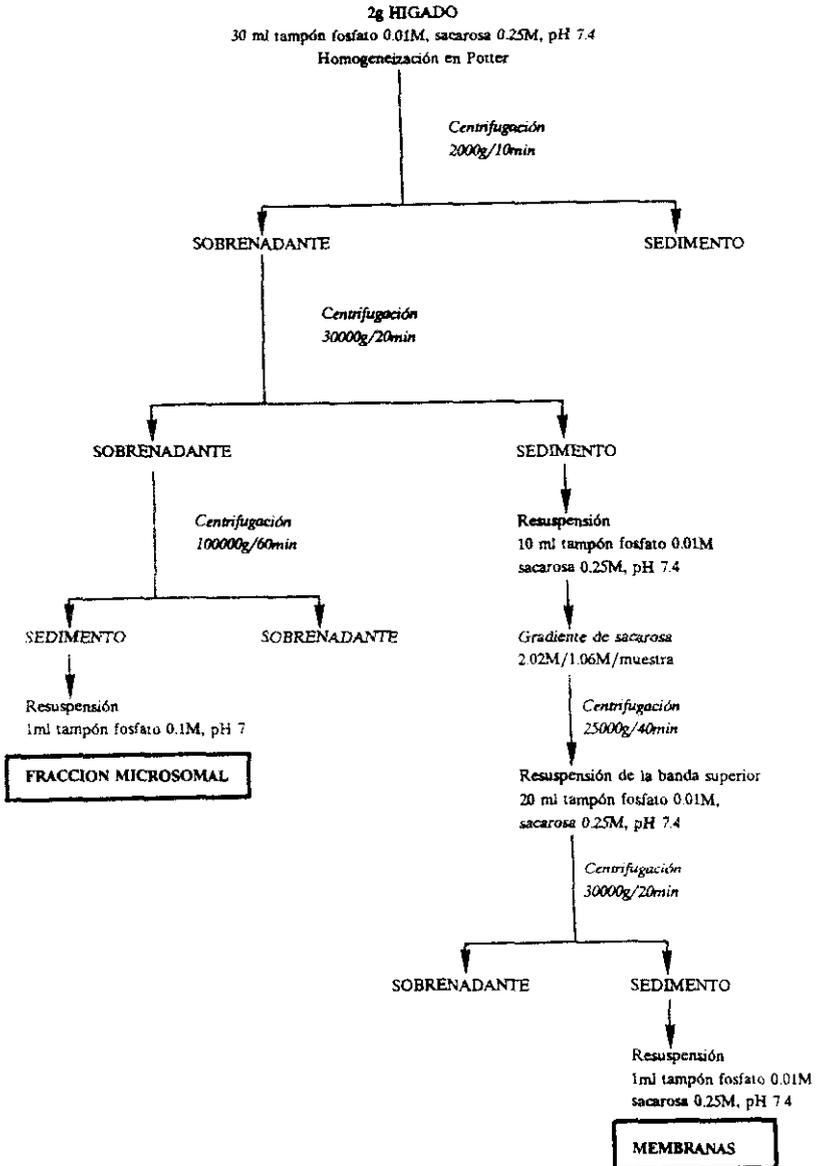
Seguidamente se realiza el tratamiento incubando la suspensión de membranas (1.4ml) con 0.1ml de tampón que contiene el agente cuyo efecto se quiere estudiar. La concentración final de LPS es 50, 100 ó 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ tampón y la del óxido de fenilarsina (PhAsO) (Sigma, St. Louis, MO, U.S.A.) 10 μM . Las disoluciones de estos compuestos son previamente agitadas y sonicadas 5min en baño Ultrasons.

La incubación se lleva a cabo a 37°C con agitación continua y durante distintos tiempos dependiendo del experimento. Inmediatamente después se procede a medir en el fluorímetro el grado de polarización (P).

7.2. DETERMINACION DE LA MICROVISCOSIDAD DE LA MEMBRANA DE DISTINTOS TIPOS CELULARES HEPATICOS.

De modo análogo a lo explicado en el *apdo. 7.1.*, la incorporación de la sonda (DPH, TMA-DPH) se lleva a cabo mediante incubación a 37°C durante 30min, en oscuridad y con agitación continua, de la suspensión celular y una disolución estable de la sonda.

Figura 15: AISLAMIENTO DE MEMBRANAS Y MICROSOMAS HEPATICOS.



Para ello, la suspensión de células se diluye en tampón Krebs-Ringer-Hesenleit (KRH: composición idéntica al KRB III pero sustituyendo el NaHCO_3 por Hepes 10mM pH 7.4) hasta una concentración de 10^6 Pc/ml ó 2×10^6 NPc/ml. Esta densidad celular hace la señal fluorescente suficientemente alta sin que exista problema de dispersión ocasionado por un excesivo número de células.

La disolución estable de la sonda en el KRH se obtiene a partir del stock concentrado preparado en THF, para el caso del DPH (20mM), o en etanol para el caso del TMA-DPH (10mM). La concentración final de la sonda es, en ambos casos, de $80 \mu\text{M}$.

Después de la preincubación con la sonda, las preparaciones celulares son sedimentadas mediante centrifugación: 165g/20s (0° - 4°C) en el caso de las Pc, y 200g/10min (0° - 4°C) en el caso de las NPc. De este modo se elimina la sonda no incorporada. Las células son entonces resuspendidas en KRH (10^6 /ml ó 2×10^6 NPc/ml) e incubadas (1ml) durante 30min a 37°C y con agitación, con 0.5ml de tampón (controles) o de la disolución del agente que se desea estudiar. La concentración final de LPS es 50, 100 ó $200 \mu\text{g}/\text{ml}$, según los experimentos. Las sales sódicas del taurocólico (TC), taurodesoxicólico (TDC), tauroursodesoxicólico (TUDC) y la considerada *mezcla fisiológica* {TC (85%) + TDC (15%)} (Calbiochem, La Jolla, CA, U.S.A.), se utilizan siempre a la concentración final de 2mM.

Las disoluciones de estos compuestos son previamente agitadas y sonicadas 5min en baño Ultrasons antes de su adición a las células.

8. INCORPORACION DE [^{14}C]-2-DESOXIGLUCOSA.

Este estudio se realiza con hepatocitos cultivados en multiplacas de 24 pocillos (3×10^5 Pc/0.5ml medio/pocillo) o con cultivos de células no parenquimatosas enriquecidos en macrófagos de Kupffer (10^6 NPc/0.4ml medio/pocillo). A las 24 ó 48 horas, respectivamente, las células se someten a distintos tratamientos según el experimento:

- Para analizar el efecto del LPS, las Pc o las NPc se preincuban en presencia o ausencia de distintas dosis de endotoxina (10, 50 y $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ William's) durante 30min a 37°C .
- Para analizar el efecto del medio de cultivo de los NPc sobre los Pc, éstos se preincuban durante 2 ó 4 horas a 37°C , con William's completo o con {2/3 DMEM + 1/3 RPMI1640} completo.

A continuación, en ambos casos, se retira el medio, se lavan las células y se añade a cada pocillo 0.5ml de una solución 0.25, 0.50 ó 1.00mM de [^{14}C]-2-desoxiglucosa ($200 \mu\text{C}/\text{ml}$) (Amersham Int. Ltd., U.K., A.E. = 318mC/mmol). Para realizar las diluciones isotópicas necesarias se utiliza 2-desoxiglucosa grado III (Sigma, St. Louis, MI, U.S.A.).

Después de 2min, se elimina el medio de los pocillos y se congela la multiplaca a -20°C para facilitar el posterior lisado de las células. Una vez descongelada y sonicada durante 5min en baño Ultrasons, se añade a cada pocillo $50 \mu\text{l}$ de H_2O , $50 \mu\text{l}$ de ácido perclórico al 60% (p/v) para precipitar las proteínas, y $50 \mu\text{l}$ de NaOH 12N para neutralizar el medio. Se separan totalmente las células del fondo del pocillo y se recogen con el líquido añadido,

lavando después cada pocillo con 50 μ l más de H₂O. El volumen total de cada uno de ellos se pasa a viales que contienen 3ml de H₂O y se añaden 15ml del siguiente líquido de centelleo: tolueno - tritón X-100 - H₂O (2:1:0.2 ; v:v:v) con 5g/l de PPO y 0.3g/l de POPOP. Tras agitar fuertemente se determina la radiactividad de las muestras por centelleo líquido en un contador Packard Tri-Carb 3255.

9. ENSAYOS DE UNION E INTERNACION DE INSULINA Y DE LDL.

Estos ensayos se realizan con hepatocitos cultivados sobre cubreobjetos circulares en multiplacas Costar de 24 pocillos (3x10⁵ Pc/0.5ml medio/pocillo). Una vez formada la monocapa, se preincuba en presencia o ausencia de LPS (100 ó 200 μ g/ml William's) durante 40min a 25°C en el caso de los experimentos con insulina o durante 30min a 37°C en el de los experimentos con la lipoproteína de baja densidad LDL. Seguidamente se retira el medio y se procede a la incubación con el agente marcado radiactivamente: [¹²⁵I]-insulina (Laboratorios Novo, Copenhague, D.) o [¹²⁵I]-LDL^{*}.

9.1. UNION DE [¹²⁵I]-INSULINA.

Su análisis se ha llevado a cabo mediante la incubación de los hepatocitos en cultivo con concentraciones crecientes de insulina sin marcar (Laboratorios Novo, Copenhague, D.) (10³, 10⁴,... hasta 10⁶pg/10⁶ Pc), y una dosis constante de [¹²⁵I]-insulina monoiodada (0.4ng/pocillo, A.E. = 66.4 μ C/ μ g); en presencia de albúmina (Sigma, St. Louis, MO, U.S.A.) al 1%, durante 90min a 25°C. El ensayo se detiene retirando el medio de incubación de los pocillos y lavando éstos con 0.5ml de William's con albúmina (1%), para separar totalmente la hormona libre de la unida. A continuación se realizan las medidas de radiactividad incorporada en los microcubres mediante un contador Beckman (Gamma 5500).

La unión inespecífica se define como la cantidad de [¹²⁵I]-insulina unida en presencia de un gran exceso de insulina fría (50 μ g/0.5ml William's/pocillo). La diferencia entre la unión total y la inespecífica corresponde a la unión específica.

9.2. UNION DE [¹²⁵I]-LDL.

Las monocapas de hepatocitos son incubadas con una concentración constante de [¹²⁵I]-LDL (240ng/pocillo, A.E. = 0.20 μ C/ μ g) en presencia de albúmina al 1% y en presencia o ausencia de un gran exceso de LDL^{*} fría (150 μ g/0.5ml William's/pocillo); según se trate de determinar la unión inespecífica o la unión total, respectivamente. La incubación tiene lugar

* Cédida por el Dr. Gómez-Gerique y E. Blázquez (Unidad de Lípidos, Fundación Jimenez Díaz, Madrid).

a 37°C y durante diferentes tiempos (60, 120 y 240min), retirándose el medio en el momento en el que se desea detener la incubación. Seguidamente se lavan los pocillos 5 veces con William's con albúmina (1%) y una 6ª vez con el medio sin albúmina. Así se separa la LDL unida de la libre y se procede a determinar la radiactividad asociada a las células mediante un contador Beckman (Gamma 5500).

Con el fin de analizar el efecto de la lipoproteína de alta densidad (HDL) sobre la unión de LDL a los Pc en cultivo, las células se preincuban con o sin HDL' (130, 260 y 520µg/- pocillo) durante 45min a 37°C. La preincubación se detiene eliminando el medio del pocillo. Seguidamente se lavan los pocillos con medio nuevo y se procede a realizar el ensayo de unión de [¹²⁵I]-LDL.

9.3. INTERNACION DE [¹²⁵I]-INSULINA Y DE [¹²⁵I]-LDL.

La internación de la hormona o de la lipoproteína se determina por el método de acidificación de *Olefsky y Kao (1982)*, que extrae la radiactividad unida a la superficie celular mediante una modificación del método de *Haigler et al. (1980)*. Tras finalizar los ensayos de unión con insulina o lipoproteína, las células son nuevamente incubadas durante 6min a 0°-4°C con tampón acetato sódico barbital (pH 3.0) que contiene acetato sódico 28mM, barbital sódico 20mM y NaCl 117mM. De este modo la radiactividad extraíble con ácido, se debe a la insulina o LDL unida a la superficie y la no extraíble corresponde al ligando internado. La suma de radiactividad internada y radiactividad superficial, equivale a la unión total. Si el ensayo se realiza en presencia de un gran exceso de insulina fría (50µg/0.5ml William's/ pocillo) o de LDL fría (150µg/0.5ml William's/pocillo), dicha suma corresponde a la unión inespecífica.

10. VALORACION DE ACTIVIDADES ENZIMATICAS.

Para la valoración de LDH, GK, FA y GOT, se utilizan Kits de Boehringer/Mannheim, optimizados para muestras de volumen comprendido entre 25 y 75µl. La actividad extracelular de enzima se determina a partir de alícuotas tomadas a distintos tiempos, de los sobrenadantes de cultivos control y tratados con LPS. La actividad intracelular se determina en el homogeneizado de la monocapa en PBS, después de haberlo sonicado 5min (baño Ultrasons) y filtrado a través de gasa doble. La preparación de las muestras en el caso de la actividad de la SOD se detalla en el *apdo. 10.5*.

10.1. LACTATO DESHIDROGENASA (LDH):

Se basa en la reacción:



La actividad de LDH es proporcional a la variación de absorbancia por minuto:

$$\text{LDH (U/l)} = 9118 \times (A_{365}/\text{min})$$

La valoración de LDH ha de realizarse inmediatamente después del tratamiento de la muestra, ya que es una enzima inestable a temperaturas menores de 0°C (*Hatley & Franks, 1986*).

10.2. GLUCOQUINASA (GK):

Ensayo basado en la reacción acoplada:

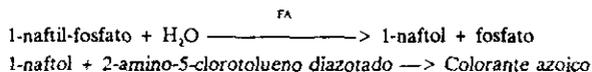


La actividad de GK es proporcional a la variación de absorbancia por minuto:

$$\text{GK (nmoles/min)} = (A_{336}/\text{min}) / 6.22 \times 10^3$$

10.3. FOSFATASA ACIDA (FA):

Ensayo basado en la reacción acoplada:

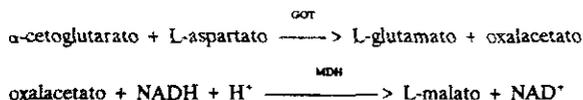


La actividad de la fosfatasa ácida se calcula a partir de la siguiente expresión:

$$\text{FA (U/l)} = 149 \times (A_{485}/\text{min})$$

10.4. GLUTAMATO-OXALACETATO TRANSAMINASA (GOT):

Su determinación se basa en la reacción acoplada:



La actividad de GOT se calcula mediante la fórmula:

$$\text{GOT (U/l)} = 2059 \times \left(\frac{A_{340}/\text{min}}{A_{340}/\text{min}} \right)$$

10.5. SUPEROXIDO-DISMUTASA (SOD).

Esta valoración se ha realizado tanto en el modelo experimental *in vivo* como *in vitro*.

- *Preparación de las muestras:*

Para la determinación de la actividad de la SOD en los ensayos con la endotoxina *in vivo* se parte de 3g de hígado (extraído de ratas en las distintas fases del *shock*) que ha sido previamente perfundido con NaCl (0.9%) para eliminar los glóbulos rojos y así evitar la contaminación de hemoglobina. El tejido se trocea y se le añade tampón fosfato potásico 50mM pH 7.4 (0.3g hígado/ml tampón), utilizándose para la homogeneización un *Brinkmann Polytron* (30seg, posición 4). El homogeneizado resultante se centrifuga a 100000g durante 1h (4°C) en ultracentrífuga Beckman (L5-65B) (rotor R40). El sobrenadante es la llamada *fracción soluble* que, tras ser alícuotada, se congela (-20°C) hasta su posterior análisis.

Para la determinación de la actividad de la SOD en los ensayos con la endotoxina *in vitro* se utilizan hepatocitos cultivados en botellines y preincubados con LPS (0, 50, 100, 200 y 500µg/ml) durante distintos tiempos (2, 4 y 6h) a 37°C. Después de eliminar el medio de los botellines, se lava la monocapa con PBS y se congela (-20°C) hasta su análisis. La descongelación posterior, facilita la lisis de las células, que se resuspenden en tampón fosfato potásico 50mM pH 7.4 (1.5ml/botellín). Tras homogeneizar (Dounce cónico 30seg), la muestra se sonica en baño Ultrasons durante 30seg y después se repite la homogeneización. En este momento la preparación se microfuga y el sobrenadante es congelado (-20°C) hasta el momento de realizar la valoración de SOD.

- *Ensayo de la actividad enzimática:*

El ensayo enzimático está basado en el método de *Misra y Fridovich (1972)*, y determina la actividad de la SOD considerando la velocidad a la que la muestra inhibe la autooxidación de la epinefrina a adrenocromo. Dicha autooxidación, a pH 10.2, procede totalmente de una ruta dependiente de radicales libres de oxígeno y está comprobado que esa ruta es completamente inhibida por la SOD.

Teniendo esto en cuenta, y el hecho de que el adrenocromo absorbe a 480nm; el ensayo se realiza como sigue:

La mezcla de reacción es tampón carbonato-bicarbonato (pH 10.2), EDTA (Merck, Darmstadt, G.) (100 μ M) y epinefrina (Sigma, St. Louis, MO, U.S.A.) a una concentración a la que la velocidad de formación de adrenocromo sea de 0.025 unidades de A_{480} /min. Dicha velocidad es tomada como autooxidación control.

Una vez determinada la autooxidación control, se añade a una mezcla idéntica la muestra a valorar y se determina la velocidad de formación de adrenocromo (unidades de A_{480} /min).

Esa velocidad equivale a un porcentaje de autooxidación x respecto al 100% estimado como autooxidación control; y (100- x)% es el porcentaje de inhibición ejercido por la muestra sobre la autooxidación de la epinefrina de la mezcla. Puesto que en estas condiciones se define una unidad de actividad de la SOD como "la cantidad de enzima requerida para inhibir el 50% de autooxidación control" (Giri et al., 1988); se obtiene, a partir del (100- x)% de inhibición, las U.A.(SOD) (unidades de actividad enzimática) presentes en la muestra. Posteriormente se refieren a la correspondiente concentración de proteínas determinada por el método de Lowry et al. (1951).

Todas las medidas se realizan en un espectrofotómetro DU70 (Beckman Inst., Fullerton, CA, U.S.A.), en cubetas de 1cm de paso óptico y a temperatura ambiente.

11. CAPACIDAD OXIDATIVA INTRACELULAR.

Se ha llevado a cabo en suspensiones de células no parenquimatosas hepáticas (10^6 NPc/ml KRH) utilizando la técnica de citometría de flujo ya mencionada anteriormente (Materiales y Métodos, apdo. 6.2.). La sonda con que se incuban las células (30min/37°C) es un éster de la diclorofluoresceína, el DCFH/DA (200 μ M; stock=10mM en dimetilformamida), que tras ser hidrolizado por las esterasas citoplasmáticas celulares y como consecuencia de la oxidación producida por los radicales superóxido, se hace fluorescente. De este modo, un aumento en la intensidad de fluorescencia emitida por las células está directamente relacionada con un incremento en los niveles de radicales libres de oxígeno presentes en el citoplasma celular.

El tratamiento con LPS (10 μ g/ml) se lleva a cabo tras la incubación con el DCFH/DA y se realizan las medidas a lo largo del tiempo. La medida de la fluorescencia se lleva a cabo utilizando $\lambda_{exc} = 488\text{nm}$ y $\lambda_{em} = 530\text{nm}$.

12. VALORACION DE LOS NIVELES DE MALONIL-DIALDEHIDO.

Este ensayo permite una estimación indirecta de la peroxidación lipídica, ya que el malonil-dialdehído (MDA) es un producto tricarbonado resultante de la degradación de los

peróxidos lipídicos (Chow & Tappel, 1972). Su valoración se ha llevado a cabo para analizar el efecto del LPS sobre las células hepáticas tanto *in vivo* como *in vitro*.

• *Preparación de las muestras:*

Para las determinaciones correspondientes a los ensayos con la endotoxina *in vivo*, al igual que en el caso de valoración de la actividad de la SOD, se parte de hígado (3g) que ha sido perfundido con solución salina fisiológica (NaCl 0.9%). El tejido se trocea y se le añade tampón fosfato potásico 0.1M pH 7.4 (0.5g tejido/ml tampón), en presencia de α -tocoferol (Sigma, St. Louis, MO, U.S.A.) al 0.8% (p/v) (stock=100% (p/v) en etanol). La homogeneización se lleva a cabo mediante Polytron (PCV, Kinematica GmbH, Suiza) durante 30seg. El homogeneizado se diluye 1/2 con tampón y tras agitar se congela (-20°C) una alícuota (1ml) para la posterior valoración de proteínas. A continuación, 7ml del homogeneizado diluido, se mezclan con 1ml de ácido tricloroacético (TCA) (Merck, Darmstadt, G.) al 40% (p/v), y se procede a centrifugar durante 10min a 27000g (0°-4°C) (Sorvall mod. RC2-B, rotor SS-34). El sobrenadante se recoge cuidadosamente con una pipeta pasteur y se mezcla con ácido tiobarbitúrico (TBA) (Sigma, St. Louis, MO, U.S.A.) en la siguiente proporción: 2ml sobrenadante + 0.5ml TBA (2%) (p/v). Tras agitar, los tubos son incubados durante 20min a 95°C, convenientemente tapados para evitar su evaporación.

Para las determinaciones correspondientes a los ensayos realizados con la endotoxina *in vitro*, se utilizan hepatocitos cultivados en botellines y preincubados en presencia o ausencia de LPS (100, 200, 500 μ g/ml William's) durante distintos tiempos (2, 4 y 6 horas) a 37°C. Una vez finalizado el tratamiento, se elimina el medio de los botellines, se lavan cuidadosamente las monocapas con PBS, y tras retirar todo el tampón de lavado se gasean con N₂ durante 1min y se congelan los botellines (-20°C) hasta su procesamiento. La congelación y posterior descongelación de las células, favorece su lisis por lo que resulta sencillo despegarlas del sustrato, resuspendiéndolas en 1ml de PBS. Tras añadir α -tocoferol al 2% (p/v) (stock=100% (p/v) en etanol), la suspensión se homogeneiza con homogeneizador cónico durante 60seg en cada caso. A continuación se sonica durante 1min para completar la lisis total de las células, y se congela (-20°C) una alícuota, que se reserva para la valoración de proteínas. El resto del homogeneizado se mezcla con TBA y TCA, en las siguientes proporciones: 0.7ml muestra + 0.7ml R siendo R el reactivo constituido por TCA (20%)/TBA (1.6%) en la relación 1/1, v/v.

Después de agitar, se lleva a cabo la incubación a 95°C durante 20min, con los tubos convenientemente tapados.

• *Ensayo colorimétrico:*

Al igual que la preparación de las muestras, el ensayo colorimétrico está basado en el método de Wong *et al.* (1984), con algunas modificaciones que se describen a continuación:

La recta patrón se realiza con malonil-dialdehído terc-butílico (MDA_{tb}) (Fluka, G.), en concentraciones que van desde 0.1 hasta 1 μ g/ml, a las que se le añade un volumen igual de reactivo R {x vol. TCA (20%) + x vol. TBA (1.6%)} de modo que el porcentaje final de TCA

y TBA es igual tanto para las muestras *in vivo*, como *in vitro*, como para la recta patrón ($[TCA]_{total} = 5\%$, $[TBA]_{total} = 0.4\%$; (p/v)).

Después de agitar, se lleva a cabo la incubación a 95°C durante 20min. Las muestras se centrifugan después en una microfuga (Beckman) durante 5min, y el sobrenadante es utilizado para la lectura de A_{520} que se realiza en un espectrofotómetro DU70 (Beckman Inst., Fullerton, CA, U.S.A.). Los resultados obtenidos al interpolar los valores de A_{520} en la recta patrón, hacen referencia a valores de nmoles MDA/ml, por lo que han de dividirse por la correspondiente concentración de proteínas. En el caso de las muestras *in vivo* dicha concentración ha de ser corregida por el factor $7/8 \times 2/2.5$ (0.7), ya que éstas son las diluciones que sufre la muestra desde que se recoge la alícuota de proteínas hasta que se determina A_{520} .

13. DETERMINACION DE LOS NIVELES DE CITOCROMO b_5 Y P450.

La determinación espectrofotométrica de los niveles de citocromo en hígado, requiere el aislamiento previo de la fracción microsomal. El procedimiento a seguir está basado en el método de *Keily et al* (1984) con ligeras modificaciones (Fig. 15). Cuando se utilizan hepatocitos en cultivo, la medida se lleva a cabo directamente en el homogeneizado de la monocapa. Para ello, las monocapas de hepatocitos se lavan cuidadosamente con tampón fosfato potásico 0.1M pH 7, se congelan a -20°C y, antes de determinar la concentración de citocromo (P450 ó b_5), se someten al siguiente tratamiento:

- 1º) Descongelar.
- 2º) Homogeneizar en 1ml de tampón fosfato potásico 0.1M pH 7.
- 3º) Sonicar 5min.
- 4º) Filtrar por gasa doble.
- 5º) Diluir 1/4 en el tampón anterior.

13.1. CITOCROMO b_5 .

El contenido microsomal de citocromo b_5 se valora en función del espectro de diferencia del citocromo b_5 reducido frente al oxidado, empleando el coeficiente de extinción molar $\epsilon \epsilon_{469,426} = 185 \text{ cm}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ calculado por *Omura y Sato* en 1964.

La muestra se coloca en ambas cubetas con una concentración aproximada de 0.6mg de proteína/ml de tampón. Una vez registrada la línea base se añade a la cubeta de muestra 1mg de ditionito sódico y se procede entonces a realizar el espectro.

13.2. CITOCROMO P450.

El contenido microsomal de citocromo P450 se valora también en función de un espectro de diferencia: el del citocromo P450 reducido-CO, frente al citocromo P450 reducido, usando como coeficiente de extinción molar el descrito por *Omura y Sato (1964)* $\epsilon_{430-450} = 91 \text{ cm}^2 \text{ mM}^{-1}$.

La forma oxidada del citocromo no se combina con el monóxido de carbono, mientras que la forma reducida presenta una afinidad muy alta. Su unión al CO es lo suficientemente rápida para permitir utilizar la detección del complejo monoxidocarbonado como medida de la reducción del citocromo presente en la muestra.

El procedimiento práctico es análogo al usado para la determinación de citocromo b, con las salvedades siguientes:

- Se añade 50mg de ditionito sódico a ambas cubetas (de muestra y de referencia).
- Se burbujea con CO durante 1min la cubeta de muestra.
- Es necesario gasear con N_2 ambas cubetas y taparlas inmediatamente con una pieza de teflón para obtener una atmósfera anaerobia dada la facilidad de autooxidación del citocromo P450.

Todos los espectros de diferencia se han realizado en un espectrofotómetro Cary mod. 118 con cubetas de 1cm de paso óptico y a temperatura ambiente. El citocromo calculado se refiere a los miligramos de proteína presentes en la muestra.

14. DETERMINACION DE LA CONCENTRACION DE CALCIO CITOSOLICO.

14.1. ESPECTROFLUORIMETRIA.

La determinación de la concentración de Ca^{++} intracelular se lleva a cabo utilizando la sonda FURA-2 cuya emisión fluorescente depende directamente de la concentración de este catión en el medio en el que se encuentra la sonda (*Tsien, 1980*).

Para la incorporación del FURA-2 en el interior celular, los hepatocitos (3×10^6 Pc/ml en suspensión o monocapas cultivadas sobre cubreobjetos Belloco 13x54mm) son preincubados con el acetoximetiléster FURA-2/AM que penetra con facilidad en la célula, donde posteriormente es hidrolizado liberando la sonda fluorescente sensible a la $[Ca^{++}]$.

La preincubación con FURA-2/AM (Molecular Probes, Eugene, OR, U.S.A.) (stock = 1mM en DMSO, $[FURA-2/AM]_{total} = 5 \mu M$) se realiza durante 30min a 37°C en tampón Krebs-Ringer modificado que contiene: Hepes 10mM (pH 7.4), NaCl 140mM, KCl 5mM, CaCl₂ 1.8mM, MgCl₂ 1mM y glucosa (Merck, Darmstad, G.) 10mM, y en presencia de suero fetal al 1%. En los ensayos realizados con hepatocitos en cultivo, las monocapas son entonces lavadas con tampón para realizar a continuación el tratamiento en presencia o ausencia de LPS (100 y 200µg/ml), durante 30min a 37°C. Sin embargo, cuando se utilizan células en

suspensión, la incorporación de la sonda se detiene por dilución 1/10 con tampón sin suero, sedimentación a 165g/20seg, lavado con tampón sin suero 5min/37°C, sedimentación una vez más y por último resuspensión en tampón sin suero (10^6 Pc/ml). A continuación se procede al tratamiento con o sin LPS como en el caso de los hepatocitos en cultivo, salvo que de nuevo para detener la incubación es preciso sedimentar y resuspender (1.5×10^6 Pc/ml), mientras que en los cultivos basta con retirar el medio y lavar cuidadosamente.

En algunos experimentos, para investigar si la endotoxina afecta a la movilización de calcio intracelular, la incorporación de calcio extracelular se elimina utilizando tampón que no contiene Ca^{++} y suplementado con EGTA 0.2mM.

Finalmente se llevan a cabo las medidas de la emisión fluorescente (F) utilizando como $\lambda_{exc} = 340nm$ y $\lambda_{em} = 510nm$. La concentración de Ca^{++} intracelular se obtiene a partir de la expresión:

$$[Ca^{++}]_i = K_d \cdot (F - F_{min}) / (F_{max} - F)$$

en la que $K_d = 225mM$ en el entorno citosólico (Margaroli *et al.*, 1987) y F_{max} y F_{min} son los valores de F obtenidos en el calibrado de la emisión fluorescente, que se lleva a cabo como se detalla a continuación:

- Con los hepatocitos en suspensión F_{min} se obtiene lisando las células con Triton X-100 (Serva, Heidelberg, G.) al 0.1% para saturar así el fura-2 con el calcio libre del medio. La F_{min} se determina añadiendo 20mM EGTA (Sigma, St. Louis, MI, U.S.A.) (pH 8.3).
- Con los hepatocitos en cultivo se utiliza digitonina (Sigma, St. Louis, MI, U.S.A.) $20\mu M$ para calcular F_{max} y posteriormente se añade $MnCl_2$ 0.5mM (Merck, Darmstadt, G.) para determinar F_{min} .

En todos los casos la fluorescencia intrínseca de las sustancias añadidas, se resta de la F total medida.

La colocación del cubreobjetos en las medidas realizadas con hepatocitos en cultivo se detalla en la *Figura 14*.

14.2. CITOMETRIA DE FLUJO.

El Indo 1-AM (acetoxi-metiléster del Indo 1) penetra fácilmente en las células, donde se libera Indo-1 por la acción de las esterasas intracelulares. Este compuesto fluorescente, al unir calcio sufre un desplazamiento en su espectro de emisión hacia longitudes de onda menores. Así, las variaciones en la concentración de calcio citosólico pueden ser detectadas midiendo simultáneamente la fluorescencia emitida a dos longitudes de onda: $\lambda_{exc1} = 422nm$ y $\lambda_{exc2} = 488nm$; correspondiendo la primera al máximo de emisión para la sonda unida a calcio y la segunda para la sonda libre de calcio.

Utilizando la técnica de citometría de flujo (Facstar Plus, Becton Dickinson, CA, U.S.A.) (*Materiales y Métodos*, apdo. 6.2.), se ha determinado la variación que experimenta la concentración intracelular de este catión en Pc y en NPC en suspensión (10^6 células/ml) tras el tratamiento con LPS. En primer lugar se preincuban las células (45min/37°C) con la sonda ($6\mu\text{M}$; stock = 1mM en dimetilsulfóxido) y después se incuban con LPS (10, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$), para posteriormente determinar simultáneamente la intensidad de fluorescencia que presenta la muestra a las dos longitudes de onda de emisión citadas anteriormente.

15. DETERMINACION DEL pH INTRACELULAR.

Para la medida del pH intracelular se utiliza un derivado de carboxifluoresceína, el 2',7'-bis(carboxietil)-5(6')-carboxifluoresceína (BCECF) sensible a los cambios de pH del entorno.

El penta-acetoximetil-éster de este compuesto (BCECF/AM) no es fluorescente y penetra fácilmente en las células donde es hidrolizado por las esterasas citosólicas, liberándose la forma polianiónica fluorescente BCECF.

El espectro de excitación de este compuesto depende de su estado de ionización, mostrando un desplazamiento de la λ del máximo de excitación. Así pues, las medidas de fluorescencia se realizan a una λ de emisión de 530nm, después de haber excitado la muestra alternativamente a 500nm y 450nm. La emisión fluorescente obtenida a 530nm tras haber excitado a 500nm es altamente sensible al pH, mientras que a 450nm es prácticamente independiente del pH (*punto isobéptico*).

Después de corregir la fluorescencia basal de la muestra, el uso de la relación de las fluorescencias obtenidas para las dos longitudes de onda de excitación ($R = F_{500}/F_{450}$), proporciona medidas de pH intracelular que no se ven afectadas por los cambios de concentración intracelular de sonda debidos a su pérdida o al fotodestrucción.

Los hepatocitos, cultivados sobre cubreobjetos (6x24mm), son incubados en presencia o ausencia de LPS (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ William's) durante diferentes tiempos a 37°C. Tras lavar cuidadosamente las células con tampón Krebs-Ringer modificado* (Hepes 10mM (pH 7.4), NaCl 140mM, KCl 5mM, CaCl₂ 1.8mM y MgCl₂ 1mM), se colocan en la cubeta del espectrofluorímetro (Perkin-Elmer MPF-44E termostatzado con un equipo Lauda). Esta ha de estar previamente preparada con dicho tampón (3ml) a 37°C, y una base que encaja en la cubeta y posee una ranura en la que se introduce el microcubre.

En este momento se mide la fluorescencia basal de los Pc y seguidamente se incuban (en la propia cubeta) con BCECF (Calbiochem, La Jolla, CA, U.S.A.) 10 μM (stock = 1mM en DMSO) durante 5min a 37°C. A continuación (tras eliminar la sonda no incorporada), se excita la muestra alternativamente a $\lambda_{exc} = 500\text{nm}$ y $\lambda_{exc} = 450\text{nm}$, midiendo la fluorescencia (F) emitida a $\lambda_{em} = 530\text{nm}$. Después de corregir estos valores con la F basal, se calcula la relación $R = F_{500}/F_{450}$.

Todas las medidas de F se llevan a cabo perfundiendo continuamente la cubeta con el tampón de ensayo, para evitar la posible interferencia de sonda liberada al medio tras haber sido incorporada (Gleson *et al.*, 1989).

Con el fin de convertir los cocientes obtenidos de F_{300}/F_{450} en valores concretos de pH intracelular (pH_i), se realiza una recta de calibrado tanto en las células control como en las tratadas con LPS. Para ello se perfunde la cubeta con soluciones (KRB modificado*) tamponadas a distintos pHs (6.5, 6.8, 7.1 y 7.4) y que contienen nigericina (Sigma, St. Louis, MI, U.S.A.) 12.5 μM, la cual actúa como ionóforo igualando el pH_i con el pH del tampón en cuestión. En estos tampones de calibrado, se sustituye el NaCl por KCl 120mM.

Procediendo de modo análogo a lo explicado anteriormente, se evalúa el cociente R determinado por cada uno de los tampones de calibrado, y con la recta obtenida se calculan por interpolación los valores de pH_i correspondientes a los F_{300}/F_{450} medidos con anterioridad al calibrado.

16. VALORACION DE PROTEINAS.

Según el método descrito por Lowry (1951).

17. ANALISIS ESTADISTICO.

Los datos experimentales son media de un mínimo de tres experimentos $\pm \sigma$.

III. RESULTADOS.

I. MODELOS EXPERIMENTALES.

Para llevar a cabo el estudio de la acción endotóxica sobre el hígado, se han utilizado como modelos experimentales:

- La inducción *in vivo* del estado de *shock* endotóxico reversible en rata.
- El tratamiento *in vitro* de distintos tipos celulares hepáticos, en suspensión y en cultivo primario, con la endotoxina.

1.1. CARACTERIZACION DEL MODELO DE SHOCK ENDOTOXICO REVERSIBLE.

El estado de *shock endotóxico* se ha inducido en ratas Wistar, mediante la administración i.v. de 1.6mg de LPS de *E.coli* 0111:B4/100g de peso, dosis inferior a la letal (2.5mg/100g de peso) (Conde, 1982). Esto permite la reversibilidad del *shock* y produce un estado agudo de endotoxicosis entre las 4 y las 6 horas del tratamiento, dependiendo de la sensibilidad que presenten los animales a la endotoxina. La *fase aguda* del *shock* se caracteriza por irsutismo, sed, aumento de la temperatura corporal y rechazo total del alimento, síntomas que desaparecen cuando el animal entra en *fase de recuperación* hacia las 24 horas.

En estudios previos (García et al., 1990b) se ha comprobado que existen alteraciones histológicas del hígado durante la *fase aguda* del *shock*, alteraciones que remiten en la *fase de recuperación*. El daño hepático observado durante el proceso coincide con cambios en algunos parámetros séricos que permiten caracterizar las fases del *shock* y su evolución.

Se ha comprobado que la concentración de **glucosa** sanguínea, tras una hiperglucemia transitoria, disminuye más de un 50% respecto a sus valores normales; la **glutamato-oxalacetato transaminasa** (GOT) aumenta sus niveles plasmáticos incluso en un 300% en la *fase aguda*, incremento característico de alteraciones patológicas del parénquima hepático, normalizándose los niveles de esta enzima en la *fase de recuperación*; y la **albúmina** ve disminuida progresivamente su concentración sérica. Tanto los niveles de glucosa como los de albúmina se mantienen por debajo de los normales aun en la *fase de recuperación* (24-72h) (Fig. 16).

La medida de estos parámetros séricos se ha utilizado de forma rutinaria en los experimentos *in vivo* para conocer el grado de intoxicación del animal, así como para seguir la evolución del *shock* y asegurar la correcta toma de muestras para el posterior análisis de distintos parámetros bioquímicos en tejido.

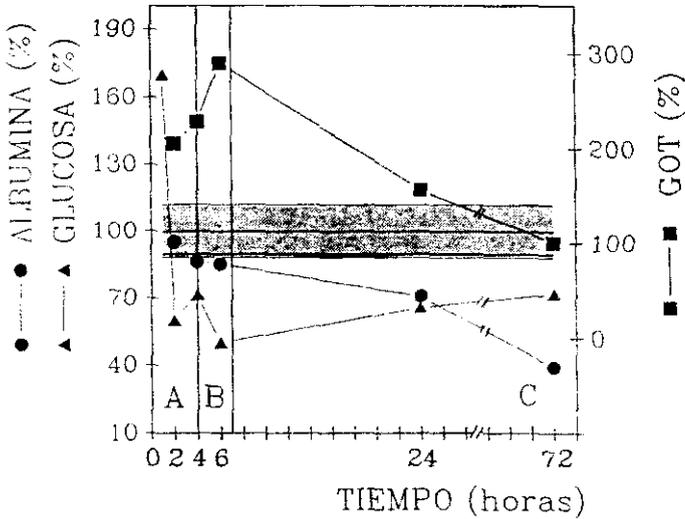


Figura 16: Parámetros característicos de la evolución del shock endotóxico reversible. A=Fase de inducción; B=Fase aguda; C=Fase de recuperación.

1.2. CARACTERIZACION DE MODELOS *IN VITRO* CON DISTINTOS TIPOS CELULARES HEPATICOS.

Con el fin de analizar el posible efecto directo del lipopolisacárido a nivel celular evitando la influencia de sucesos extrahepáticos, presentes en los experimentos *in vivo*, se han utilizado células parenquimatosas y no parenquimatosas hepáticas, tanto en suspensión como en cultivo primario.

Ambos modelos permiten estudiar el efecto del LPS sobre cada tipo celular hepático, ofreciendo la posibilidad de discernir entre las acciones directas del LPS y las indirectas debidas a alteraciones hormonales, nerviosas, del sistema de coagulación y complemento y a la existencia de mediadores de inflamación cuya intervención en la propagación del shock endotóxico es indudable (Kuttner, 1983; Bond, 1984).

Los ensayos con células aisladas sólo pueden llevarse a cabo a tiempos cortos (dos horas máximo), por lo que se ha recurrido preferentemente a la técnica del cultivo primario para estudios relacionados con respuestas a más largo plazo. Por otra parte, en los cultivos primarios la regeneración del glicocáliz celular es completa, asegurando la integridad de la membrana plasmática en ensayos de unión a receptores.

1.2.1. Células parenquimatosas.

Las células parenquimatosas (hepatocitos, Pc), en suspensión y en cultivo, se han utilizado como modelo experimental básico en el estudio de las acciones del LPS a nivel celular.

La caracterización morfológica de los hepatocitos obtenidos se llevó a cabo en estudios previos (Pagani et al., 1988) mediante técnicas de microscopía tanto óptica en contraste de fase y de fluorescencia (inmunofluorescencia antitubulina y antiactina), como electrónica de transmisión y de barrido. Todo ello puso de manifiesto la pureza de las preparaciones de Pc, la conservación de su ultraestructura y la preservación del citoesqueleto celular.

La existencia de una correcta correlación morfológico-funcional en este modelo experimental, se comprobó mediante estudios que evaluaron la incorporación de [¹⁴C]-2-desoxiglucosa así como la biosíntesis de albúmina (parámetro característico de las células parenquimatosas) (Pagani et al., 1988).

1.2.2. Células no parenquimatosas.

Debido a la importancia que pueden tener las células no parenquimatosas (células sinusoidales, Sc, NPc) en la propagación del *stock* se ha procedido a la puesta a punto del aislamiento, purificación y cultivo de estas poblaciones celulares hepáticas.

Las células sinusoidales son minoritarias en el hígado ($\approx 35\%$ en número y sólo un 6% en volumen) (Blouin, 1977) y están constituidas por 4 tipos celulares: macrófagos o células de Kupffer (Kc), células endoteliales (Ec), células acumuladoras de grasa (FSc o células Ito) y células *pit* (Wisse, 1977). Por ello, su aislamiento y purificación requiere técnicas complejas que sólo se han desarrollado recientemente (Knook & Sleyster, 1976).

Entre los distintos procedimientos existentes, se seleccionaron y utilizaron los que se detallan en la Tabla 7, con el fin de aislar y purificar células no parenquimatosas cuyo cultivo permitiese el enriquecimiento de la preparación en células de Kupffer.

Como consecuencia de los resultados obtenidos, se han utilizado conjuntamente las enzimas colagenasa y pronasa para el aislamiento de las células no parenquimatosas (Materiales y Métodos, apdo. 3.2.2.).

Las condiciones óptimas de cultivo son las indicadas en Materiales y Métodos (apdo. 3.2.2.c).

La caracterización morfológica y funcional de los cultivos obtenidos se ha llevado a cabo simultáneamente mediante las pruebas de tinción para peroxidasas, analizadas mediante microscopía óptica y electrónica (Resultados, apdos. 3.1.1., 3.1.2.).

Tabla 7: Rendimiento de los distintos métodos ensayados para el aislamiento y purificación de células no parenquimatosas cuyo cultivo permite un enriquecimiento de la población de macrófagos de Kupffer.

| AISLAMIENTO | PURIFICACION | NPc/hígado | % (Kc/Ec) | Obs. | Referencias |
|---|--|--|-----------|--------|---|
| ▶ Colagenasa (0.035%) Φ = 26ml/min | Gradiente percoll + Adherencia diferencial | 5x10 ⁶ ± 2x10 ⁶ | 30/48 | 25% Pc | <i>Seljelid y Smedsrød</i> 1980 <i>Smedsrød y Perotti</i> 1985 |
| ▶ Colagenasa (0.050%) Φ = 10ml/min + Incubación (30min/37°C/240rpm) colagenasa (0.050%) | Gradiente percoll + Adherencia diferencial | 10x10 ⁶ ± 2x10 ⁶ | 30/48 | 10% Pc | <i>Smedsrød et al.</i> 1985 <i>Steffan et al.</i> 1986 |
| ▶ Colagenasa (0.050%) Φ = 10ml/min + Incubación (30min/37°C/240rpm) colagenasa (0.050%) | Gradiente nycodenz + Adherencia diferencial (pretratamiento sustrato)* | 17x10 ⁶ ± 2x10 ⁶ | 30/30 | 10% Pc | <i>Knook et al.</i> 1977 <i>Steffan et al.</i> 1986 |
| ▶ Colagenasa (0.04%) + pronasa (0.04%) Φ = 20ml/min + Incubación (30min/37°C/100rpm) colagenasa + pronasa (0.025%) (0.025%) | Gradiente nycodenz + Adherencia diferencial | 100x10 ⁶ ± 20x10 ⁶ | 80/15 | 0% Pc | <i>Van Bossuyt et al.</i> 1988 |
| * 1) BSA 2.5% (p/v) | 30min/37°C | | | | <i>Laakso y Smedsrød</i> 1987 |
| Glutaraldehído 2.5% (v/v) | 90min/37°C | | | | |

2. ACCION DEL LPS IN VIVO.

El modelo de *shock endotóxico reversible* inducido en ratas, proporciona una aproximación importante en el conocimiento de las alteraciones fisiopatológicas de los estados de *shock*, permitiendo el estudio de los mecanismos de detoxificación puestos en marcha en las primeras etapas del *shock*.

Los procesos de fagocitosis realizados por el Sistema Retículo Endotelial (RES) como respuesta del organismo frente a las endotoxinas bacterianas, desencadenan una serie de acciones que implican la producción de radicales libres de oxígeno y la síntesis y liberación de mediadores activos que pueden contribuir a la propagación del *shock* (*Birmelin & Decker, 1983*).

Actualmente se relaciona la inducción del *shock* endotóxico con la producción de radicales libres y la afectación de los sistemas de membrana. Por ello se ha investigado en el modelo *in vivo* (Resultados, apdo. 2) la actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD), la peroxidación lipídica y los niveles de citocromo b, por su contribución en los procesos de detoxificación hepática y de remodelación de membranas.

2.1. SUPEROXIDO DISMUTASA (SOD).

La actividad de la enzima superóxido-dismutasa (SOD) ha sido determinada en la fracción soluble de hígados procedentes de ratas control o intoxicadas, a distintos tiempos tras la administración de endotoxina.

Los resultados obtenidos muestran que, en la fase aguda del *shock*, dicha actividad se reduce a la mitad y la recuperación del animal implica, no sólo la vuelta de este parámetro a los valores control, sino un aumento considerable de la actividad de SOD (Tabla 8).

Tabla 8: Variación de la actividad de SOD en fracción soluble hepática, durante el *shock* endotóxico reversible inducido por LPS.

| FASE DEL SHOCK | TRATAMIENTO | SOD (%) |
|----------------------|-------------|---------|
| Fase aguda | CONTROL 5h | 100 ± 7 |
| | LPS 5h | 52 ± 8 |
| Fase de recuperación | CONTROL 24h | 100 ± 6 |
| | LPS 24h | 138 ± 9 |

2.2. PEROXIDACION LIPIDICA.

El análisis de la peroxidación lipídica se ha realizado mediante la determinación de los niveles de malonil-dialdehído (MDA), producto tricarbonado resultante de la degradación de peróxidos lipídicos (Chow & Tappel, 1972). Los resultados obtenidos se reflejan en la Figura 17, indicando un incremento en la peroxidación lipídica de un 28% durante la fase aguda del *shock* (5h) y una disminución de un 38% en la fase de recuperación (24-72h).

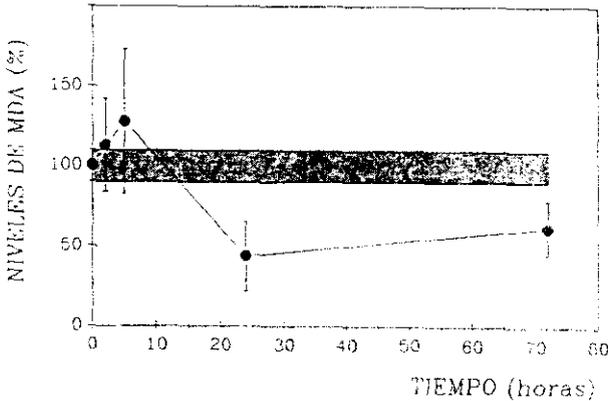


Figura 17: Variación de los niveles de MDA en homogeneizado de hígado, durante el shock endotóxico reversible inducido por LPS. ■ Controles (●) Tratados con LPS

2.3. NIVELES DE CITOCROMO b₅

El citocromo b₅ está implicado en las reacciones de hidroxilación microsomal NADH-dependientes y se interrelaciona además con el sistema de oxidasas de función mixta (citocromo P450).

Teniendo en cuenta la alteración observada en los niveles de citocromo P450 tras el tratamiento con LPS (Pagani et al., 1987) y la posible afectación de sistemas de membrana durante el shock, se ha llevado a cabo la valoración de los niveles de citocromo b₅ en la fracción microsomal hepática de ratas tras la inducción del estado de shock reversible. Dicha valoración se ha realizado durante las distintas fases del proceso.

Los resultados de estos estudios (Fig. 18) ponen de manifiesto un significativo aumento de la concentración de citocromo b₅ en los animales intoxicados respecto a los controles. Esta elevación es máxima en la fase aguda del shock (4-6h), alcanzándose valores superiores a los normales en un 28-35%. Una vez transcurridas 24 horas después de la inyección intravenosa de LPS, los niveles de citocromo b₅ son análogos a los existentes en ratas control.

Los niveles de citocromo P450, implicado en los mecanismos de detoxificación hepáticos, fueron previamente estudiados (Bosch et al., 1988), mostrando una progresiva disminución tras la inyección del LPS. Esta disminución continúa incluso durante la fase de recuperación del shock reversible, fase en la que la mayoría de los parámetros recuperan sus valores normales.

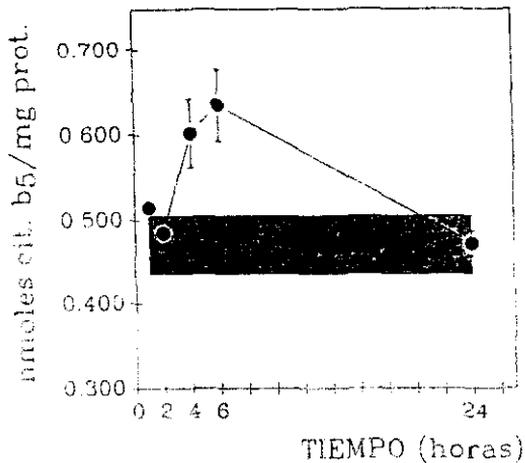


Figura 18: Variación de los niveles de citocromo b₅ en microsomas de hígado, durante el shock endotóxico reversible inducido por LPS. ■ Controles (●) Tratados con LPS

En la Figura 19 se muestra el incremento de la relación de los niveles de citocromo b₅ y citocromo P450, que se observa durante la evolución del shock.

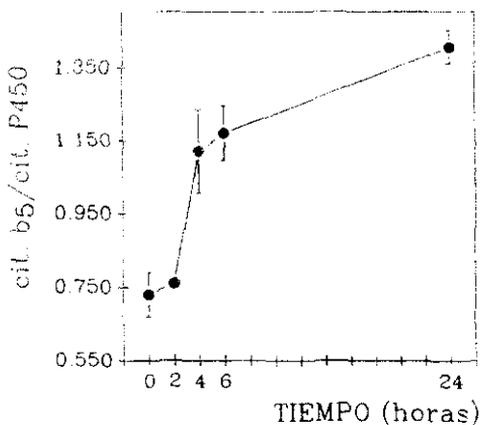


Figura 19: Variación de la relación citocromo b₅/citocromo P450 en la fracción microsomal hepática, durante el shock endotóxico inducido por LPS.

3. ACCION DEL LPS *IN VITRO*.

De acuerdo con los objetivos del presente trabajo, la experimentación *in vitro* se ha centrado en el estudio de la acción del LPS de *E.coli* sobre los distintos tipos celulares del tejido hepático, con el fin de desarrollar un modelo experimental que permita esclarecer los mecanismos de endotoxicidad a nivel celular.

3.1. MORFOLOGIA DE LAS CELULAS NO PARENQUIMATOSAS HEPATICAS.

Estudios previos han puesto de manifiesto alteraciones morfológicas producidas por la endotoxina en hepatocitos en cultivo, destacando fundamentalmente la retracción citoplasmática y el notable aumento de células redondeadas adheridas parcialmente al sustrato (Paganí *et al*, 1988).

Con el fin de realizar un estudio paralelo, se ha analizado el efecto del LPS sobre la morfología de las células no parenquimatosas, mediante técnicas de microscopía óptica y electrónica.

3.1.1. Microscopía óptica.

La actividad de las peroxidasas endógenas, localizadas fundamentalmente en la envoltura nuclear y en retículo endoplásmico, es específica de las células de Kupffer por lo que para su caracterización morfológico-funcional se realiza la tinción citoquímica de peroxidasas que implica la utilización de diaminobenzidina (DAB).

La Figura 20 muestra el resultado positivo de esta tinción en los cultivos celulares obtenidos (48h). Asimismo, se observa un efecto tóxico de la DAB potenciado por el LPS (Fig. 20B y D).

Estos cultivos enriquecidos en células de Kupffer presentan zonas densas y células dispersas (Fig. 21A), que se encuentran muy aplanadas sobre el sustrato, se dividen (Fig. 21B y C) y llegan a confluencia (Fig. 21D). El tratamiento con LPS (10µg/ml) aumenta la retracción citoplasmática y el número de vacuolas (Fig. 21E). Dosis mayores (200µg LPS/ml) provocan vacuolización notable, retracción completa y pérdida de adhesión al sustrato (Fig. 21F).

3.1.2. Microscopía electrónica.

El control ultraestructural de las células recién aisladas se muestra en la Figura 22A y tras 48 horas de cultivo (Fig. 23) se aprecia la recuperación celular tras el aislamiento.

La incubación con LPS (Fig. 22B y C) induce la formación de vacuolas autofágicas que presentan figuras de mielina.

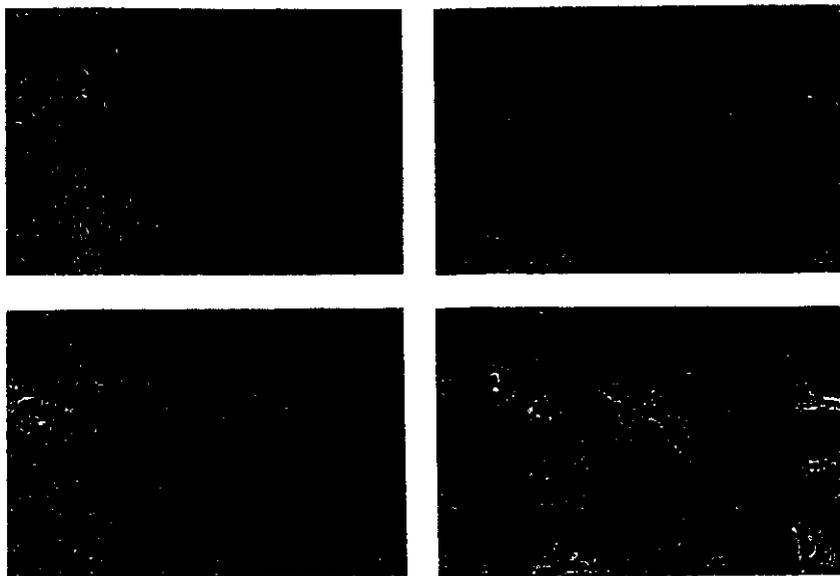


Figura 20: Cultivo de células no parenquimatosas enriquecidas en células de Kupffer, observado por contraste de fases tras la tinción para peroxidasa.

(A) (B) Controles (x210) (x840)

(C) (D) LPS (10µg/ml) (x210) (x840)

RESULTADOS

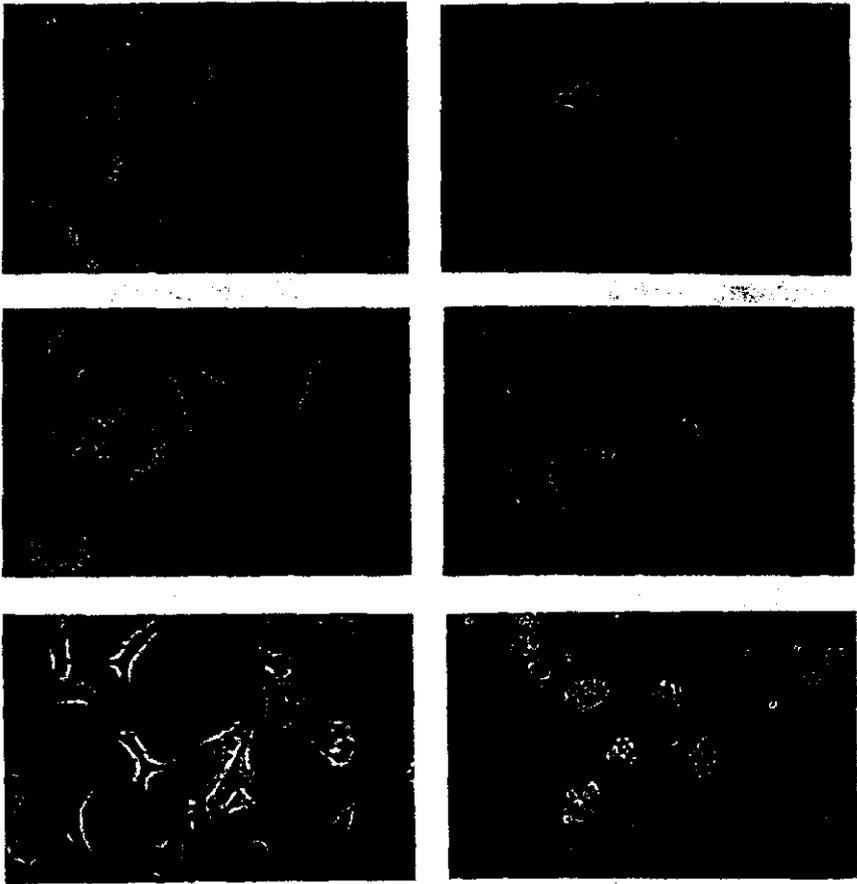


Figura 21: Cultivo de células no parenquimatosas enriquecido en células de Kuppfer, observado por contraste de fases.

(A) (B) (C) (D) Controles (x210) ó (x840)

(E) LPS (10µg/ml) (x840)

(F) LPS (200µg/ml) (x840)

RESULTADOS

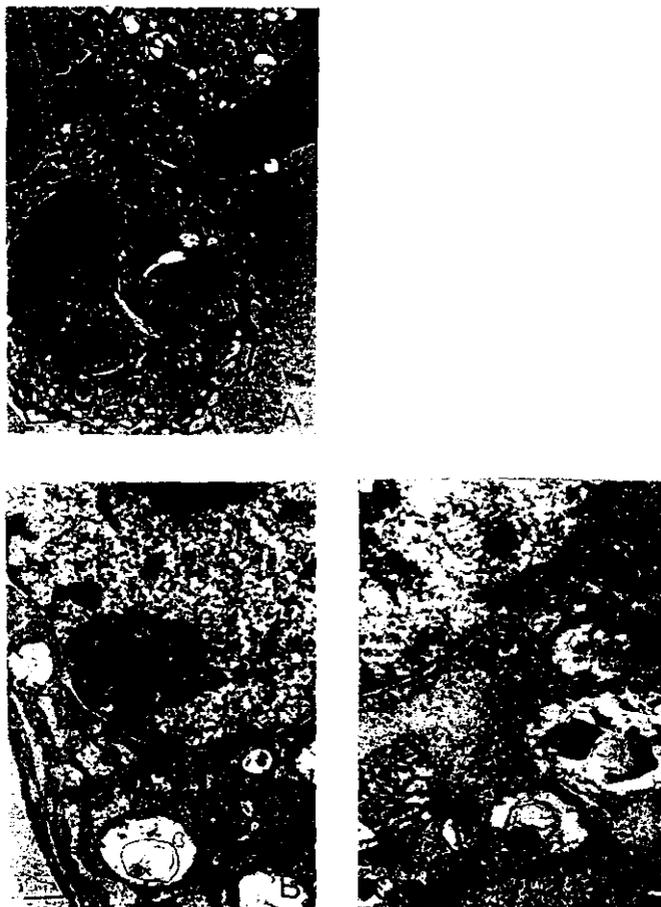


Figura 22: Cultivo de células no parenquimatosas enriquecidas en células de Kupffer, observadas por microscopía electrónica de transmisión.

(A) Células recién sembradas (x11700)

(B) Cultivo (48h) LPS (200µg/ml) (x20300)

(C) Cultivo (48h) LPS (200µg/ml) (x28900)

La barra corresponde a 0.5µm.

RESULTADOS

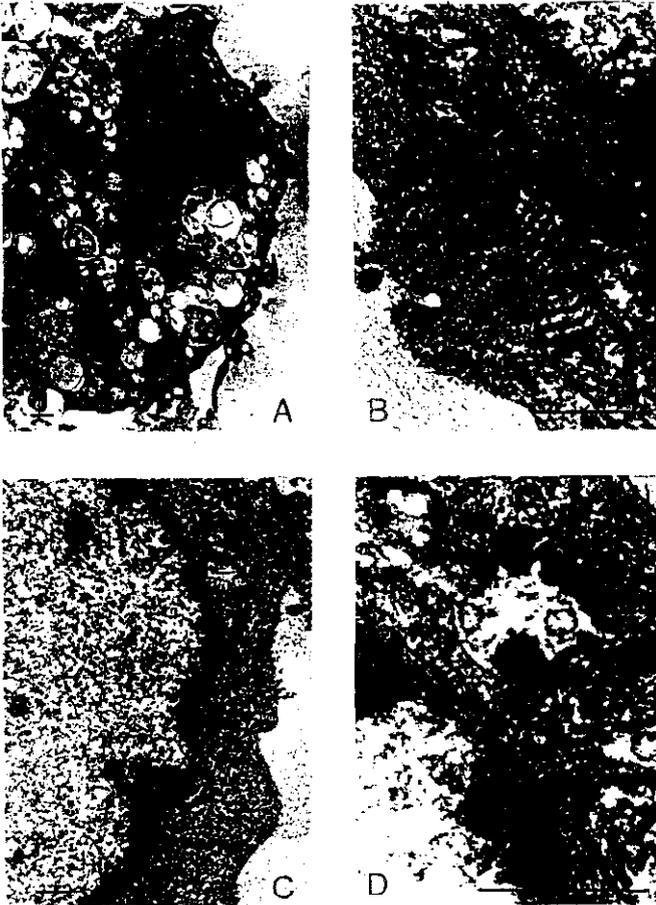


Figura 23: Cultivo de células no parenquimatosas enriquecidas en células de Kupffer, observado por microscopía electrónica de transmisión tras la tinción para peroxidadasas.

CONTROLES

(A) (x1200) (B) Mitochondrias (m) (x54200) (C) Núcleo (x21700)

(D) Detalle de membrana nuclear (x90400)

La barra corresponde a 0.5µm.

RESULTADOS

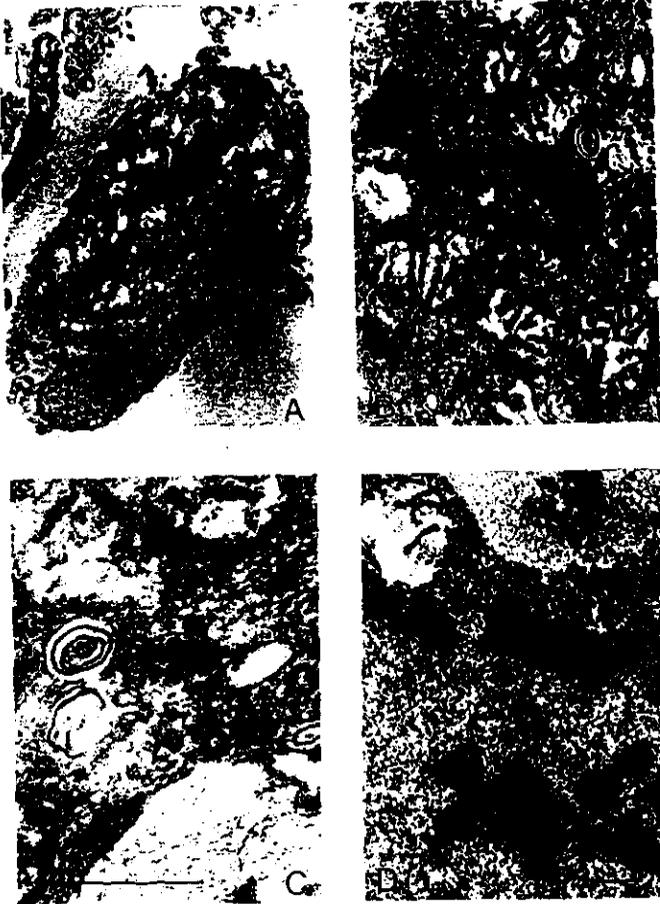


Figura 24: Cultivo de células no parenquimatosas enriquecidas en células de Kupffer, observado por microscopía electrónica de transmisión tras la tinción para peroxidatas.

TRATADOS CON LPS (200µg/ml)

(A) (x12650) (B) Mitocondrias (x36150) (C) Autofagosomas (x90400)

(D) Detalle de membrana nuclear (x36150)

La barra corresponde a 0.5µm.

El tratamiento con diaminobenzidina (DAB) (Figs. 23 y 24) da lugar a una reacción peroxidasa positiva en torno al núcleo en el 80% de las células del cultivo (Kc). La DAB aumenta ligeramente la vacuolización celular (Fig. 23A y D), pero la membrana nuclear permanece intacta (Fig. 23C), así como la mayor parte de las mitocondrias (Fig. 23B).

Tras el tratamiento con LPS, la morfología aparece muy desestructurada (Fig. 24A) con alteración de todas las mitocondrias (Fig. 24B), aparición de numerosas figuras de mielina que corresponden a autofagosomas (Fig. 24C) y gran dilatación de los poros de la membrana nuclear (Fig. 24D).

3.2. LOCALIZACION INTRACELULAR E INCORPORACION DE [¹⁴C]-LPS EN CELULAS NO PARENQUIMATOSAS HEPATICAS.

El estudio de la localización ultraestructural del LPS en células hepáticas se ha realizado mediante la técnica de inmunomarcaje con oro coloidal unido a proteína A. Esta técnica ha puesto de manifiesto, en estudios previos (Municio *et al.*, 1990; Díaz-Laviada *et al.*, 1991), que la endotoxina se une a la membrana plasmática de las células parenquimatosas preferentemente en las microvellosidades, no pudiéndose demostrar no obstante la existencia de sitios específicos de unión. A los 40 y 60min el LPS ha penetrado completamente en la célula, encontrándose mayoritariamente en mitocondrias. El LPS disperso en el citoplasma no parece asociarse a ninguna estructura de membrana como vacuolas o fagosomas. A tiempos largos de incubación la endotoxina puede observarse incluso en el interior del núcleo.

Paralelamente, el estudio llevado a cabo mediante esta misma técnica en células de Kupffer (Figs. 25 y 26) permite localizar el LPS fundamentalmente asociado a vacuolas.

La Figura 25 muestra que a los 15min de tratamiento la endotoxina se encuentra unida a microvellosidades (Fig. 25B) y ya aparece en el interior celular asociada a vacuolas (Fig. 25C y D). Se aprecia también marca en mitocondrias, las cuales están alteradas (Fig. 25E) y en autofagosomas (Fig. 25F). A este tiempo corto de incubación, el LPS raramente alcanza el núcleo.

A los 60min de tratamiento (Fig. 26), todavía se observa LPS unido a microvellosidades (Fig. 26B), sigue existiendo marca en el interior asociada a vacuolas (Figs. 26C y D), y puede llegar al núcleo (Fig. 26E). Además la endotoxina aparece muy frecuentemente unida a restos de membranas mitocondriales en autofagosomas (Figs. 26E y F).

Previamente se realizaron experimentos que demostraron que el LPS de *E.coli* 0111:B4 se une de forma inespecífica a los hepatocitos (Pagani *et al.*, 1985; Pagani *et al.*, 1988), produciendo alteraciones de las características de su membrana plasmática (Portolés *et al.*, 1987).

De modo análogo, se han llevado a cabo en el presente estudio, ensayos de incorporación de [¹⁴C]-LPS a cultivos de células no parenquimatosas enriquecidos en células de Kupffer, mostrándose la existencia de una proporcionalidad directa entre la dosis de endotoxina utilizada y la cantidad de radiactividad incorporada por las células (Tabla 9).

RESULTADOS

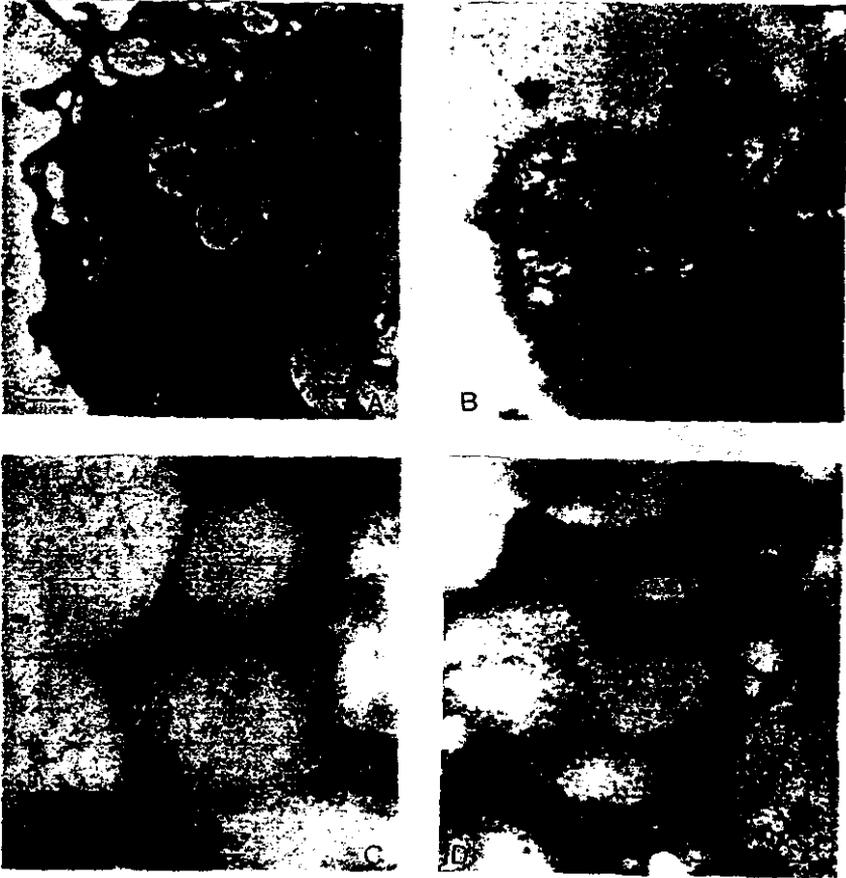


Figura 25: Inmunoconjugado con oro coloidal, de cultivos de células no parenquimatosas y envejecidas en células de Kupffer y tratados con LPS durante 15min a 37°C.
(A) (x13300) (B) (x55380) (C) (x94200) (D) (x55380)
(E) (x55380) (F) (x94200)

RESULTADOS

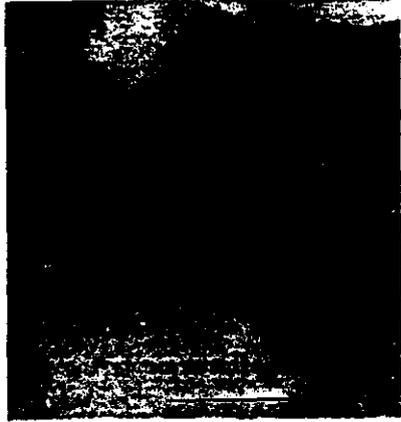


Figura 25: (Continuación)

RESULTADOS

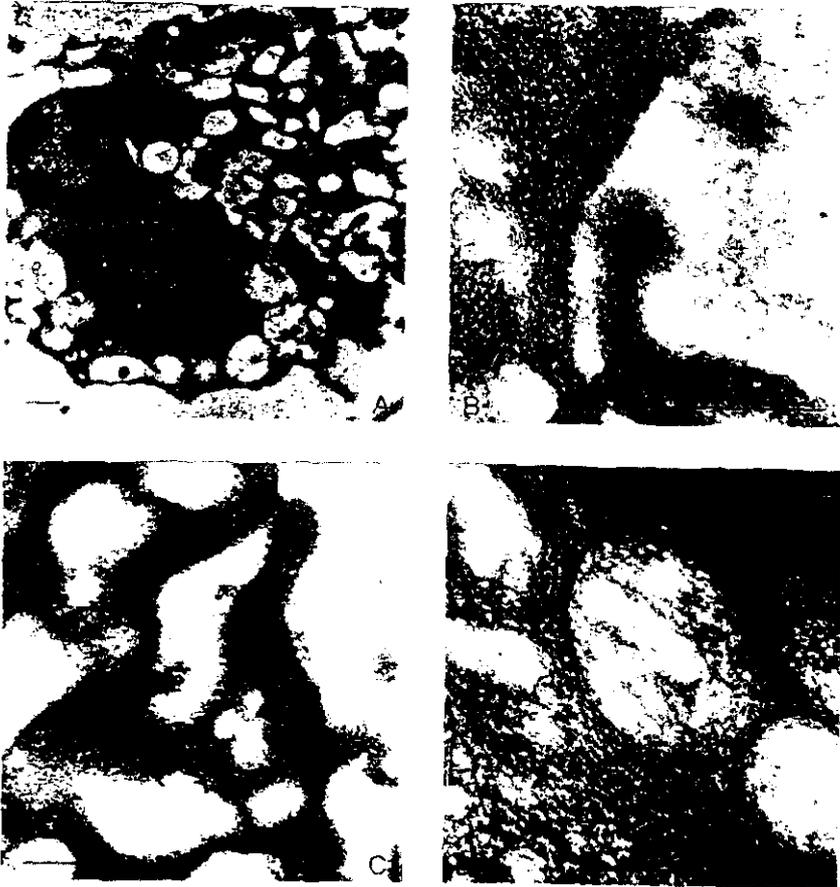


Figura 26: inmunomarcaje con oro coloidal, de cultivos de células no parenquimatosas y enriquecidas en células de Kupffer y tratadas con LPS durante 60min a 37°C.

(A) (x13300) (B) (x94200) (C) (x55380) (D) (x94200)
(E) (x94200) (F) (x55380)

RESULTADOS

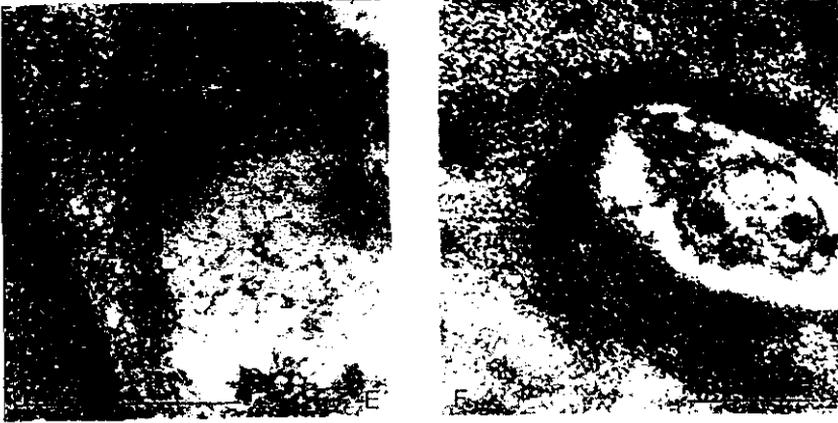


Figura 26: (Continuación)

Tabla 9: Incorporación de [14 C]-LPS por cultivos de células no parenquimatosas enriquecidos en células de Kupffer.

| 14 C]-LPS | LPS INCORPORADO |
|-------------------------|-------------------------------|
| 5 μ g/ 10^6 NPc | 61 \pm 14 ng/ 10^6 NPc |
| 10 μ g/ 10^6 NPc | 99 \pm 6 ng/ 10^6 NPc |
| 55 μ g/ 10^6 NPc | 649 \pm 69 ng/ 10^6 NPc |
| 255 μ g/ 10^6 NPc | 3180 \pm 460 ng/ 10^6 NPc |

3.3. PROPIEDADES FÍSICAS DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA DE CELULAS HEPÁTICAS

Considerando la importancia de la interacción LPS-membrana plasmática en la citotoxicidad del LPS (Dijkstra *et al.*, 1987; Dijkstra *et al.*, 1988; Dijkstra *et al.*, 1989), se ha procedido a analizar en profundidad el efecto de la endotoxina sobre las propiedades físicas de la membrana celular, así como sobre su funcionalidad (Resultados, *apao.* 3.4.).

3.3.1. Liberación de lactato deshidrogenasa (LDH).

La evolución del daño celular ocasionado por el LPS se ha evaluado valorando la actividad extracelular de LDH en hepatocitos en cultivo. Esta enzima citoplasmática se vierte al medio si existe alteración de la membrana celular y necrosis.

Los resultados obtenidos ponen de manifiesto una elevación significativa de la actividad de LDH en los sobrenadantes de cultivos incubados con la endotoxina (Fig. 27). Dicha elevación es directamente proporcional a la dosis de lipopolisacárido empleada, así como al tiempo de incubación, reflejando una alteración celular progresiva a medida que la endotoxina ejerce su acción.

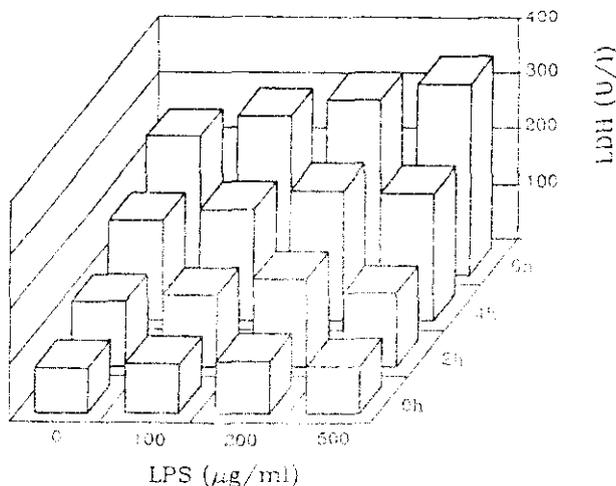


Figura 27: Efecto de la dosis y el tiempo de incubación con LPS, sobre la actividad extracelular de LDH en hepatocitos en cultivo.

3.3.2. Incorporación de diacetato de fluoresceína (FDA).

El diacetato de fluoresceína o FDA es una sonda apolar que penetra fácilmente en el interior de la célula, donde las esterasas citoplasmáticas catalizan su hidrólisis dando lugar a un acúmulo intracelular de fluoresceína (polar), dependiente de la integridad de la membrana plasmática (Rotman & Papernaster, 1966). Esto le confiere una gran utilidad en estudios de viabilidad celular.

Estos estudios se han realizado mediante técnicas de microscopía óptica de fluorescencia, citometría de flujo y espectrofluorimetría, con células en suspensión y en cultivo.

a) Microscopía óptica de fluorescencia.

Dosis de endotoxina entre 100 y 200 µg/ml no alteran la viabilidad de hepatocitos en suspensión (Tabla 10), observándose un ligero aumento del número de células fluorescentes aunque dichas células presentan una intensidad de fluorescencia considerablemente menor que las control (Fig. 28).

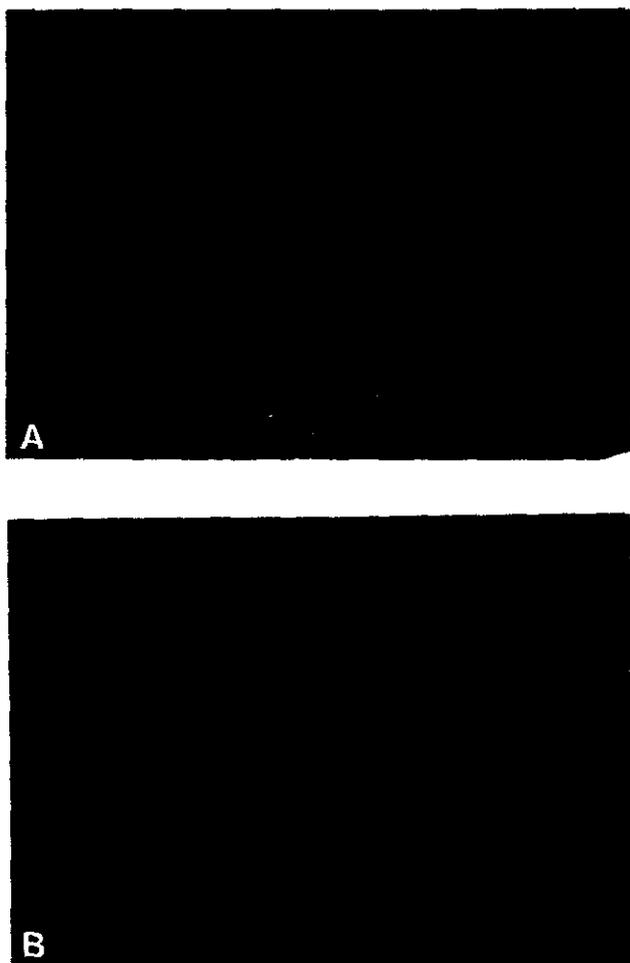


Figura 28: Incorporación de diacetato de fluoresceína (FDA) por monocapa de hepatocitos en cultivo primario, observada mediante microscopía óptica de fluorescencia ($\times 435$).

A) Monocapa control

B) Monocapa tratada con LPS (500 $\mu\text{g/ml}$)

Tabla 10: Viabilidad de hepatocitos en suspensión; en función del tiempo de incubación en presencia o ausencia de LPS (100 y 200 µg/ml); y evaluada con la sonda FDA.

| TIEMPO (min) | VIA B I L I D A D (%) | | |
|-----------------|-----------------------|----------------|----------------|
| | CONTROL | LPS (100µg/ml) | LPS (200µg/ml) |
| 40 | 89 | 78 | 76 |
| 70 | 85 | 95 | 104 |

Como se observa en la *Figura 29*, la dosis más elevada de lipopolisacárido (1mg/ml) produce una disminución considerable de la viabilidad.

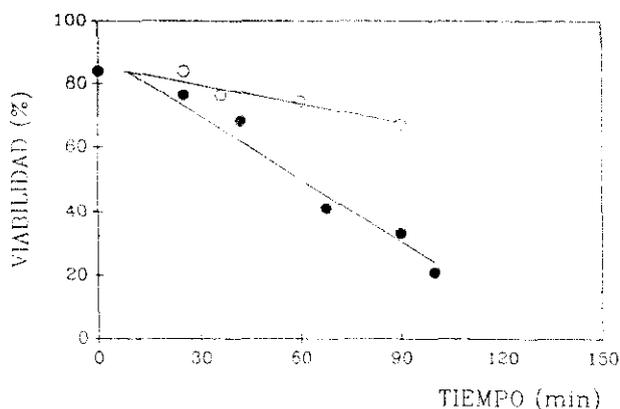


Figura 29: Viabilidad de hepatocitos en suspensión, en función del tiempo de incubación en presencia (●) o ausencia (○) de LPS (1mg/ml); y evaluada con la sonda FDA.

Con el fin de esclarecer el efecto de la endotoxina sobre la integridad de la membrana plasmática, se han realizado estudios semicuantitativos y cuantitativos mediante dos técnicas distintas: citometría de flujo y espectrofluorimetría; evaluándose la incorporación del FDA y su retención intracelular.

b) Citometría de flujo.

Esta técnica ha permitido estudiar semicuantitativamente la intensidad de fluorescencia que presentan las células de cada muestra. La representación que se obtiene (*Fig. 30*) indica

el tamaño celular (FLS = "forward light scattering") frente al logaritmo de la intensidad de fluorescencia (LGFL) y confirma los resultados obtenidos con los estudios de microscopía.

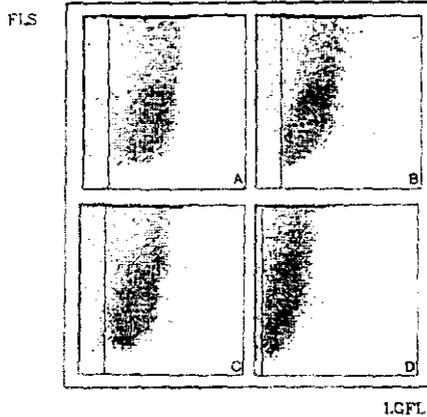


Figura 30: Incorporación de FDA por hepatocitos aislados, observada mediante citometría de flujo.

A) Hepatocitos control; B), C) y D) Hepatocitos preincubados 15min con 100, 200 y 500µg LPS/ml, respectivamente.

Como se observa en la Figura 30, la intensidad de fluorescencia emitida por los hepatocitos, disminuye en los tratados con el LPS respecto a los controles. Esta disminución es tanto más elevada cuanto mayor es la dosis de endotoxina con que se incubó la suspensión celular (100, 200 y 500µg LPS/ml).

Un estudio paralelo se ha llevado a cabo con suspensiones de NPc enriquecidas en macrófagos de Kupffer. En este caso el tratamiento con LPS da lugar a un rápido incremento de la intensidad de fluorescencia emitida por la muestra, con las dos dosis de endotoxina ensayadas (10 y 100µg/ml) (Fig. 31) y a una disminución del número de células fluorescentes, cuando se tratan las células con la dosis más baja de LPS (10µg/ml) (Tabla 11).

Tabla 11: Viabilidad de suspensiones de NPc enriquecidas en células de Kupffer, preincubadas (15min/37°C) con distintas dosis de LPS y posteriormente incubadas con FDA (0.05µg/ml).

| TRATAMIENTO | VIABILIDAD (%) | F |
|-------------|----------------|----|
| Control | 84 ± 2 | + |
| LPS 10 | 70 ± 1 | ++ |
| LPS 100 | 83 ± 1 | ++ |

RESULTADOS

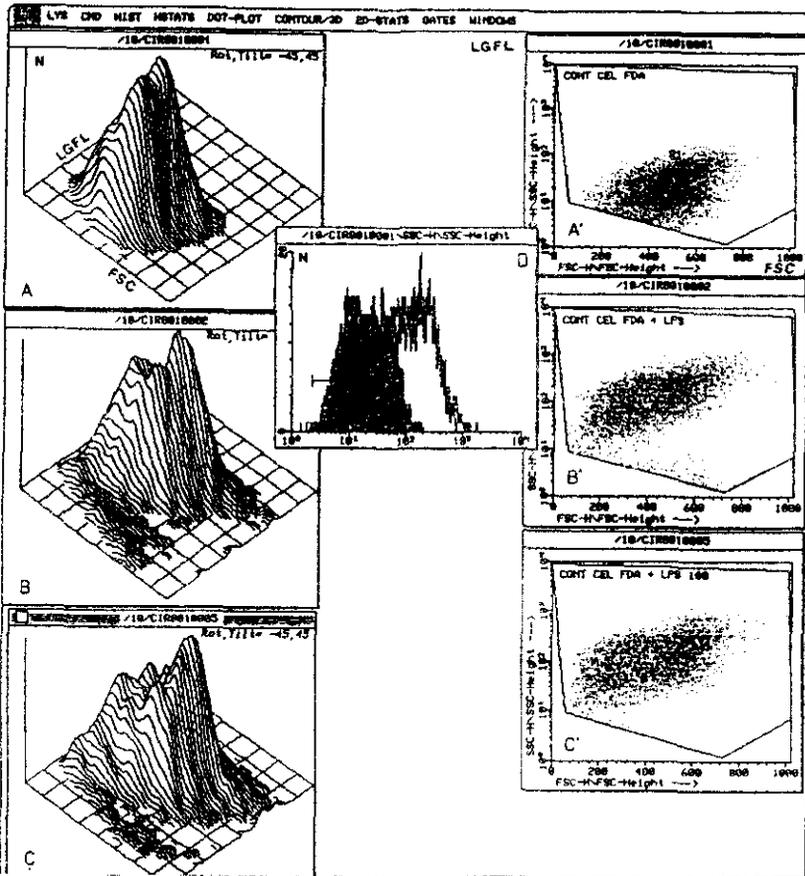


Figura 31: Representación tridimensional del efecto de distintas dosis de LPS sobre la intensidad de fluorescencia emitida por suspensiones de NPe enriquecidas en células de Kupffer, incubadas con FDA (0.05 µg/ml).

(A) Controles (B) LPS (10 µg/ml) (C) LPS (100 µg/ml)
 (D) Representación conjunta de A, B y C

En los ejes se representa N (nº de células), LGFL (logaritmo de la fluorescencia) y FSC (tamaño celular).

c) Espectrofluorimetría

Puesto que la citometría de flujo sólo permite el empleo de células en suspensión, se ha utilizado la espectrofluorimetría como técnica que hace posible la determinación cuantitativa de la fluorescencia presente en el interior de hepatocitos *en cultivo* (tratados con FDA) así como la debida a la fluoresceína liberada al medio por los mismos.

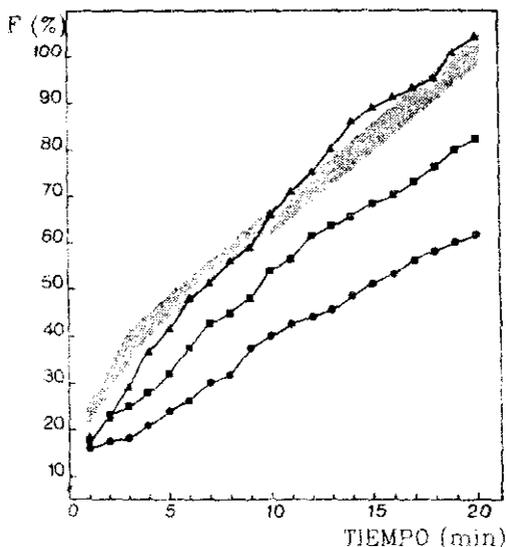


Figura 32: Incorporación de FDA por hepatocitos en cultivo, observada a lo largo del tiempo mediante espectrofluorimetría. (■) Células control; (▲, ■ y ●) células preincubadas 15min con 100, 200 y 500µg LPS/ml, respectivamente.

Se representa la intensidad de fluorescencia en %, calculado respecto al valor promedio de un mínimo de 5 preparaciones control. El 100% es el máximo de intensidad de fluorescencia que corresponde a los controles a los 20min de incubación. (Error = 5%).

La Figura 32 pone de manifiesto que las monocapas de hepatocitos preincubadas con endotoxina emiten menor intensidad de fluorescencia que las control. Se comprueba por tanto, usando el modelo de cultivo primario, lo observado con las células en suspensión mediante las técnicas de microscopía y citometría de flujo.

Para discernir si la disminución de la intensidad de fluorescencia observada en el interior de las células tratadas, es debida exclusivamente a una salida facilitada del fluoróforo y/o si influyen otros factores, se realizaron medidas de la intensidad de fluorescencia presente en los sobrenadantes de los cultivos previamente incubados con la sonda, a distintos tiempos.

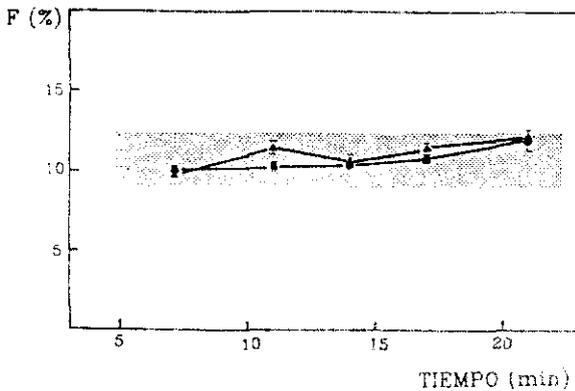


Figura 33: Liberación de fluoresceína a lo largo del tiempo, determinada mediante espectrofluorimetría, en sobrenadantes de hepatocitos en cultivo preincubados con FDA. (▲) Células control, (▲ y ●) células preincubadas 15min con 100 y 200µg LPS/ml, respectivamente. Se representa en % respecto al 100% que es el máximo de intensidad de fluorescencia en el interior de los Pc control a los 20min.

Los datos obtenidos (Fig. 33) indican que la cantidad de fluoresceína liberada al medio se mantiene prácticamente constante con el tiempo, no pudiendo explicarse la disminución de fluorescencia intracelular en los hepatocitos tratados, sólo por un incremento en la salida del fluoróforo.

3.3.3. Microviscosidad.

La interacción LPS-membrana plasmática puede modificar parámetros físicos de la membrana. Estudios previos realizados con la sonda 1,6-difenilhexa-1,3,5-trieno (DPH), han demostrado que el LPS afecta a la microviscosidad de las membranas plasmáticas hepáticas *in vitro* (Portolés *et al.*, 1987). Estos resultados hacen referencia exclusivamente a la zona interna de la bicapa lipídica, donde se intercala el DPH, pero no se conoce la influencia de la endotoxina sobre la zona exterior de la membrana plasmática, lo cual constituye un punto clave en la interacción LPS-célula. Por ello, en todos los estudios que se detallan a continuación, se ha utilizado no sólo DPH sino también TMA-DPH (1-[4-(trimetilamino)-fenil]-6-fenil-hexa-1,3,5-trieno), un derivado del compuesto anterior que tiene similares propiedades fotofísicas pero que, dada su carga catiónica, se sitúa en la interfase lípido-agua sin penetrar en el interior de la bicapa (Prendergast *et al.*, 1981). El efecto del LPS y/o sales biliares se ha analizado en membranas de hígado y/o distintos tipos celulares hepáticos.

a) Efecto del LPS.

Utilizando preparaciones de membranas plasmáticas hepáticas tratadas con distintas dosis de LPS durante 15 y 45min, tanto en los ensayos realizados con DPH como con TMA-DPH, se observa que la endotoxina aumenta la microviscosidad de la membrana tanto en su zona externa (TMA-DPH) como en el interior de la bicapa (DPH), siendo el incremento directamente dependiente de la dosis de LPS utilizada (Figs. 34 y 35). El efecto es idéntico a distintos tiempos de incubación con el LPS como se puede apreciar en las Tablas 12 y 13.

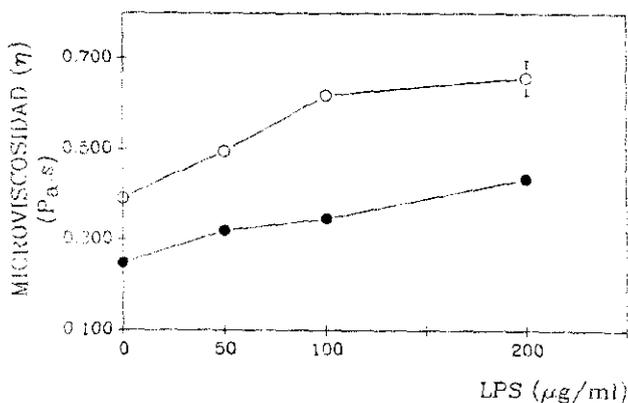


Figura 34: Microviscosidad de membranas plasmáticas hepáticas preincubadas con TMA-DPH (○) o con DPH (●). Efecto de la incubación (15min/37°C) con distintas dosis de LPS.

Tabla 12: Efecto de la incubación (15min/37°C) con distintas dosis de LPS, sobre la microviscosidad de membranas plasmáticas hepáticas preincubadas con TMA-DPH o DPH. Los porcentajes se calculan respecto a la microviscosidad de las membranas control.

| TRATAMIENTO | MICROVISCOSIDAD (%) | |
|-------------|---------------------|---------|
| | TMA-DPH | DPH |
| Control | 100 ± 2 | 100 ± 6 |
| LPS 50 | 127 ± 2 | 129 ± 1 |
| LPS 100 | 158 ± 1 | 140 ± 4 |
| LPS 200 | 168 ± 10 | 175 ± 3 |

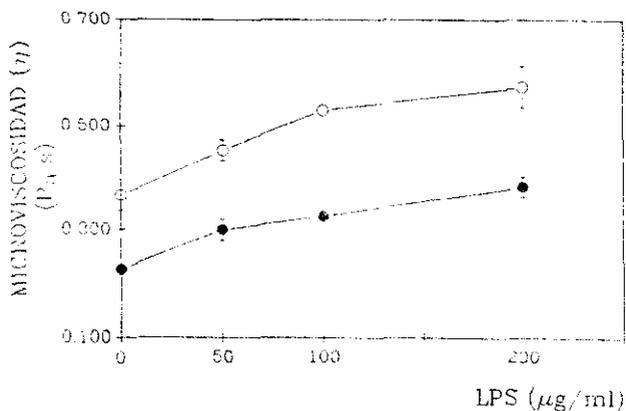


Figura 35: Microviscosidad de membranas plasmáticas hepáticas preincubadas con TMA-DPH (○) o con DPH (●). Efecto de la incubación (45min/37°C) con distintas dosis de LPS.

Tabla 13: Efecto de la incubación (45min/37°C) con distintas dosis de LPS, sobre la microviscosidad de membranas plasmáticas hepáticas preincubadas con TMA-DPH o DPH. Los porcentajes se calculan respecto a la microviscosidad de las membranas control.

| TRATAMIENTO | MICROVISCOSIDAD (%) | |
|-------------|---------------------|---------|
| | TMA-DPH | DPH |
| Control | 100 ± 8 | 100 ± 2 |
| LPS 50 | 123 ± 5 | 133 ± 9 |
| LPS 100 | 144 ± 1 | 144 ± 3 |
| LPS 200 | 156 ± 11 | 170 ± 9 |

Un análisis semejante que compara el efecto del LPS (200μg/ml) con el del óxido de fenilarisina (PhAsO), conocido inhibidor de la endocitosis, conduce a los resultados que aparecen en la Figura 36.

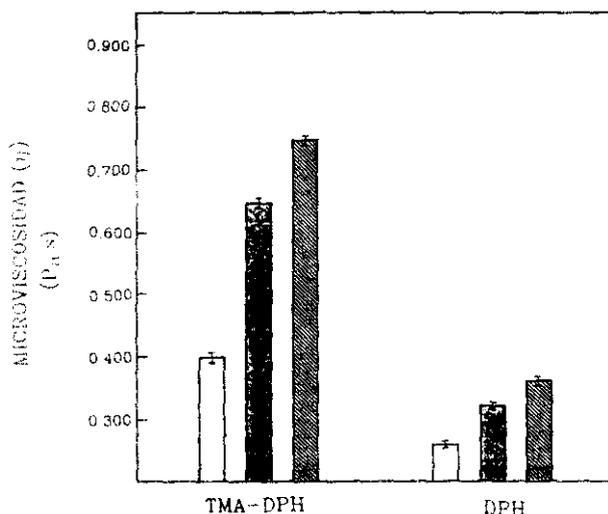


Figura 3c: Microviscosidad de membranas plasmáticas hepáticas preincubadas con TMA-DPH o DPH. Efecto de la incubación con LPS (200µg/ml) (■) o PhAsO (10µM) (▨). Controles (□).

El aumento de microviscosidad inducido por el LPS sobre las membranas vuelve a ponerse de manifiesto, coincidiendo con el efecto ejercido por el PhAsO. No obstante, el óxido de fenilarsina disminuye la fluidez fundamentalmente en la zona externa de la membrana (la microviscosidad aumenta un 88%); mientras que en el interior de la bicapa la influencia es menor, siendo en este caso más acusada la alteración producida por el LPS (Tabla 14).

Tabla 14: Efecto de la incubación (15min/37°C) con LPS (200µg/ml) o/y PhAsO (10µM), sobre la microviscosidad de membranas plasmáticas hepáticas preincubadas con TMA-DPH o DPH. Los porcentajes se calculan respecto a la microviscosidad de las membranas control.

| TRATAMIENTO | MICROVISCOSIDAD (%) | |
|-------------|---------------------|---------|
| | TMA-DPH | DPH |
| Control | 100 ± 1 | 100 ± 2 |
| LPS | 163 ± 1 | 172 ± 1 |
| PhAsO | 188 ± 1 | 139 ± 1 |

Para conocer el efecto de la endotoxina sobre la membrana plasmática de los distintos tipos celulares hepáticos, se han utilizado poblaciones celulares puras, preincubadas con una u otra sonda y tratadas durante 30min a 37°C con distintas dosis de LPS.

Los resultados obtenidos con células parenquimatosas aisladas, ponen de manifiesto que el LPS incrementa la microviscosidad de la zona externa de la membrana celular, mientras que casi no afecta al interior de la bicapa lipídica (Fig. 37).

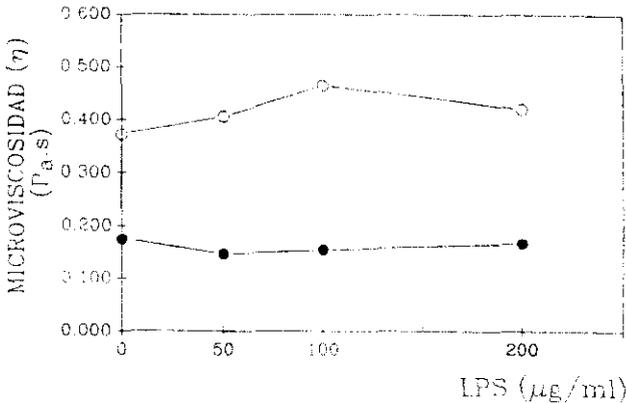


Figura 37: Microviscosidad de la membrana plasmática de células parenquimatosas hepáticas preincubadas con TMA-DPH (○) o DPH (●). Efecto de la incubación (30min/37°C) con distintas dosis de LPS.

Sin embargo, los resultados obtenidos con células no parenquimatosas aisladas, indican que la endotoxina disminuye significativamente la microviscosidad de la membrana plasmática en su zona externa, mostrando un efecto contrario en el interior (aumento de η) (Fig. 38).

El aumento de microviscosidad puesto de manifiesto con la sonda DPH, se da prácticamente en igual extensión que la disminución observada con el TMA-DPH.

También se ha procedido a analizar el efecto de la temperatura de incubación en presencia o ausencia de LPS (200μg/ml) sobre la microviscosidad de la membrana plasmática de células no parenquimatosas aisladas (Tabla 15).

Se comprueba que, cuanto menor es la temperatura, mayor es el aumento de microviscosidad producido por la endotoxina. Incluso con la sonda TMA-DPH, la disminución de η observada tras la incubación a 37°C con LPS, se transforma en un aumento cuando la temperatura es 25°C.

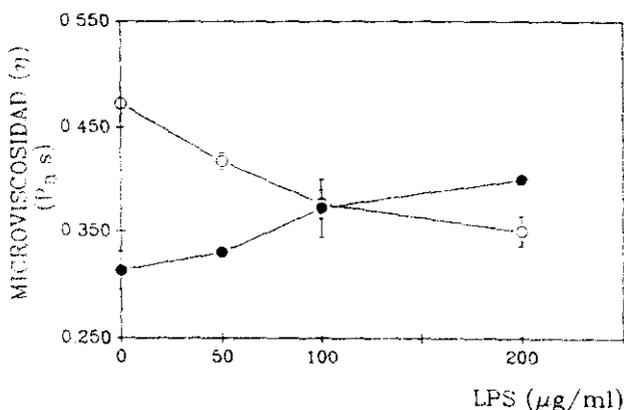


Figura 3E: Microviscosidad de la membrana plasmática de células no parenquimatosas hepáticas preincubadas con TMA-DPH (○) o DPH (●). Efecto de la incubación (30min/37°C) con distintas dosis de LPS.

Tabla 15: Efecto de la temperatura de incubación con LPS (200μg/ml) sobre la microviscosidad de la membrana plasmática de células no parenquimatosas hepáticas, preincubadas con TMA-DPH o DPH. Los porcentajes se calculan respecto a la microviscosidad control en cada caso.

| SONDA | t ^h | CONTROL | | LPS 200 | |
|---------|----------------|---------------|---------|---------------|---------|
| | | η (Pa·s) | % | η (Pa·s) | % |
| TMA-DPH | 25°C | 0.508 ± 0.006 | 100 ± 1 | 0.586 ± 0.006 | 115 ± 1 |
| | 37°C | 0.472 ± 0.004 | 100 ± 1 | 0.350 ± 0.014 | 74 ± 3 |
| DPH | 25°C | 0.424 ± 0.010 | 100 ± 2 | 0.896 ± 0.026 | 211 ± 6 |
| | 37°C | 0.341 ± 0.006 | 100 ± 2 | 0.488 ± 0.031 | 143 ± 9 |

b) Efecto de sales biliares.

Estudios *in vitro* han demostrado que algunas sales biliares disminuyen la unión del LPS a las células de Kupffer, sugiriendo la existencia de un efecto de dichas sales biliares sobre el estado físico de la membrana plasmática, que afectaría por tanto a la unión de la endotoxina (Van Bossuyt & Wisse, 1988).

Por ello se ha estudiado el efecto de distintas sales biliares sobre la microviscosidad de la membrana plasmática de las células del hígado, distinguiéndose entre células parenquimatosas y no parenquimatosas y considerando la zona externa (ensayos con TMA-DPH) y el interior (ensayos con DPH) de la bicapa lipídica.

Las sales biliares elegidas para el estudio han sido: Taurocolato sódico (TC), taurodesoxicolato sódico (TDC), la mezcla (M) constituida por {TC (85%) + TDC (15%)} y taurourso-desoxicolato sódico (TUDC).

Los resultados de estos experimentos se reflejan en las gráficas 39, 40, 41 y 42, en las que se representa microviscosidad (η) frente a índice de hidrofobicidad (I.H.) de las sales biliares con que se han incubado las células (30min/37°C). Dichos índices de hidrofobicidad son los siguientes (Lutton, 1990):

| | | | | |
|-------|------|------|------|------|
| TUDC | TC | M | TDC | I.H. |
| -0.17 | 0.23 | 0.34 | 0.98 | |

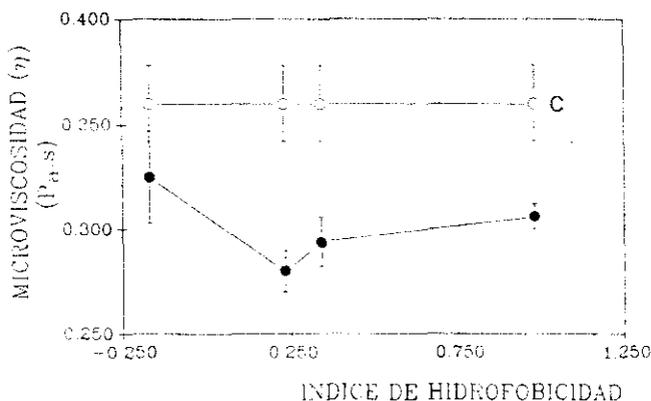


Figura 39: Microviscosidad de la membrana plasmática de células parenquimatosas hepáticas preincubadas con TMA-DPH. Efecto de la incubación (30min/37°C) con sales biliares (2mM) de distinto índice de hidrofobicidad: TUDC (I.H. = -0.17), TC (I.H. = 0.23), M (I.H. = 0.34) y TDC (I.H. = 0.98). C \equiv Controles.

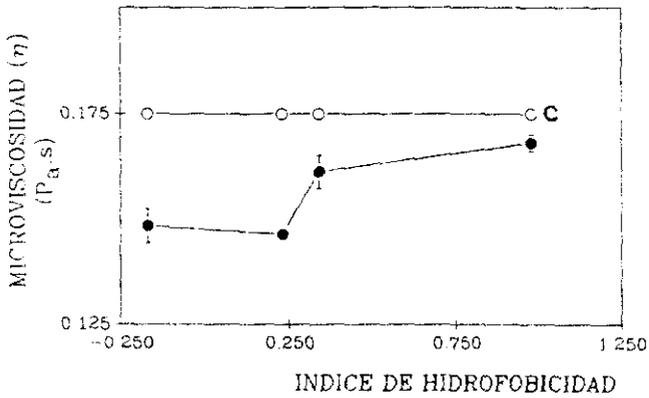


Figura 40: Microviscosidad de la membrana plasmática de células parenquimatosas hepáticas preincubadas con DPH. Efecto de la incubación (30min/37°C) con sales biliares (2mM) de distinto índice de hidrofobicidad: TUDC (I.H. = -0.17), TC (I.H. = 0.23), M (I.H. = 0.34) y TDC (I.H. = 0.98). C = Controles.

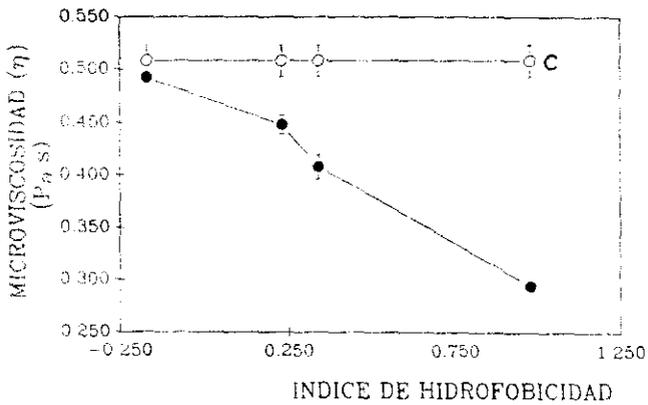


Figura 41: Microviscosidad de la membrana plasmática de células no parenquimatosas hepáticas preincubadas con TMA-DPH. Efecto de la incubación (30min/37°C) con sales biliares (2mM) de distinto índice de hidrofobicidad: TUDC (I.H. = -0.17), TC (I.H. = 0.23), M (I.H. = 0.34) y TDC (I.H. = 0.98). C = Controles.

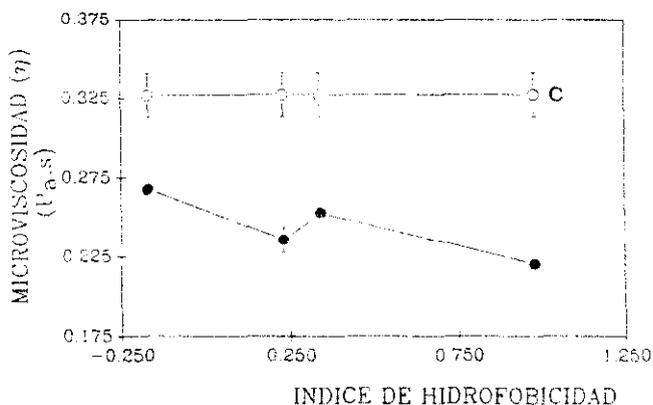


Figura 42: Microviscosidad de la membrana plasmática de células no parenquimatosas hepáticas preincubadas con DPH. Efecto de la incubación (30min/37°C) con sales biliares (2mM) de distinto índice de hidrofobicidad: TUDC (I.H. = -0.17), TC (I.H. = 0.23), M (I.H. = 0.34) y TDC (I.H. = 0.98). C ≡ Controles.

Comparando los resultados obtenidos en Pc y en NPC, se observa que en este último caso la disminución de la microviscosidad producida por las sales biliares es directamente proporcional a su índice de hidrofobicidad; siendo más pronunciado el efecto en el interior de la bicapa (DPH) que en el exterior (TMA·DPH), excepto para el caso del TDC (el más apolar), que aumenta considerablemente la fluidez de la zona externa de la membrana (Tabla 16).

Tabla 16: Efecto de la incubación (30min/37°C) con distintas sales biliares (2mM), sobre la microviscosidad de la membrana plasmática de células no parenquimatosas hepáticas preincubadas con TMA·DPH o DPH. Los porcentajes se calculan respecto a la microviscosidad de las células control.

| TRATAMIENTO | η (%) | |
|-------------|---------|---------|
| | TMA·DPH | DPH |
| Control | 100 ± 3 | 100 ± 4 |
| TUDC | 97 ± 1 | 82 ± 1 |
| TC | 88 ± 2 | 72 ± 2 |
| Mezcla | 80 ± 2 | 77 ± 1 |
| TDC | 58 ± 1 | 67 ± 1 |

Sin embargo en las células parenquimatosas, la disminución de la microviscosidad de su membrana plasmática, observada tras el tratamiento con las distintas sales biliares, no parece tener una relación directa con la hidrofobicidad de éstas, siendo el efecto mayor en la zona externa que en la interna excepto para el TUDC (el más polar), que prácticamente no afecta a los hepatocitos en la zona exterior de su bicapa lipídica (Tabla 17).

Tabla 17: Efecto de la incubación (30min/37°C) con distintas sales biliares (2mM), sobre la microviscosidad de la membrana plasmática de células parenquimatosas hepáticas preincubadas con TMA-DPH o DPH. Los porcentajes se calculan respecto a la microviscosidad de las células control.

| TRATAMIENTO | η (%) | |
|-------------|-------------|-------------|
| | TMA-DPH | DPH |
| Control | 100 \pm 5 | 100 \pm 1 |
| TUDC | 90 \pm 6 | 85 \pm 2 |
| TC | 78 \pm 3 | 83 \pm 1 |
| Mezcla | 82 \pm 3 | 92 \pm 2 |
| TDC | 85 \pm 2 | 96 \pm 1 |

En términos generales, se puede apreciar un efecto fluidificante de todas las sales biliares ensayadas, tanto en células parenquimatosas como en células no parenquimatosas. Considerando el efecto contrario ejercido por el LPS a nivel celular hepático; así como el hecho de que estas sales biliares disminuyen la unión de la endotoxina a los macrófagos de Kupffer (excepto el TUDC), se procedió a analizar la influencia sobre la microviscosidad de la incubación de células parenquimatosas o no parenquimatosas con sales biliares y LPS simultáneamente.

Las Tablas 18 y 19 muestran los resultados obtenidos, apreciándose que la incubación simultánea de las células con sal biliar y endotoxina, anula los efectos fluidificantes de las sales biliares, así como el efecto contrario del LPS. Esto ocurre en ambas poblaciones celulares (parenquimatosas y no parenquimatosas) y en las dos zonas estudiadas de la bicapa lipídica (externa e interna).

Tabla 18: Efecto de la incubación (30min/37°C) con distintas sales biliares (2mM) y LPS (200µg/ml), simultáneamente, sobre la microviscosidad de la membrana plasmática de células parenquimatosas hepáticas preincubadas con TMA-DPH o DPH. Los porcentajes se calculan respecto a la microviscosidad de las células control.

| TRATAMIENTO | MICROVISCOSIDAD | | | |
|-------------|-----------------|---------|---------------|---------|
| | TMA-DPH | | DPH | |
| | η (Pa·s) | % | η (Pa·s) | % |
| Control | 0.370 ± 0.010 | 100 ± 3 | 0.174 ± 0.008 | 100 ± 5 |
| TUDC | 0.338 ± 0.012 | 91 ± 4 | 0.167 ± 0.005 | 96 ± 3 |
| TC | 0.351 ± 0.005 | 95 ± 1 | 0.177 ± 0.000 | 102 ± 0 |
| Mezcla | 0.371 ± 0.008 | 100 ± 2 | 0.167 ± 0.005 | 96 ± 3 |
| TDC | 0.390 ± 0.006 | 105 ± 1 | 0.209 ± 0.002 | 120 ± 1 |

Tabla 19: Efecto de la incubación (30min/37°C) con distintas sales biliares (2mM) y LPS (200µg/ml), simultáneamente, sobre la microviscosidad de la membrana plasmática de células no parenquimatosas hepáticas preincubadas con TMA-DPH o DPH. Los porcentajes se calculan respecto a la microviscosidad de las células control.

| TRATAMIENTO | MICROVISCOSIDAD | | | |
|-------------|-----------------|---------|---------------|---------|
| | TMA-DPH | | DPH | |
| | η (Pa·s) | % | η (Pa·s) | % |
| Control | 0.503 ± 0.016 | 100 ± 3 | 0.322 ± 0.015 | 100 ± 5 |
| TUDC | 0.472 ± 0.000 | 94 ± 0 | 0.323 ± 0.001 | 100 ± 1 |
| TC | 0.498 ± 0.010 | 99 ± 2 | 0.336 ± 0.015 | 104 ± 4 |
| Mezcla | 0.487 ± 0.015 | 97 ± 3 | 0.315 ± 0.011 | 98 ± 4 |
| TDC | 0.434 ± 0.008 | 86 ± 2 | 0.340 ± 0.008 | 106 ± 2 |

3.4. FUNCIONALIDAD DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA DE CELULAS HEPATICAS.

3.4.1. Incorporación de [¹⁴C]-2-desoxiglucosa.

La 2-desoxiglucosa, metabolito que es transportado y fosforilado por los mismos mecanismos que la D-glucosa, no puede ser metabolizado por la célula. Por ello la

incorporación de este compuesto marcado radiactivamente permite comprobar la funcionalidad de la membrana plasmática de los cultivos celulares utilizados.

En este sentido, los hepatocitos en cultivo muestran un comportamiento dosis-dependiente respecto a la dosis de 2-desoxiglucosa (Tabla 20). En cuanto a la influencia ejercida por el LPS, se observa una disminución del transporte de glucosa directamente proporcional a la dosis de endotoxina utilizada (Tabla 21).

Tabla 20: Incorporación de [14 C]-2-desoxiglucosa por hepatocitos en cultivo.

| CONCENTRACION DE DESOXIGLUCOSA | [14 C]-2-DESOXIGLUCOSA INCORPORADA (nmoles/ 10^6 Pc) |
|-----------------------------------|---|
| 0.25mM | 16.93 \pm 1.13 |
| 0.50mM | 24.07 \pm 2.27 |
| 1.00mM | 50.17 \pm 1.67 |

Tabla 21: Efecto del LPS sobre la incorporación de [14 C]-2-desoxiglucosa por células parenquimatosas en cultivo. La concentración de desoxiglucosa en el medio es de 0.50mM.

| TRATAMIENTO | INCORPORACION DE [14 C]-2-DESOXIGLUCOSA | |
|-------------|---|-------------|
| | (nmoles/ 10^6 Pc) | % |
| Control | 24.07 \pm 2.27 | 100 \pm 9 |
| LPS 10 | 20.94 \pm 0.63 | 87 \pm 3 |
| LPS 50 | 13.48 \pm 0.29 | 56 \pm 2 |
| LPS 100 | 12.76 \pm 0.31 | 53 \pm 2 |

Asimismo, los cultivos primarios de células no parenquimatosas incorporan activamente la 2-desoxiglucosa, siendo la influencia de LPS diferente en dependencia de la dosis empleada, como se observa en la Tabla 22.

Tabla 22: Efecto del LPS sobre la incorporación de [¹⁴C]-2-desoxiglucosa por células no parenquimatosas en cultivo. La concentración de desoxiglucosa en el medio es de 1.00mM.

| TRATAMIENTO | INCORPORACION DE [¹⁴ C]-2-DESOXIGLUCOSA | |
|-------------|---|---------|
| | (pmoles/10 ⁶ NPC) | % |
| Control | 343 ± 30 | 100 ± 9 |
| LPS 10 | 513 ± 15 | 150 ± 3 |
| LPS 50 | 271 ± 5 | 79 ± 2 |
| LPS 100 | 354 ± 8 | 103 ± 2 |

3.4.2. Unión e internación de [¹²⁵I]-insulina.

Las alteraciones producidas por la endotoxina en las propiedades físicas de la membrana plasmática pueden repercutir en la unión e internación de distintos ligandos. Entre ellos la insulina tiene un interés especial por desarrollarse, durante el shock endotóxico, una resistencia periférica a esta hormona.

Por estas razones se ha analizado el efecto de la endotoxina sobre la unión de [¹²⁵I]-insulina a hepatocitos en cultivo, obteniéndose los resultados que se muestran en la Figura 43.

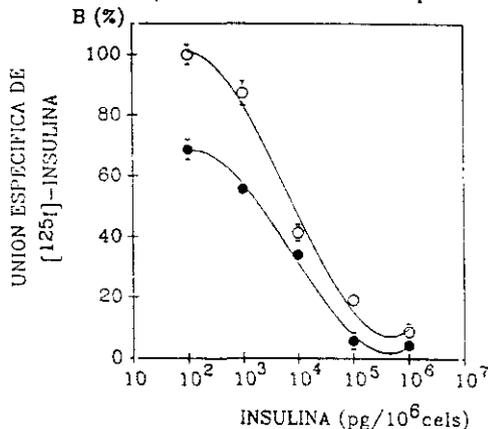


Figura 43: Efecto del LPS sobre la unión específica de insulina a hepatocitos en cultivo.

Las células son preincubadas en presencia (●) o ausencia (○) de LPS (200µg/ml) durante 30min a 25°C. El medio es aspirado y se inicia entonces la incubación con una concentración constante de [¹²⁵I]-insulina (1.3ng/10⁶ Pc) y concentraciones crecientes de la hormona fría (0, 10², 10³, 10⁴, 10⁵ y 10⁶ pg/10⁶ Pc) durante 90min a 25°C. Los porcentajes se calculan respecto a la unión control de [¹²⁵I]-insulina en ausencia de hormona fría.

Se observa que el LPS produce una disminución en la unión de insulina a las células con todas las dosis de hormona utilizadas.

También se ha analizado el efecto de la temperatura y el LPS en la unión específica de insulina (Tabla 23).

Tabla 23: Efecto del LPS sobre la unión específica de insulina a hepatocitos en cultivo, a diferentes temperaturas.

Las células son preincubadas con o sin LPS (200µg/ml) durante 30min a 25°C. El medio es aspirado y se inicia entonces la incubación con [¹²⁵I]-insulina (800pg/ml) en presencia o ausencia de un exceso de hormona fría (100µg/ml); durante 90min a 4, 25 ó 37°C. Los porcentajes se calculan respecto a la unión específica control de [¹²⁵I]-insulina a cada temperatura ensayada.

| TEMPERATURA | 4°C | 25°C | 37°C |
|-------------|--------|---------|---------|
| B (%) | 41 ± 7 | 70 ± 14 | 100 ± 9 |

La disminución de la unión de [¹²⁵I]-insulina inducida por el LPS en las células parenquimatosas, es mucho más patente cuanto menor es la temperatura del ensayo, desapareciendo el efecto a 37°C.

Para analizar la influencia de la endotoxina sobre la internación de insulina y su tiempo-y temperatura-dependencia, se llevaron a cabo diversos experimentos utilizando la técnica de lavados ácidos (Olefsky & Kao, 1982) ya que es conocida la disociación de los complejos receptor-ligando inducida mediante acidificación (Davis et al., 1987).

En primer lugar se ha estudiado la unión específica total de [¹²⁵I]-insulina a hepatocitos en cultivo preincubados (LPS) o no (C) con la endotoxina (200µg/ml), durante diferentes tiempos (37°C) (Fig. 44). La distinción hecha entre hormona unida a la superficie celular y hormona internada, permite observar que a tiempos cortos de incubación (30min), el LPS disminuye claramente la unión total de hormona, tanto la contribución de insulina superficial (extraíble por el lavado ácido) como la de insulina internada. A medida que aumenta el tiempo de incubación con la endotoxina, la unión total de insulina va siendo menos afectada, desapareciendo el efecto previamente observado sobre la cantidad de hormona asociada a la superficie, la cual llega a ser incluso mayor que en los controles. La internación de insulina se ve, no obstante, claramente disminuída por el LPS a todos los tiempos de incubación ensayados.

En segundo lugar se procedió a analizar la dependencia de la temperatura en el efecto ejercido por la endotoxina sobre la internación de la hormona. Para ello, los hepatocitos en cultivo fueron preincubados con LPS (200µg/ml) e incubados posteriormente con [¹²⁵I]-insulina durante 90min a 4 ó 37°C.

En la Figura 45 se pone de manifiesto que la disminución de la internación de insulina, producida por el LPS, es mucho más patente a temperaturas bajas (4°C) que a 37°C.

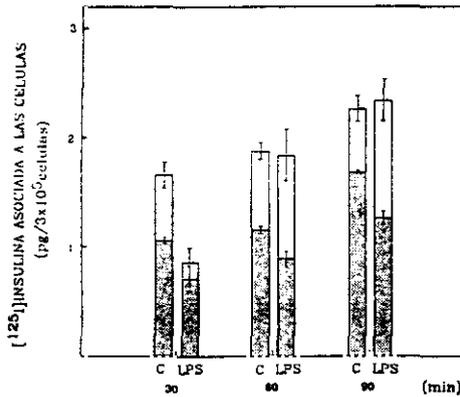


Figura 44: Efecto del LPS sobre la unión e internación de insulina a hepatocitos en cultivo, a distintos tiempos.

Las células son preincubadas en presencia o ausencia de LPS (200µg/ml) durante 30min a 25°C. El medio es aspirado y las células son entonces incubadas con [¹²⁵I]-insulina (800pg/ml) en presencia o ausencia de un exceso de hormona fría (100µg/ml), durante 30, 60 ó 90min a 37°C. Tras retirar el medio, la insulina internada se determina mediante la técnica de acidificación.

□ Insulina unida a la superficie. ▨ Insulina internada.

La suma de ambos términos expresa la unión específica total de la hormona.

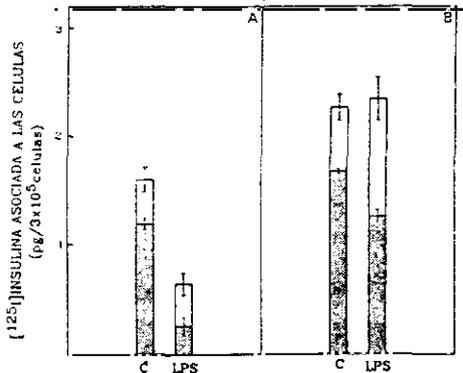


Figura 45: Efecto del LPS sobre la unión e internación de insulina a hepatocitos en cultivo, a distintas temperaturas.

Las células son preincubadas en presencia o ausencia de LPS (200µg/ml) durante 30min a 25°C. El medio es aspirado y las células son entonces incubadas con [¹²⁵I]-insulina (800pg/ml) en presencia o ausencia de un exceso de hormona fría (100µg/ml), durante 90min a 4°C (A) ó a 37°C (B). Tras retirar el medio la insulina internada se determina mediante la técnica de acidificación.

□ Insulina unida a la superficie. ▨ Insulina internada.

La suma de ambos términos expresa la unión específica total de la hormona.

3.4.3. Unión e internación de [125 I]-LDL

La mayoría del colesterol plasmático está contenido en las lipoproteínas de baja densidad (LDL) (Goldstein & Brown, 1977) cuyo catabolismo hepático (Bhattacharya et al, 1984) requiere una endocitosis mediada por receptor (Goldstein et al, 1985; Kleinherenbrink-Stins et al, 1990).

Puesto que durante el *shock* endotóxico el metabolismo hepático se halla comprometido, se ha analizado el efecto de la preincubación con distintas dosis de endotoxina, sobre la unión total de [125 I]-LDL a hepatocitos en cultivo (Fig. 46).

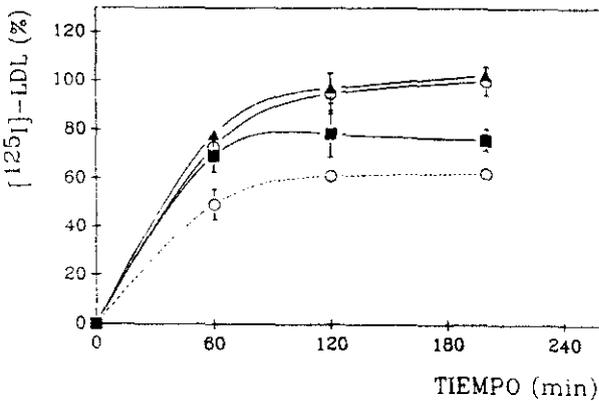


Figura 46: Efecto del LPS sobre la unión total de LDL a hepatocitos en cultivo.

Las células son preincubadas en ausencia (○) o presencia de distintas dosis de LPS (▲ LPS 100, ■ LPS 200) durante 30 min a 37°C. El medio es aspirado y se inicia entonces la incubación con [125 I]-LDL (480 ng/ml) en presencia (○—○) o ausencia (○—○) de un gran exceso de LDL fría (300 µg/ml), durante distintos tiempos a 37°C. Los porcentajes se calculan respecto a la máxima unión control en ausencia de lipoproteína fría.

Sólo con dosis de 200 µg LPS/ml se observa una disminución en la unión de la lipoproteína, más patente a tiempos más largos.

Se ha descrito que la incubación con HDL aumenta el número de R_{LDL} presentes en la superficie celular (Havekes et al, 1986a; Havekes et al, 1986b). Por ello se procedió a realizar un estudio paralelo al anterior pero incubando además las células con HDL, con el fin de analizar si el incremento del número de R_{LDL} es capaz de revertir el efecto del LPS (200 µg/ml) sobre la unión de [125 I]-LDL a los hepatocitos. Los resultados obtenidos (Fig. 47)

indican, no obstante, una inhibición de la unión específica de LDL excepto en el caso de que las células sean pretratadas con 100µg/ml de endotoxina.

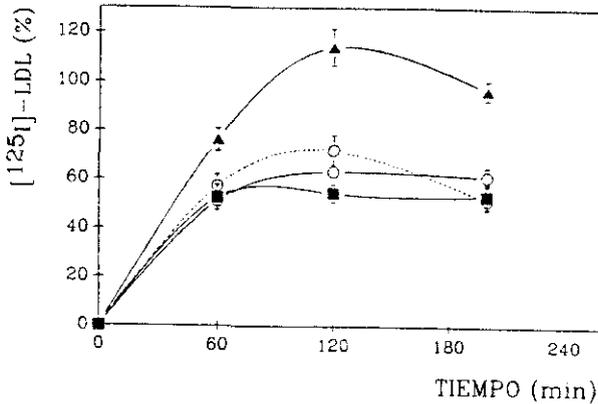


Figura 47: Efecto del LPS y la HDL sobre la unión total de LDL a hepatocitos en cultivo. Las células son preincubadas en ausencia (○) o presencia de distintas dosis de LPS (▲ LPS 100, ■ LPS 200) durante 30min a 37°C. El medio es aspirado y se lleva a cabo entonces la incubación con HDL (260µg/ml) durante 45min a 37°C. Tras retirar el medio se inicia la incubación con [¹²⁵I]-LDL (480ng/ml) en presencia (○ ···· ○) o ausencia (○ — ○) de un gran exceso de LDL fría (300µg/ml), durante distintos tiempos a 37°C. Los porcentajes se calculan respecto a la máxima unión control en ausencia de lipoproteína fría (LDL y HDL).

La ampliación de este estudio con distintas dosis de HDL (Fig. 48) confirma los resultados anteriores indicando que esta lipoproteína de alta densidad disminuye la unión de LDL a sus receptores en hepatocitos. Esta disminución es parcialmente inhibida en presencia de LPS.

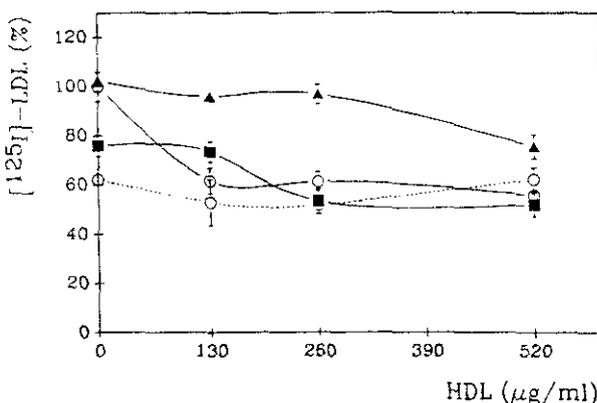


Figura 48: Efecto de distintas concentraciones de HDL sobre la unión total de LDL a hepatocitos en cultivo. Las células son preincubadas en ausencia (○) o presencia de distintas dosis de LPS (▲ LPS 100, ■ LPS 200) durante 30min a 37°C. El medio es aspirado y se lleva a cabo entonces la incubación con HDL (130, 260 y 520µg/ml) durante 45min a 37°C. Tras retirar el medio se inicia la incubación con ¹²⁵I]-LDL (480ng/ml) en presencia (○-----○) o ausencia (○—○) de un gran exceso de LDL fría (300µg/ml), durante 240min a 37°C. Los porcentajes se calculan respecto a la máxima unión control en ausencia de lipoproteína fría (LDL y HDL).

Para analizar si el efecto de la endotoxina se ejerce sólo a nivel de la unión de la LDL o si también existe alteración de la internación de la lipoproteína por el hepatocito, se ha determinado el porcentaje de internación de dicho ligando tanto en presencia como en ausencia de LPS (Tabla 24).

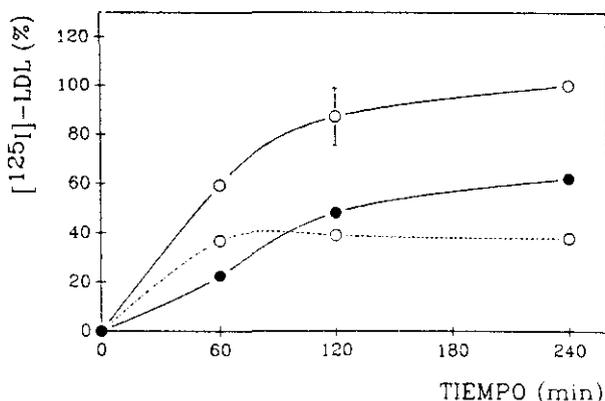
Tabla 24: Efecto del LPS sobre la internación de LDL en hepatocitos en cultivo.

Las células son preincubadas en presencia o ausencia de LPS (100µg/ml) durante 30min a 37°C. El medio es aspirado y las células son entonces incubadas con ¹²⁵I]-LDL (480ng/ml) en presencia o ausencia de un gran exceso de LDL fría (300µg/ml), durante 240min a 37°C. Tras retirar el medio la LDL internada se determina mediante la técnica de acidificación. Los porcentajes se calculan respecto a la máxima unión control en ausencia de lipoproteína fría.

| | Interna + Superficial | Superficial | Interna | % Internación |
|---------|-----------------------|-------------|---------|---------------|
| CONTROL | 62.1 | 37.6 | 24.5 | 39.5 |
| LPS 100 | 54.3 | 12.5 | 41.8 | 77.0 |

Los resultados indican que la cantidad de LDL internada es prácticamente el doble en las células preincubadas con endotoxina que en las control.

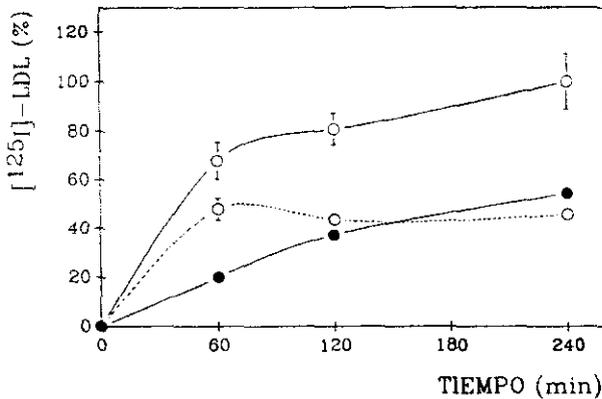
Teniendo en cuenta la especial naturaleza de este ligando, que presenta la posibilidad de formar complejos estables con el LPS (*Van Lenten et al., 1986*), se ha analizado detalladamente la influencia de la endotoxina sobre la unión específica de la LDL, comprobándose la existencia de una alteración de la unión como consecuencia del aumento de interacción inespecífica LDL-membrana celular (*Figs. 49 y 50*).



| | 60 min | 120 min | 240 min |
|--------------|------------|-------------|-------------|
| Total | 59.3 ± 0.9 | 87.1 ± 11.7 | 100.0 ± 0.5 |
| Inespecífica | 36.8 ± 1.5 | 39.0 ± 2.0 | 37.9 ± 1.1 |
| Específica | 22.6 | 48.1 | 62.1 |

Figura 49: Unión específica de LDL a hepatocitos en cultivo.

Las células son preincubadas en ausencia de LPS durante 30min a 37°C. El medio es aspirado y las células son entonces incubadas con $[^{125}I]$ -LDL (480mg/ml) en presencia (○-----○) o ausencia (○—○) de un gran exceso de lipoproteína fría (300µg/ml), durante distintos tiempos a 37°C. La diferencia de ambos términos es la unión específica (●). Los porcentajes se calculan respecto a la máxima unión control en ausencia de lipoproteína fría.



| | 60 min | 120 min | 240 min |
|--------------|------------|------------|--------------|
| Total | 67.9 ± 7.6 | 80.8 ± 6.4 | 100.0 ± 11.2 |
| Inespecifica | 47.9 ± 4.6 | 43.6 ± 2.9 | 45.7 ± 2.1 |
| Especifica | 20.1 | 37.2 | 54.3 |

Figura 50: Efecto del LPS sobre la unión específica de LDL a hepatocitos en cultivo.

Las células son preincubadas en presencia de LPS (100µg/ml) durante 30min a 37°C. El medio es aspirado y las células son entonces incubadas con ¹²⁵I]-LDL (480ng/ml) en presencia (○.....○) o ausencia (○—○) de un gran exceso de lipoproteína fría (300µg/ml), durante distintos tiempos a 37°C. La diferencia de ambos términos es la unión específica (●). Los porcentajes se calculan respecto a la máxima unión control en ausencia de lipoproteína fría.

3.5. PARAMETROS BIOQUIMICOS INTRACELULARES.

En este apartado se analiza la influencia de la endotoxina en diversos aspectos de la función celular, aspectos que incluyen la actividad de algunas enzimas: glucoquinasa, fosfatasa ácida y superóxido dismutasa; la peroxidación lipídica, los niveles de citocromo b₅, la concentración de calcio citosólico y el pH intracelular.

3.5.1. Glucoquinasa (GK).

La actividad de la enzima GK se ha estudiado en hepatocitos en cultivo analizando la influencia de distintas dosis de endotoxina. Los resultados indican (Fig. 51) que sólo a partir de $100\mu\text{g/ml}$ se observa un incremento significativo de la actividad enzimática intracelular.

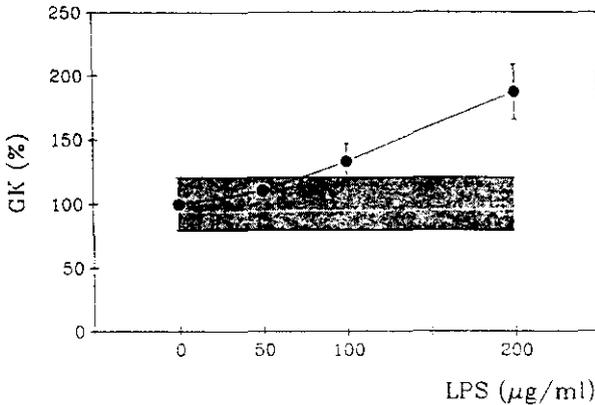


Figura 51: Efecto de la incubación (2h/37°C) con diferentes dosis de LPS, sobre la actividad intracelular de GK en hepatocitos en cultivo. Los porcentajes se calculan respecto a la actividad de GK en las células control (■).

Asimismo, se analizó la influencia del tiempo de incubación con la endotoxina y el efecto que las sales biliares TC y TC+TDC ejercen sobre este parámetro. La Figura 51 muestra que el LPS ($200\mu\text{g/ml}$) a las 2 horas de incubación con los hepatocitos, duplica la actividad de GK, efecto que se anula si el tiempo de incubación es menor (30min). En cuanto a las sales biliares, no muestran influencia a ninguno de los tiempos de incubación ensayados y, además, anulan el efecto del LPS ($200\mu\text{g/ml}$) llegando incluso a convertirlo en efecto de signo contrario (TC+TDC).

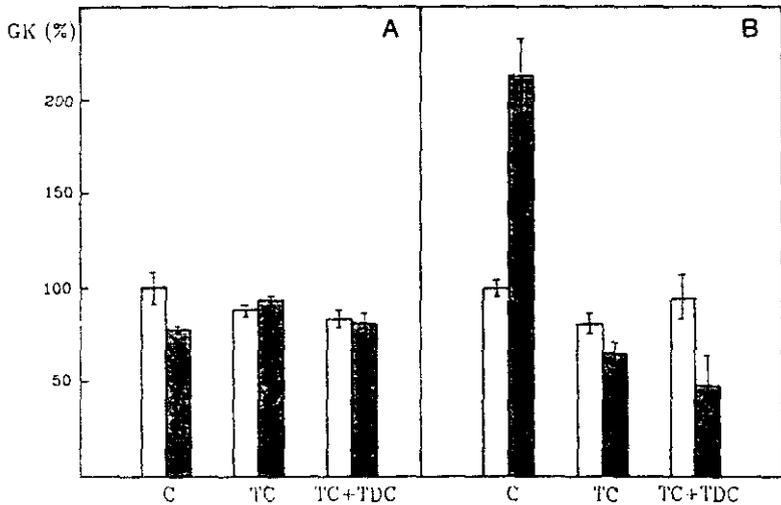


Figura 52: Efecto del tiempo de incubación con LPS y/o distintos tipos de sales biliares, sobre la actividad intracelular de GK en hepatocitos en cultivo. Los porcentajes se calculan respecto a la actividad de GK de las monocapas control ($\approx 100\%$). (A) 30min (B) 120min.

TC=Taurocolato sódico 2mM TDC=Taurodesatocolato sódico 2mM TC+TDC=Mezcla fisiológica.

□ Ausencia de LPS. ■ Presencia de LPS.

3.5.2. Fosfatasa ácida (FA).

El efecto de la endotoxina sobre la liberación de enzimas lisosomales del parénquima hepático se ha analizado utilizando como modelo experimental el cultivo primario de hepatocitos en monocapa, y como índice del daño lisosomal la actividad de fosfatasa ácida en el medio.

Para ello, se toman alícuotas a distintos tiempos de los sobrenadantes de los cultivos, incubados o no con distintas dosis de LPS. Los valores obtenidos de la actividad de la fosfatasa ácida correspondientes a estas muestras se representan en la *Tabla 25*, observándose que sólo en presencia de cantidades elevadas de la endotoxina (1mg/ml), hay un aumento significativo de la actividad extracelular de la enzima.

Tabla 25: Efecto del LPS sobre la actividad extracelular de fosfatasa ácida en hepatocitos en cultivo, a distintos tiempos.

| FOSFATASA ACIDA EXTRACELULAR (U/l) | | | | | |
|------------------------------------|-----------------|--------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| TIEMPO | CONTROL | LPS ($\mu\text{g/ml}$) | | | |
| | | 100 | 200 | 500 | 1000 |
| 0h | 0.22 \pm 0.03 | 0.18 \pm 0.02 | 0.18 \pm 0.02 | 0.23 \pm 0.08 | 0.26 \pm 0.03 |
| 2h | 0.29 \pm 0.15 | 0.13 \pm 0.06 | 0.15 \pm 0.01 | 0.41 \pm 0.06 | 0.49 \pm 0.08 |
| 4h | 0.34 \pm 0.10 | 0.28 \pm 0.09 | 0.20 \pm 0.02 | 0.37 \pm 0.07 | 0.80 \pm 0.31 |
| 6h | 0.47 \pm 0.09 | 0.31 \pm 0.02 | 0.32 \pm 0.03 | 0.25 \pm 0.04 | 0.74 \pm 0.34 |

Tabla 26: Efecto del LPS sobre la actividad intracelular de fosfatasa ácida en hepatocitos en cultivo.

| FOSFATASA ACIDA INTRACELULAR (U/l) | | | | |
|------------------------------------|------------------|--------------------------|------------------|------------------|
| TIEMPO | CONTROL | LPS ($\mu\text{g/ml}$) | | |
| | | 100 | 200 | 500 |
| 6h | 41.22 \pm 2.20 | 32.22 \pm 2.90 | 37.64 \pm 7.00 | 39.16 \pm 1.80 |

La Tabla 26 muestra la ausencia de efecto de la endotoxina sobre la actividad de la fosfatasa ácida en el interior de los hepatocitos en cultivo.

3.5.3. Superóxido dismutasa (SOD) y capacidad oxidativa intracelular.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en los estudios *in vivo* (Resultados, apdo. 2.1), el análisis *in vitro* de este parámetro puede esclarecer si existe un efecto directo ejercido por la endotoxina sobre los hepatocitos o si por el contrario, es un efecto indirecto debido a los mediadores del shock.

Con este punto de vista se ha analizado la influencia de distintos tiempos de incubación con LPS (200 $\mu\text{g/ml}$), sobre la actividad de la SOD en hepatocitos en cultivo. El tiempo de incubación de 2h es el que manifiesta un aumento de actividad respecto a los controles (Fig. 53). En consecuencia la incubación con distintas dosis de endotoxina se llevó a cabo a dos tiempos diferentes (2 y 4 horas), manifestándose dos comportamientos distintos en lo que a actividad de SOD se refiere (Fig. 54).

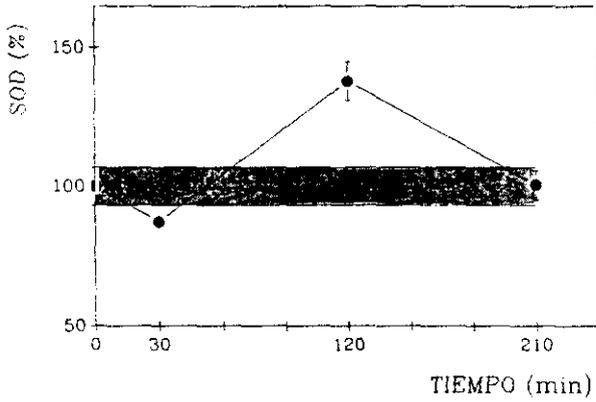


Figura 53: Efecto del tiempo de incubación con LPS (200µg/ml) (●), sobre la actividad intracelular de SOD en hepatocitos en cultivo. Los porcentajes se calculan respecto a los controles correspondientes a cada tiempo (■).

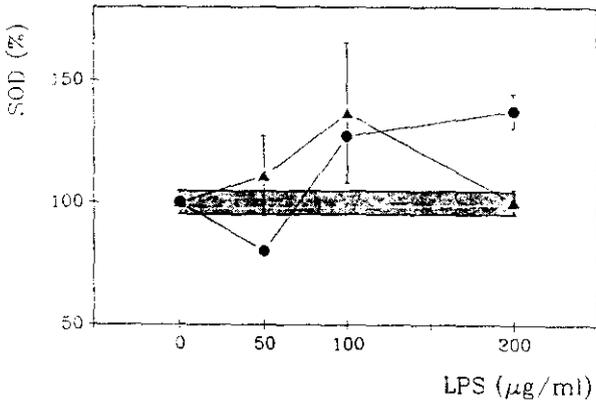


Figura 54: Efecto de diferentes dosis de LPS sobre la actividad intracelular de SOD en hepatocitos en cultivo, a 2 horas (●) ó 4 horas (▲) de incubación. Los porcentajes se calculan respecto a los controles correspondientes a cada tiempo (■).

La incubación durante 2 horas con la endotoxina, produce un efecto análogo al observado *in vivo* (Tabla 8), consistente en una disminución inicial ("fase aguda") de la actividad de SOD, que luego incrementa ("fase de recuperación") respecto a los controles.

Sin embargo, la incubación durante 4 horas con distintas dosis de LPS, determina una variación de la actividad de SOD que no puede considerarse significativa.

Seguidamente se llevó a cabo el estudio de la influencia de distintas sales biliares sobre la actividad de SOD, de modo análogo a lo realizado con la GK (Fig. 52). Los resultados se expresan en la Figura 55 e indican que las sales biliares estudiadas disminuyen considerablemente la actividad de SOD, efecto contrario al ejercido por el LPS (200 μ g/ml) a las 2 horas de incubación. Además, se observa de nuevo que el tratamiento de los hepatocitos en cultivo con sales biliares y endotoxina simultáneamente, anula el efecto de este último, manifestándose únicamente la influencia de la sal biliar.

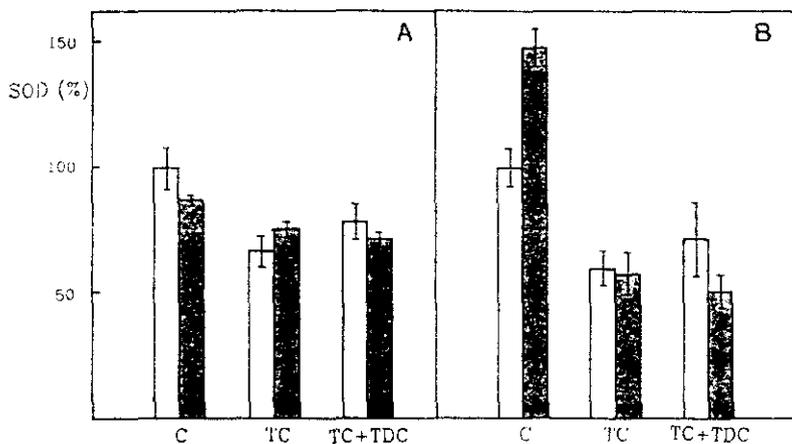


Figura 55: Efecto del tiempo de incubación con LPS y/o distintos tipos de sales biliares, sobre la actividad intracelular de SOD en hepatocitos en cultivo. Los porcentajes se calculan respecto a la actividad de SOD de las monocapas control (=100%). (A) 30min (B) 120min.

TC=Taurocolato sódico 2mM TDC=Taurodesoxicolato sódico 2mM TC+TDC=Mezcla fisiológica.
 □ Ausencia de LPS ■ Presencia de LPS.

Por otra parte, se ha realizado un estudio análogo con suspensiones de NPc enriquecidas en células de Kupffer y mediante la técnica de citometría de flujo. La sonda utilizada es el DCFH (diclorofluoresceína), que en presencia de radicales superóxido se oxida y se hace fluorescente. El tratamiento con LPS (10 μ g/ml) da lugar a un incremento del número de células que presentan elevados niveles de O₂ (Fig. 56a y b). La Figura 56a pone de manifiesto

RESULTADOS

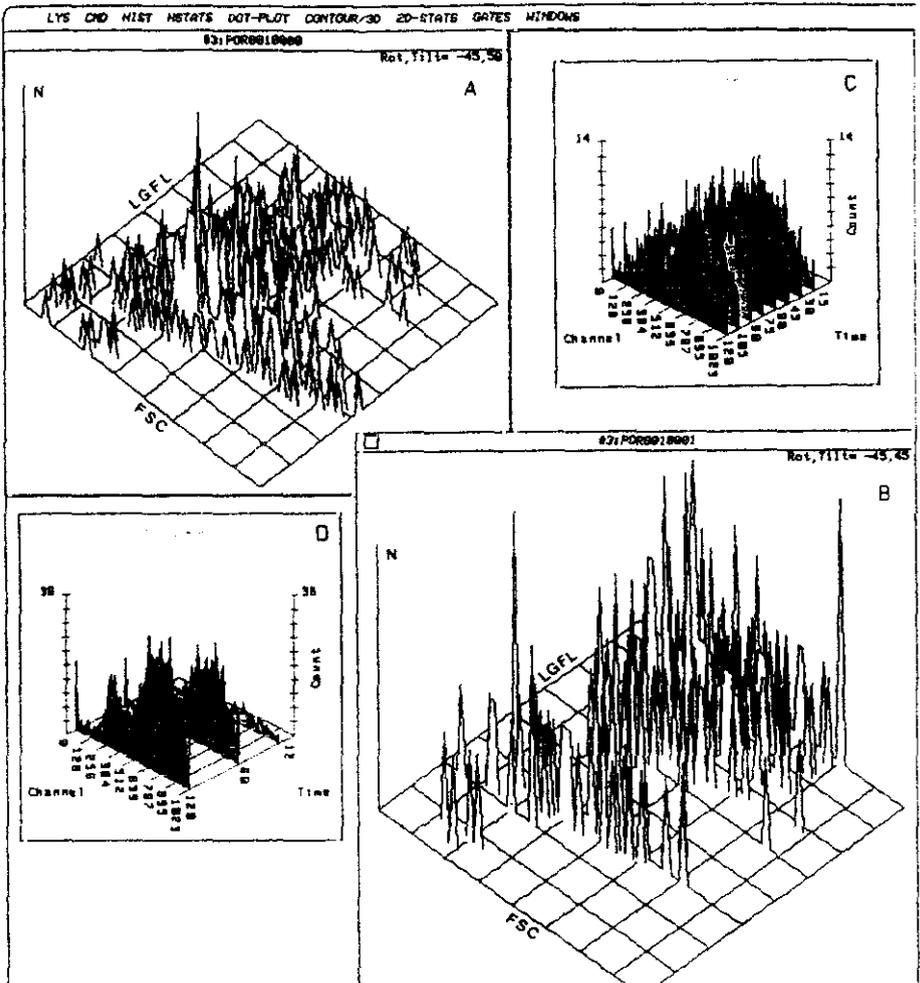


Figura 56a: Representación tridimensional del efecto de la adición de LPS (10µg/ml), sobre la intensidad de fluorescencia emitida por suspensiones de NPC enriquecidas en células de Kupffer y preincubadas con DCFH (30min/37°C).
 (A) Controles (B) LPS 5 segundos
 (C) Efecto del LPS a lo largo del tiempo
 (D) Efecto del LPS a los 12, 60 y 120 segundos
 En los ejes se representa N (nº de células), LGFL (Logaritmo de la intensidad de fluorescencia) y FSC (Tamaño celular)
 Count = nº de células Chanel = Intensidad de fluorescencia

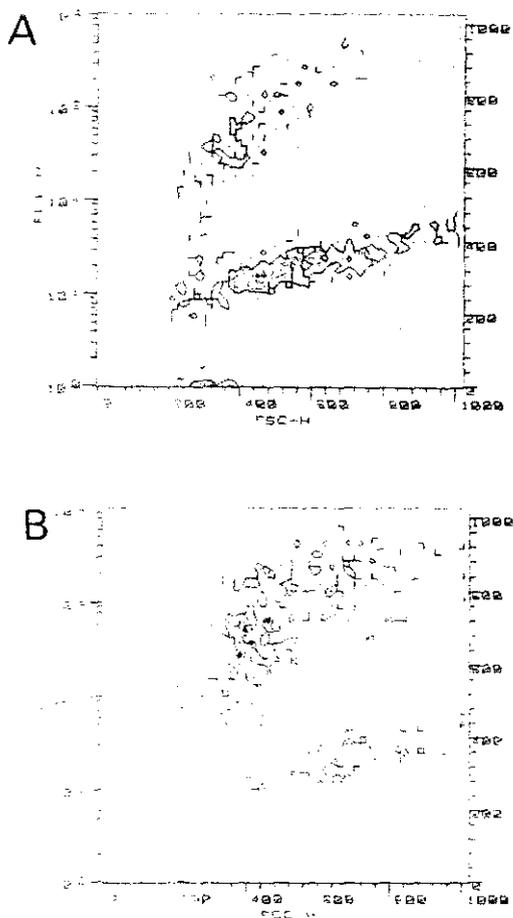


Figura 56b: Representación bidimensional del efecto de la adición de LPS ($10\mu\text{g/ml}$), sobre la intensidad de fluorescencia emitida por suspensiones de NPc enriquecidas en células de Kupffer y preincubadas con DCFH (30min/ 37°C).
 (A) Controles (B) LPS 2 minutos
 En los ejes se representa FL (Intensidad de fluorescencia) frente a FSC (Tamaño celular)

que dicho incremento es muy rápido pues ya se aprecia a los 5 segundos de la adición del LPS a las NPc (paneles A y B), siendo el efecto mayor a medida que aumenta el tiempo de incubación (paneles C y D). En la *Figura 56b* se observa claramente la existencia de dos poblaciones con distinta capacidad oxidativa intracelular (distinta intensidad de fluorescencia debida al DCF). En el caso de los controles (panel A) la población mayoritaria emite una baja intensidad de fluorescencia y tras 2 minutos de incubación con LPS (10 μ g/ml) (panel B) dicha población pasa a emitir una mayor intensidad de fluorescencia (mayor capacidad oxidativa intracelular).

3.5.4. Peroxidación lipídica.

La comparación de los resultados obtenidos *in vivo* al estudiar la peroxidación lipídica en el *shock* endotóxico reversible (*Resultados, apdo. 2.2.*), con los que se indican a continuación obtenidos *in vitro*, permitirá discutir si las alteraciones apreciadas son debidas o no a un efecto directo ejercido por el LPS.

El análisis de los niveles de MDA en cultivos de hepatocitos tratados con distintas dosis de endotoxina y durante distintos tiempos, queda reflejado en la *Figura 57*.

Se observa que la gráfica relativa al LPS 50 es análoga a la obtenida *in vivo* (*Fig. 17*). Sin embargo, al ir aumentando la dosis, el comportamiento se va alejando del observado *in vivo* ya que para las dosis LPS 100 y LPS 200, los niveles de MDA a las 4 y 6 horas de incubación son prácticamente control; siendo las características de la gráfica completamente diferentes para la dosis de LPS 500.

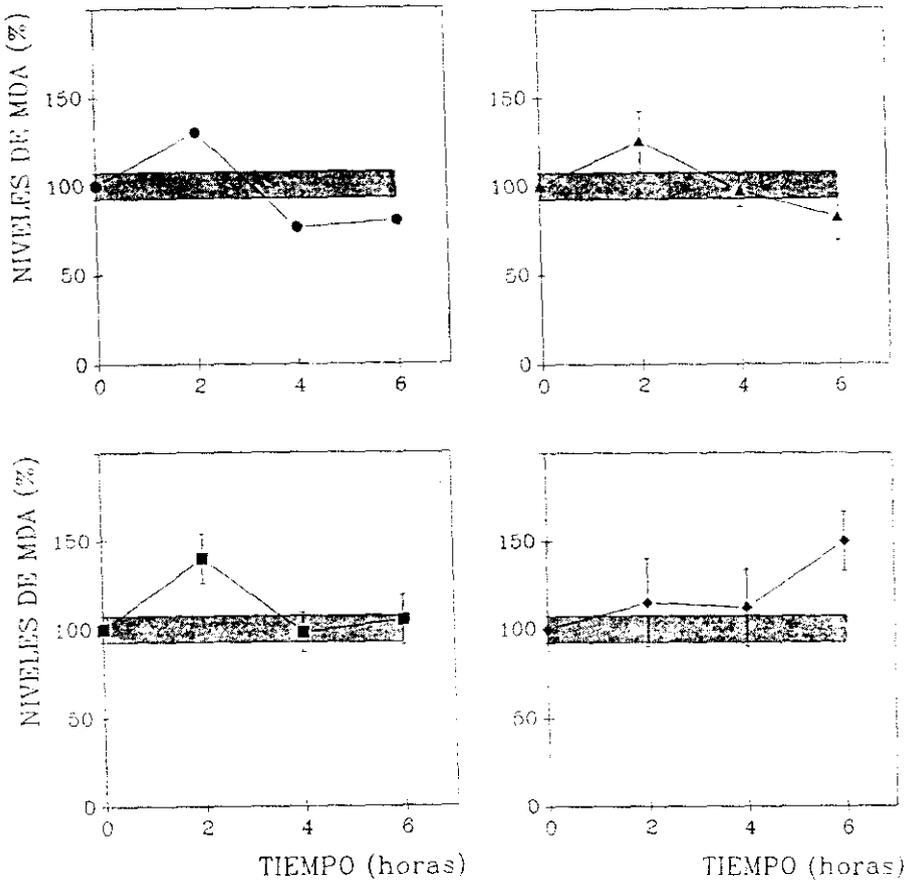


Figura S7: Efecto de distintas dosis de LPS (● LPS 50, ▲ LPS 100, ■ LPS 200 y ◆ LPS 500) sobre los niveles intracelulares de MDA en hepatocitos en cultivo. Los porcentajes se calculan respecto a los controles correspondientes a cada tiempo (▨).

3.5.5. Niveles de citocromo b_5 .

La disminución observada en los niveles de citocromo P450 en monocapas de hepatocitos tratadas con lipopolisacárido parece deberse a una acción directa de la endotoxina sobre las células parenquimatosas (Pagani *et al.*, 1987).

Con intención de realizar un análisis paralelo respecto a la influencia del LPS en los niveles de citocromo b_5 , se ha llevado a cabo la valoración de dichos niveles en monocapas no replicativas de hepatocitos en cultivo, tras el tratamiento con distintas dosis de endotoxina.

Los resultados obtenidos con estos experimentos *in vitro* (Fig. 58), concuerdan con los obtenidos *in vivo* (Resultados, apdo. 2.3.), confirmando que durante el *shock* endotóxico se produce en el parénquima hepático una elevación de la concentración de citocromo b_5 .

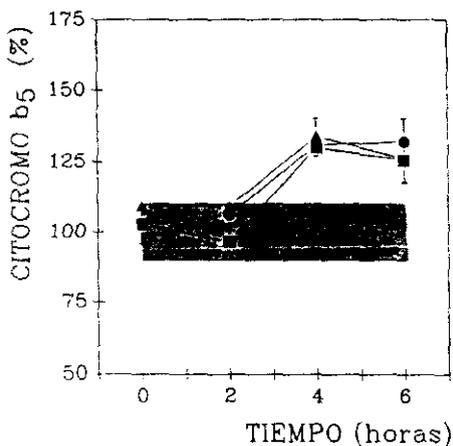


Figura 58: Efecto de distintas dosis de LPS (● LPS 100, ▲ LPS 200, ■ LPS 500) sobre los niveles de citocromo b_5 en hepatocitos en cultivo. Los porcentajes se calculan respecto a los controles correspondientes a cada tiempo (■).

3.5.6. Concentración de calcio citosólico.

Durante la endotoxicosis, el LPS bacteriano se une a la membrana plasmática celular, interfiriendo en los mecanismos de transducción de señales e induciendo perturbaciones de procesos intracelulares y metabólicos (Pagani *et al.*, 1981; Pagani *et al.*, 1985; Portolés *et al.*, 1987; Pagani *et al.*, 1988).

Dado que la respuesta de muchos tipos celulares frente a estímulos extracelulares implica un aumento de la concentración de calcio citosólico libre (Rasmussen & Barret, 1984), se ha procedido a estudiar la influencia que ejerce la endotoxina sobre la homeostasis del calcio en distintos tipos celulares hepáticos (hepatocitos aislados y en cultivo primario, y suspensiones enriquecidas en células de Kupffer).

a) Espectrofluorimetría

Cuando las células parenquimatosas aisladas, preincubadas con fura-2, son sometidas a un tratamiento con LPS ($100\mu\text{g}/10^6\text{ Pc}/0.5\text{ml}$) a 37°C , durante distintos tiempos, se observa (Fig. 59) un incremento tiempo-dependiente del contenido de calcio citosólico, alcanzando éste valores dos veces superiores a los control, tan sólo a los 15min de incubación con la endotoxina.

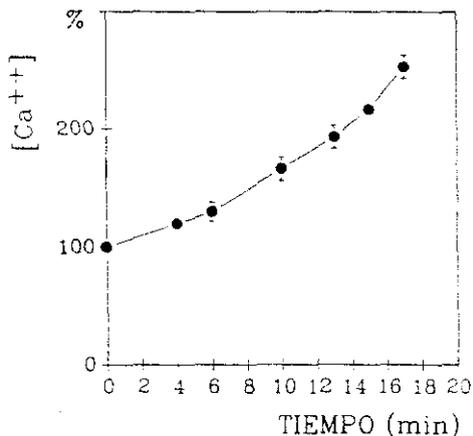


Figura 59: Efecto del LPS sobre la concentración de calcio citosólico en hepatocitos aislados.

Las células, tras la incorporación de la sonda fura-2, son incubadas a 37°C con o sin LPS ($100\mu\text{g}/10^6\text{ Pc}$) durante distintos tiempos. Los porcentajes se calculan respecto a la $[\text{Ca}^{++}]$ citosólico de las células control.

El tratamiento de hepatocitos en suspensión con dosis diferentes de endotoxina, durante 10min a 37°C , produce de nuevo un incremento de la concentración de calcio citosólico, que es directamente dependiente de la dosis de LPS utilizada (Tabla 27).

Tabla 27: Efecto de distintas dosis de LPS sobre la concentración de calcio citosólico en hepatocitos aislados.

Las células, tras la incorporación de la sonda fura-2, son incubadas a 37°C en presencia o ausencia de LPS (100 y 200 µg/10⁶ Pc) durante 10 min.

| TRATAMIENTO | [Ca ⁺⁺] CITOSOLICO (nM) |
|-------------|-------------------------------------|
| Control | 123 ± 6 |
| LPS 100 | 156 ± 8 |
| LPS 200 | 267 ± 8 |

Con el fin de conocer si el incremento producido por la endotoxina en la [Ca⁺⁺] citosólico procede de Ca⁺⁺ extracelular o de la movilización de las reservas intracelulares, o de ambos, hepatocitos en cultivo primario en monocapa fueron preincubados con fura-2 y posteriormente tratados con LPS (100 µg/ml), bien en tampón con calcio o bien en tampón sin calcio y con EGTA (0.2 mM) (30 min/37°C). La *Tabla 28* muestra los resultados obtenidos, que concuerdan con los anteriores relativos a células aisladas, observándose de nuevo un considerable incremento (335%) de la [Ca⁺⁺] citosólico en las monocapas tratadas con LPS respecto a las control. Además, este efecto se observa tanto en presencia como en ausencia de calcio extracelular, siendo en este último caso inferior el aumento observado de los niveles de calcio citosólico (212%).

Tabla 28: Efecto del LPS sobre la movilización de calcio intracelular en hepatocitos en cultivo.

Las monocapas, tras la incorporación de la sonda fura-2, son incubadas a 37°C en presencia o ausencia de LPS (100 µg/10⁶ Pc) durante 30 min; en medio con calcio o sin calcio y con EGTA (0.2 mM).

| MEDIO | TRATAMIENTO | [Ca ⁺⁺] CITOSOLICO | |
|------------|-------------|--------------------------------|---------|
| | | (nM) | (%) |
| Con calcio | Control | 143 ± 2 | 100 ± 1 |
| | LPS100 | 479 ± 6 | 335 ± 4 |
| Sin calcio | Control | 147 ± 3 | 100 ± 2 |
| | LPS100 | 311 ± 3 | 212 ± 2 |

b) Citometría de flujo.

Los resultados obtenidos en el apartado anterior han sido ratificados mediante la técnica de citometría de flujo utilizando la sonda Indo-1. En las Figuras 60 y 61 se representa, en el panel A, la intensidad de fluorescencia emitida por los hepatocitos a 422nm (indo unido a calcio) frente a la emitida a 488nm (indo libre de calcio). El panel B corresponde a la representación del número de células N frente a la intensidad de fluorescencia emitida a 422nm (indo unido a calcio). En esta representación se observan tres poblaciones celulares con distinto contenido en calcio citosólico. Dichas poblaciones se han identificado como *negativa* (-), *positiva* (+) y *muy positiva* (++) en orden creciente de intensidad de fluorescencia a $\lambda_{em} = 422\text{nm}$. En porcentajes está indicada la cantidad de células de cada población.

El tratamiento con LPS (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) (Fig. 61) produce un incremento en el porcentaje de la población ++ (21% \rightarrow 32%), indicando un aumento en la concentración de calcio citosólico. Por otra parte, el incremento observado en la población - (16% \rightarrow 25%) corresponde a una pérdida de la sonda intracelular consecuencia de la alteración que el LPS produce en la membrana plasmática.

En el caso de las células de Kupffer, se ha llevado a cabo un estudio paralelo. Las suspensiones de NPC enriquecidas en macrófagos y obtenidas por tripsinización de cultivos (48h), han sido incubadas (15min/37°C) con distintas dosis de LPS (10 y 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Los resultados no muestran diferencias significativas entre los controles y los tratados con LPS.

Sin embargo, se ha observado que la adición de endotoxina a la suspensión de células produce un aumento instantáneo de los niveles de calcio citosólico, que vuelven inmediatamente a los valores control.

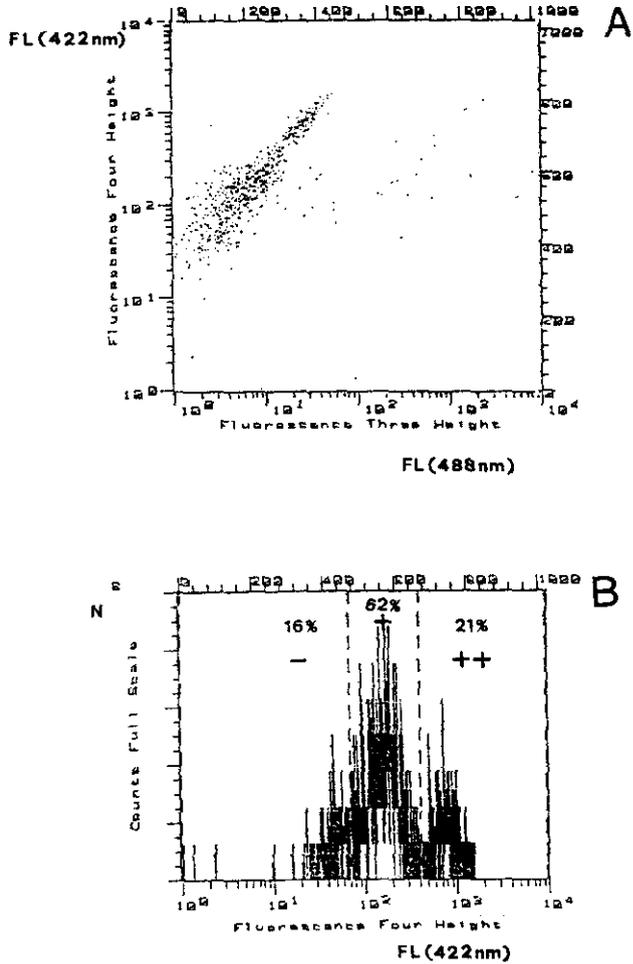


Figura 60: (A) Intensidad de fluorescencia emitida a $\lambda=422\text{nm}$ (Indo unido a calcio) frente a la intensidad de fluorescencia emitida a $\lambda=488\text{nm}$ (Indo libre), por hepatocitos en suspensión.
 (B) Número de hepatocitos (N) frente a la intensidad de fluorescencia emitida a $\lambda=422\text{nm}$.
 Los porcentajes indican la cantidad relativa de células de cada población (-, + y ++).

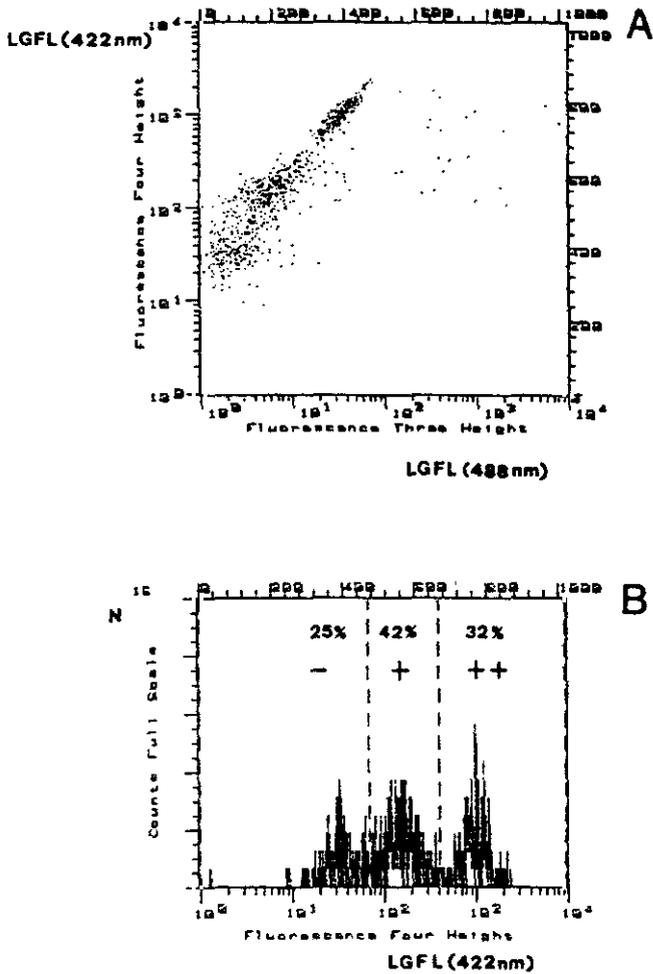


Figura 61: (A) Intensidad de fluorescencia emitida a $\lambda = 422\text{nm}$ (Indo unido a calcio) frente a la intensidad de fluorescencia emitida a $\lambda = 488\text{nm}$ (Indo libre), por hepatocitos en suspensión tratados con LPS (100 $\mu\text{g/ml}$) (30min/37°C).

(B) Número de hepatocitos (N) frente a la intensidad de fluorescencia emitida a $\lambda = 422\text{nm}$. Los porcentajes indican la cantidad relativa de células de cada población (-, + y ++).

3.5.7. pH intracelular.

La dishomeostasis celular inducida por la endotoxina puede alterar el pH_i, parámetro de notable interés en la regulación de procesos metabólicos, por lo que se ha procedido a su estudio en hepatocitos en cultivo incubados o no con LPS.

El pH_i se ha medido utilizando la sonda fluorescente BCECF, requiriendo el procedimiento fluorimétrico de un calibrado intracelular realizado con soluciones tamponadas a distintos pHs y que contienen nigericina (12.5 μM) (*Materiales y Métodos, apdo. 15*). Los valores obtenidos para la relación $R = F_{500}/F_{450}$ durante el proceso de calibrado, tanto en monocapas control como en las tratadas con LPS, se indican en la *Figura 62*.

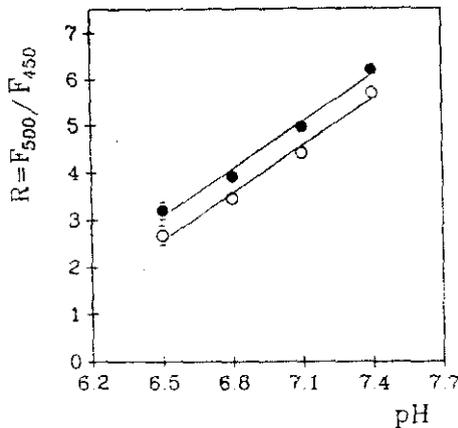


Figura 62: Calibrado intracelular de la relación $R = F_{500}/F_{450}$ en monocapas de hepatocitos marcadas con la sonda fluorescente BCECF y tratadas (●) o no (○) con LPS.

Se puede apreciar que en el intervalo de pH comprendido entre 6.6 y 7.5, existe linealidad entre R y el pH_i.

La interpolación de los valores de R obtenidos con las monocapas de hepatocitos control y tratados con LPS en la recta de calibrado correspondiente, permite determinar en cada caso el pH intracelular (*Tabla 29*). La endotoxina produce una disminución muy significativa del pH_i de los hepatocitos, disminución que además es tiempo-dependiente.

Tabla 29: Efecto del LPS sobre el pH_i de hepatocitos en cultivo.

Las monocapas, tras ser incubadas en presencia o ausencia de LPS (100µg/ml) a 37°C durante 10 y 45min, son marcadas con la sonda fluorescente BCECF para la posterior medida espectrofluorimétrica del pH_i,

| TRATAMIENTO | pH _i |
|-------------|-----------------|
| Control | 7.46 ± 0.01 |
| LPS (10min) | 7.14 ± 0.04 |
| LPS (45min) | 7.08 ± 0.01 |

3.6. INTERACCION CELULAS NO PARENQUIMATOSAS ↔ CELULAS PARENQUIMATOSAS.

La acción de la endotoxina sobre el parénquima hepático puede estar modulada por los mediadores producidos por las células de Kupffer. Para comprobarlo se han incubado los cultivos de células no parenquimatosas hepáticas enriquecidos en macrófagos de Kupffer, en presencia o ausencia de LPS (100µg/ml) durante distintos tiempos. Los sobrenadantes obtenidos son utilizados para el tratamiento posterior de Pc en cultivo. El parámetro elegido para la estimación de la lesión celular en los hepatocitos es la actividad de la GOT, característica del parénquima hepático. Además, la actividad extracelular de esta enzima no se ve alterada significativamente por la acción directa del LPS sobre los hepatocitos (Pagani *et al.*, 1987) por lo que cualquier modificación en este sentido, será debida a la presencia de mediadores secretados por los macrófagos.

En la *Tabla 30* se pone de manifiesto que las Pc tratadas con sobrenadantes de NPC, presentan mayor actividad extracelular de GOT sobre todo en el caso de que los sobrenadantes procedan de macrófagos incubados con LPS.

Tabla 30: Efecto indirecto del LPS sobre la actividad extracelular de GOT en hepatocitos en cultivo. El sobrenadante de cultivos enriquecidos en macrófagos de Kupffer, preincubados en presencia o ausencia de LPS (100µg/ml) (2h/37°C), es utilizado como medio de incubación con hepatocitos en cultivo (4h/37°C). Finalmente se valora la actividad extracelular de GOT en esos cultivos de Pc.

| GOT (U/l) | | |
|-----------------------|---------------------------|--------------|
| Tratamiento de las Pc | Pretratamiento de las NPc | |
| | CONTROL | LPS 100 |
| Medio | 34.77 ± 0.65 | 39.82 ± 3.42 |
| Sobrenadante NPc (2h) | 66.92 ± 0.00 | 81.48 ± 3.43 |

A medida que aumenta el tiempo de preincubación de las NPc con la endotoxina, disminuye el efecto inductor que esos sobrenadantes ejercen sobre la actividad extracelular de GOT en los cultivos de hepatocitos (Tabla 31).

Tabla 31: Efecto indirecto del LPS sobre la actividad extracelular de GOT en hepatocitos en cultivo. El sobrenadante de cultivos enriquecidos en macrófagos de Kupffer, preincubados en presencia o ausencia de LPS (100µg/ml) durante distintos tiempos (2h, 4h y 6h) a 37°C, es utilizado como medio de incubación con hepatocitos en cultivo (6h/37°C). Finalmente se valora la actividad extracelular de GOT en esos cultivos de Pc.

| GOT (U/l) | | |
|-----------------------|---------------------------|--------------|
| Tratamiento de las Pc | Pretratamiento de las NPc | |
| | CONTROL | LPS 100 |
| Sobrenadante NPc (2h) | 63.72 ± 7.38 | 86.93 ± 6.63 |
| Sobrenadante NPc (4h) | 73.78 ± 1.72 | 82.37 ± 3.73 |
| Sobrenadante NPc (6h) | 72.07 ± 0.00 | 78.37 ± 6.32 |

Por otra parte, si tras dar un pulso a las NPc (2h/37°C) con LPS (100µg/ml), este medio se sustituye por medio carente de endotoxina (48h/37°C), los sobrenadantes obtenidos (no tienen LPS) no muestran efecto sobre la liberación de GOT por hepatocitos en cultivo (40.67 ± 1.20 U/l).

Se ha comprobado que el medio de cultivo de las NPc (2/3 DMEM + 1/3 RPMI) no afecta al metabolismo de los hepatocitos, normalmente incubados con William's; como queda demostrado con los resultados de incorporación de [14 C]-2-desoxiglucosa por Pc incubados con distintos medios de cultivo (Tabla 32).

Tabla 32: Incorporación de [14 C]-2-desoxiglucosa por hepatocitos incubados con distintos medios de cultivo.

| INCORPORACION DE [14 C]-2-DESOXIGLUCOSA (nmoles/ 10^6 Pc) | | | | |
|---|--------|----------------------------------|------------------|------------------|
| Medio | Tiempo | Concentración de 2-desoxiglucosa | | |
| | | 0.25mM | 0.50mM | 1.00mM |
| William's E | 2h | 17.39 \pm 1.31 | 25.64 \pm 2.03 | 51.34 \pm 2.46 |
| | 4h | 23.40 \pm 1.33 | 28.16 \pm 4.00 | 53.66 \pm 9.33 |
| 2/3 DMEM + 1/3 RPMI | 2h | 18.20 \pm 2.13 | 29.26 \pm 0.83 | 44.66 \pm 2.16 |
| | 4h | 27.30 \pm 1.53 | 36.60 \pm 3.90 | 64.83 \pm 9.66 |

IV. DISCUSION.

Desde que Morrison y Ulevitch en 1978 realizaron un profundo estudio del efecto de las toxinas bacterianas sobre el organismo, concluyendo que las endotoxinas producen graves alteraciones en los sistemas de coagulación y complemento y que actúan sobre distintos blancos celulares, se han usado endotoxinas bacterianas aisladas para intentar esclarecer la fisiopatología del *shock*. Concretamente se ha desarrollado una amplia labor de investigación basada fundamentalmente en estudios de modelos experimentales de *shock*.

En la actualidad, las dos áreas de investigación de mayor interés incluyen el estudio de las interacciones entre los distintos órganos y tejidos afectados (*modelos in vivo*) y la identificación de los procesos moleculares primarios implicados en la acción directa de las endotoxinas sobre células y sistemas de membrana celulares (*modelos in vitro*).

De acuerdo con esto, los modelos experimentales de estudio utilizados en el presente trabajo han sido dos: modelo *in vivo*, mediante la inducción de un estado de *shock* endotóxico reversible y modelo *in vitro*, que implica la utilización de distintos tipos celulares hepáticos.

I. ACCION DEL LPS *IN VIVO*. MODELO DE *SHOCK* ENDOTOXICO REVERSIBLE.

Se ha inducido en ratas un estado de *shock* endotóxico reversible mediante la inyección intravenosa de una dosis subletal de LPS, que produce un estado de *shock* agudo entre las 4 y 6 horas, con todos los síntomas clínicos del *shock* (piloerección, sed, aumento de la temperatura corporal y pérdida de peso), síntomas que desaparecen cuando el animal entra en la fase de recuperación (24-72h).

La reversibilidad del proceso permite un estudio preciso de los daños producidos por el lipopolisacárido (LPS), sin que se solapen alteraciones ocasionadas por el fracaso general del organismo, fracaso que tiene lugar en las situaciones de *shock irreversible*.

De este modo, el seguimiento de las alteraciones macroscópicas y microscópicas de los distintos órganos y de las alteraciones paralelas de algunos parámetros bioquímicos (niveles séricos de glucosa, albúmina y glutamato oxalacetato transaminasa) (Fig. 16), puede considerarse un índice de la afectación y recuperación de los animales tratados, confirmando la validez de este modelo experimental (Bosch et al., 1988).

Su utilización ha permitido el estudio de distintos parámetros (actividad de la superóxido dismutasa, peroxidación lipídica y niveles de citocromo b₅) que pueden ser decisivos en la afectación hepática durante las sucesivas fases del *shock* (aguda y de recuperación); aportándose nuevos datos para el esclarecimiento de las primeras etapas de la endotoxiosis.

1.1. SUPEROXIDO DISMUTASA (SOD).

Los radicales derivados del oxígeno, generados principalmente por células fagocíticas tras una activación inducida por distintos estímulos, pueden ser a su vez los inductores de lesiones tisulares durante la sepsis o *shock* endotóxico (Fantone & Ward, 1982; Flohé & Giertz, 1987). La activación de las células fagocíticas aumenta su consumo de oxígeno, activa el *shunt* hexosa monofosfato e induce la actividad NAD(P)H oxidasa (Klebanoff, 1980). Como resultado se producen y liberan el anión superóxido (O_2^-), el singlete de oxígeno (1O_2), el radical hidroxilo (OH^\cdot) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2). La liberación de O_2^- , OH^\cdot y H_2O_2 por macrófagos y neutrófilos polimorfonucleares, está asociada con mecanismos antimicrobianos (Klebanoff, 1980) pero estos metabolitos pueden convertirse, si aumentan sus niveles, en tóxicos para tejidos como pulmón, riñón, intestino e hígado (Fantone & Ward, 1982; Maunder et al., 1988).

El modelo de *shock* endotóxico reversible permite observar (Tabla 8) un comportamiento bifásico que implica la disminución de la actividad de la SOD en un 50% (que puede correlacionarse con una elevación de los niveles de O_2^-) durante la fase aguda del *shock*; para luego no sólo revertir el efecto, sino aumentar por encima de los controles dicha actividad de SOD (fase de recuperación, 24h). De hecho, durante el estado inicial de una infección, los macrófagos están hiperactivados (Discusión, apdo. 2.4.1.) y liberan elevados niveles de radicales libres de oxígeno, que no sólo poseen un efecto bactericida sino que también afectan a tejidos adyacentes (Weisger, 1986). Debido a ello, tras la inicial inmunopotenciación, tiene lugar una inmunosupresión (Prasad et al., 1990).

Existe, por tanto, una clara concordancia entre estos resultados y la reducción de la necrosis hepática y la mortalidad de ratas en estado de *shock* endotóxico irreversible, demostrada tras el tratamiento con SOD y catalasa (Arthur et al., 1985; Kunimoto et al., 1987; Schneider & Mathiesen, 1990).

Las causas de este efecto observado *in vivo* pueden ser:

- Una acción directa del LPS sobre las células hepáticas. Los principales blancos celulares del LPS en el hígado son los macrófagos de Kupffer, que captan la endotoxina mediante pinocitosis adsorptiva (Mathieson & Ulevitch, 1979; Fox et al., 1987) o vía un receptor específico (Van Bossuyt & Wisse, 1988). También se ha demostrado que el LPS se une a los hepatocitos (Pagani et al., 1981; Praaning Van-Dalen et al., 1981; Pagani et al., 1988) por lo que igualmente podría tener lugar un efecto citotóxico directo de la endotoxina sobre las células parenquimatosas hepáticas. Esto no estaría de acuerdo con lo concluido en estudios *in vivo* por Bautista et al. (1990) acerca de una intervención exclusiva de las células de Kupffer y PMN infiltrados, en lo que a liberación de O_2^- se refiere, como respuesta a la inyección de LPS. Sin embargo, los hepatocitos sí intervienen en este aspecto (Discusión, apdo. 2.5.2.).

- Una acción indirecta que implique la actuación de citoquinas (IL-1, TNF) (Visner et al., 1990) o la liberación por los hepatocitos de una proteína de fase aguda identificada como proteína capaz de unir el LPS (LBP) (Tobias et al., 1986) y que aumenta la unión de la endotoxina a los macrófagos *in vitro* (Warren et al., 1988; Wright et al., 1989).

Con el fin de distinguir entre ambas causas, se han llevado a cabo estudios *in vitro* que han demostrado la existencia de un efecto directo del LPS sobre los distintos tipos celulares hepáticos (Discusión, apdo. 2.5.2.).

1.2. PEROXIDACION LIPIDICA.

Un incremento en la formación de radicales libres da lugar a alteraciones en el metabolismo y en la funcionalidad celular como consecuencia de su acción a tres niveles fundamentales (Slater, 1984; Inauen et al., 1989):

- Reacción con proteínas que contienen grupos -SH dando lugar a entrecruzamientos proteína-lípido (Steinbrecher, 1987).
- Modificaciones de ácidos nucleicos (Moody & Hassan, 1982) o ruptura de la hebra de DNA (Brawn & Fridovich, 1981).
- Peroxidación lipídica (Comporti, 1985), que compromete la integridad de las membranas (Sevanian & Kim, 1985) y daña también orgánulos subcelulares (Peters et al., 1985).

El análisis de la peroxidación lipídica en el estudio de los efectos celulares del LPS, es esencial debido a la importancia de los sistemas de membrana en el correcto metabolismo celular. Se ha sugerido (Watanabe et al., 1990) que existen dos posibles factores mediante los cuales los radicales libres alteran la estructura de los fosfolípidos de la membrana celular: la concentración intracelular de calcio y la peroxidación lipídica. Ambos factores actúan independiente pero sinérgicamente (Bors et al., 1990). El primero se analiza en este trabajo (Discusión, apdo. 2.5.5.), demostrándose un incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ como consecuencia del tratamiento directo de hepatocitos con LPS. El segundo, se ha estudiado tanto en el modelo de shock endotóxico reversible *in vivo* (Resultados, apdo. 2.2.) como en el modelo *in vitro* (Resultados, apdo. 3.5.3.).

Los resultados *in vivo* indican un comportamiento bifásico consistente en un incremento de la peroxidación lipídica en la fase aguda del shock y una disminución por debajo de los niveles control en la fase de recuperación (Tabla 23). Ello concuerda con el comportamiento también bifásico de la actividad de la SOD durante el shock (Tabla 8), produciéndose un aumento del 38% en dicha actividad a las 24 horas de la inyección del LPS y una disminución también del 38% en los niveles de MDA durante esta fase de recuperación del shock. Todo induce a postular una relación causa-efecto entre radicales libres y peroxidación.

1.3. NIVELES DE CITOCROMO b_5 .

Existen evidencias que asocian un aumento de la peroxidación lipídica hepática *in vivo* con anomalías en el sistema vacuolar citoplasmático, concretamente con una reducción selectiva de los citocromos P450 y b_5 (Bacon *et al.*, 1986). Dicha reducción ha sido observada en el caso del P450, como consecuencia del tratamiento con LPS *in vivo* e *in vitro* (Pagani *et al.*, 1987; Bosch *et al.*, 1988). En relación con el citocromo b_5 y dada la gran importancia de su papel en el sistema de oxidasas de función mixta microsomal y de desaturación de ácidos grasos, se procedió a analizar si sus niveles experimentaban alguna alteración durante el shock endotóxico (Resultados, apdo. 2.3.), observándose (Fig. 18) un incremento de hasta un 35% respecto a los controles, en coincidencia con la fase aguda del shock (4-6h).

Por el contrario, los niveles de citocromo P450 exhiben una disminución progresiva que se mantiene incluso a las 72 horas de la inducción del shock (Bosch *et al.*, 1988). En este sentido, el LPS actúa probablemente impidiendo la unión de la proteína al grupo hemo o degradando dicho grupo hemo (Williams, 1985; Pagani *et al.*, 1987). Los radicales libres producidos por el LPS (Discusión, apdos. 1.1. y 2.5.2.) podrían estar alterando la estructura de la proteína (Steinbrecher, 1987).

La correlación positiva del cociente citocromo b_5 /citocromo P450 (Fig. 19), sugiere que el citocromo b_5 puede participar directamente en el proceso endotóxico. Esta hipótesis concuerda con el hecho de que el citocromo b_5 aumenta la oxidación dependiente de P450, de hepatotoxinas (De Marco & McCoy, 1985) ya que es capaz de transferir electrones directamente al P450 (Stabrook, 1984) y potenciar las reacciones de monooxigenación (Ingelman-Sundberg & Johansson, 1980; Jansson *et al.*, 1985; Patten *et al.*, 1986). Ello se ha observado no sólo en sistemas reconstituidos *in vitro* sino también en microsomas intactos (Noshiro *et al.*, 1981) y en células (Aoyama *et al.*, 1990). De este modo, durante la oxidación NADPH-dependiente de determinados sustratos, los niveles de citocromo P450 permanecen inalterados mientras que los de b_5 aumentan considerablemente (De Marco & McCoy, 1985).

El hecho de que el citocromo b_5 pueda recibir electrones tanto del NADH como del NADPH a través de las respectivas reductasas, dependiendo de la situación celular, sugiere que en la endotoxicosis dicho citocromo está suplementando al P450 de alguna manera, explicándose así que la concentración de éste último no vuelva a sus valores normales durante la fase de recuperación del shock reversible inducido experimentalmente.

Otros estudios han indicado que la administración de endotoxina *in vivo*, va acompañada de una disminución en el contenido hepático microsomal de citocromo b_5 (Morgan, 1989). Sin embargo dicha disminución no es estadísticamente significativa y se refiere a tiempos superiores a las 6 horas tras la inyección del LPS.

Puesto que la respuesta *in vivo* implica factores extrahepáticos que pueden modificar los niveles de citocromo b_5 , se han utilizado monocapas de hepatocitos en cultivo para comprobar la acción directa del LPS en las alteraciones de este citocromo (Discusión, apdo. 2.5.5.).

2. ACCION DEL LPS *IN VITRO*. UTILIZACION DE DISTINTOS TIPOS CELULARES HEPATICOS.

Los estudios *in vivo*, que proporcionan una aproximación importante en el conocimiento de las alteraciones fisiopatológicas de los estados de *shock*, no permiten distinguir, dada la complejidad del proceso, entre las causas primarias de la acción de las endotoxinas y las secundarias producidas por la liberación de mediadores y/o estados de hipoxia.

En los últimos 30 años las investigaciones sobre el *shock* endotóxico han prestado especial atención a las alteraciones celulares (Williamson *et al.*, 1970; Altura *et al.*, 1983) ya que es el grado de lesión celular el que determina la irreversibilidad del *shock* (Sayeed, 1983).

El estudio a nivel celular y subcelular requiere la puesta a punto de modelos experimentales *in vitro* que incluyen el aislamiento de poblaciones celulares puras y el cultivo primario o a largo plazo de dichas células. Esta aproximación experimental permite simplificar el sistema y es la que se ha utilizado mayoritariamente en el presente trabajo.

El aislamiento y caracterización morfológico-funcional de las células del parénquima hepático o hepatocitos (Pc) se ha realizado en estudios previos, que demostraron la existencia de una correcta correlación entre ambos aspectos celulares (Pagani *et al.*, 1983).

La obtención de células no parenquimatosas hepáticas libres de Pc es difícil, dada la inferioridad numérica de las primeras en el hígado. Por otra parte, la utilización de uno u otro método de aislamiento es decisiva si el objetivo final es el enriquecimiento de esa preparación en células de Kupffer, mediante su cultivo y la adherencia diferencial al sustrato.

El empleo de colagenasa durante el aislamiento celular, no ha permitido una purificación apreciable de los macrófagos hepáticos (Tabla 7). Sin embargo, la combinación colagenasa/pronasa introduce una marcada diferencia entre la capacidad de adhesión de Kc y Ec pudiendo obtenerse cultivos enriquecidos en células de Kupffer (Figs. 20, 21, 22, 23 y 24).

En la Tabla 33 se muestra el rendimiento celular obtenido por distintos procedimientos experimentales de aislamiento de NPc y purificación de macrófagos hepáticos. El método desarrollado en este trabajo permite obtener rendimientos más elevados (6.5×10^6 Kc/hígado) que los alcanzados por otros autores sin la técnica de *elutriación* como paso final de la purificación.

La caracterización morfológica de las células obtenidas, se ha llevado a cabo mediante microscopía óptica y electrónica, mostrando las características típicas de los macrófagos (Fig. 21), así como preservación en el cultivo de la ultraestructura celular intacta (Fig. 23). De hecho, las células recién sembradas presentan un elevado número de vacuolas (Fig. 22A), signo característico de células activadas, quizás como consecuencia del proceso de aislamiento. Este efecto revierte a las 48h de cultivo.

La correcta funcionalidad de los cultivos enriquecidos en células de Kupffer, se pone de manifiesto mediante las pruebas de tinción para peroxidasa (Figs. 20 y 23), característica de macrófagos (Wisse *et al.*, 1974; Wisse, 1977).

Tabla 33: Rendimiento celular obtenido por distintos métodos de aislamiento de NPC y purificación de células de Kupffer a partir de hígado de rata.

| AISLAMIENTO | PURIFICACION | $Kc \times 10^6$ /g hígado | Referencia |
|---|--|----------------------------|--|
| Colagenasa ^a | Centrifugación diferencial a baja velocidad | 4.0 | Doolittle & Richter (1981) |
| | Gradiente percoll + Adherencia diferencial | 4.8 | Smedsrød y Perloff (1985) |
| | Gradiente metrizamida + Adherencia diferencial | 6.5 | Steffan <i>et al.</i> (1986) |
| | Gradiente metrizamida + Elutriación | 8.0 | Knook <i>et al.</i> (1986) |
| Pronasa | Gradiente percoll + Adherencia diferencial | 8.0 | Munthe-Kaas <i>et al.</i> (1975) |
| | Gradiente metrizamida + Elutriación | 8.0 | Knook <i>et al.</i> (1977) |
| Pronasa fría ^b | Gradiente percoll + Elutriación | 6.5 | Praaning-Van Dalen (1982) |
| Colagenasa + pronasa ^c | Gradiente nycodenz + Elutriación | 7.0 | Van Bossuyt <i>et al.</i> (1988) |
| El rendimiento de adhesión al sustrato es (Van Bossuyt <i>et al.</i> , 1988): | | | |
| (a) 3.5×10^6 Kc/g hígado | | | |
| (b) 2.9×10^6 Kc/g hígado | | | |
| (c) 4.9×10^6 Kc/g hígado | | | |
| Número total de Kc por gramo de hígado | | 17.0 | Knook <i>et al.</i> (1977) Bouwens <i>et al.</i> (1986) |

La obtención de distintos tipos celulares hepáticos y su utilización tanto en suspensión como en cultivo, ha permitido analizar los siguientes aspectos en relación con la acción del LPS *in vitro*:

- Morfología de NPC.
- Localización ultraestructural e incorporación de la endotoxina en NPC.
- Propiedades físicas de la membrana plasmática.
- Funcionalidad de la membrana plasmática.
- Parámetros bioquímicos intracelulares.
- Interacción NPC \leftrightarrow Pc.

2.1. ALTERACIONES MORFOLOGICAS.

Estudios previos han demostrado mediante técnicas de microscopía óptica y electrónica que el tratamiento con LPS de las monocapas no replicativas de hepatocitos induce retracción citoplasmática (Pagani *et al.*, 1988). Un efecto análogo ha sido observado por Franceschi *et al.* (1989) en células del endotelio de la aorta como consecuencia de elevados niveles intracelulares de calcio. Este hecho parece estar relacionado también con la existencia de niveles anormalmente altos de radicales libres de oxígeno en dichas células, revirtiendo las

alteraciones morfológicas tras el tratamiento con SOD y catalasa. Por ello, se podría pensar que el LPS altera la morfología de los cultivos de hepatocitos como consecuencia de una rápida elevación de la concentración de calcio citosólico (*Discusión, apdo. 2.5.6.*) y/o un incremento de los niveles de radicales libres de oxígeno (*Discusión, apdo. 2.5.3.*).

En relación con las células no parenquimatosas, el tratamiento directo con LPS disminuye la adhesión al sustrato, incrementa la vacuolización, produce alteración de mitocondrias, dilatación de la membrana nuclear y aparición de numerosos autofagosomas (*Figs. 20, 21 y 24.*).

Las vacuolas pueden estar relacionadas con la fagocitosis de la endotoxina postulada en estas células (*Mathieson & Ulevitch, 1979; Fox et al., 1987*) y coincidente con lo observado mediante la técnica inmunocitoquímica del oro coloidal (*Discusión, apdo. 2.2.*).

Los autofagosomas, se relacionarían con las alteraciones mitocondriales observadas tras el tratamiento con la endotoxina, ya que aparecen a menudo figuras de mielina características de restos de membranas mitocondriales dañadas.

2.2. INCORPORACION Y LOCALIZACION INTRACELULAR DEL LPS.

En los hepatocitos, estudios de unión y desplazamiento con [¹⁴C]-LPS, revelan que la unión a la membrana celular no parece responder a la existencia de receptores funcionales específicos sino a interacciones físico-químicas con componentes particulares de la membrana (*Pagani et al., 1981; Praaning Van-Dalen et al., 1981; Pagani et al., 1988.*).

Los ensayos de unión del [¹⁴C]-LPS realizados en las células no parenquimatosas enriquecidas en células de Kupffer, ponen de manifiesto una incorporación de la endotoxina dependiente de la dosis (*Tabla 9*). En los macrófagos hepáticos, parece darse un mecanismo de pinocitosis adsorptiva (*Mathieson & Ulevitch, 1979; Fox et al., 1987*) para la incorporación del LPS. No obstante, algunos autores sugieren la existencia de receptores específicos de unión (*Van Bossuyt & Wisse, 1988*) aunque todavía no se ha aislado el posible receptor.

Con el fin de conocer la localización subcelular de la endotoxina en las células no parenquimatosas de forma paralela a lo ya realizado en Pc (*Municio et al., 1990; Diaz-Laviada et al., 1991*), se han llevado a cabo estudios inmunomarcaje con oro coloidal. Los resultados (*Figs. 25 y 26*) indican una incorporación de la endotoxina que ya se aprecia a los 15min de tratamiento y que está asociada a menudo a vacuolas. Sin embargo, en hepatocitos, a estos tiempos de incubación el LPS permanece fundamentalmente asociado a microvellosidades de la membrana plasmática, requiriendo su internación tiempos de incubación más largos.

Esto apoya la hipótesis de una fagocitosis del LPS por las células de Kupffer, mecanismo diferente al postulado para Pc. A los dos tiempos ensayados el LPS alcanza la membrana mitocondrial, que se encuentra desorganizada, induciéndose procesos de autofagocitosis tal como se apreciaba en los estudios morfológicos (*Discusión, apdo. 2.1.*).

2.3. PROPIEDADES FISICAS DE LA MEMBRANA PLASMATICA.

Los mecanismos primarios del *shock* endotóxico todavía no se conocen pero es indudable que la interacción del LPS con la superficie celular constituye la etapa inicial en el desarrollo de su acción.

Los parámetros elegidos para caracterizar las alteraciones que puede producir *in vitro* la endotoxina sobre las propiedades físicas de la membrana plasmática, son:

- 1) Liberación de LDH: la salida de esta enzima al medio está directamente relacionada con lesión de la membrana celular siendo un marcador de estados de citotoxicidad (Portolés *et al.*, 1987; Morel *et al.*, 1990; Ohia *et al.*, 1990).
- 2) Retención de fluoresceína en el interior celular: la utilización de los llamados sustratos fluorogénicos como el FDA, tiene un gran interés en estudios de viabilidad celular pues la retención del fluoróforo depende de la integridad de la membrana plasmática (Rotman & Papermaster, 1966).
- 3) Microviscosidad de la membrana plasmática: su análisis suministra información sobre la estructura y dinámica de la matriz lipídica de la membrana, parámetros ambos indispensables para la comprensión de cualquier fenómeno relacionado con las membranas biológicas (Shinitzky & Barenholz, 1978).

2.3.1. Liberación de LDH.

La interacción directa de la endotoxina con hepatocitos en cultivo produce un incremento, tiempo- y dosis-dependiente, en la actividad extracelular de LDH (Figs. 27), indicando una alteración de la membrana plasmática.

Por otra parte, cabe destacar la importancia que puede tener la LDH en estados de endotoxemia ya que esta enzima está implicada en la transformación reversible de piruvato a lactato. Dado que la acción del LPS induce lactoacidosis *in vivo* (Nishijima *et al.*, 1973) y que, en estudios previos con hepatocitos en suspensión se ha observado una disminución de la gluconeogénesis tras el tratamiento con endotoxina (Pagani *et al.*, 1985), puede pensarse en una alteración del metabolismo de hidratos de carbono en los hepatocitos que produzca un acúmulo anormal de piruvato. Este sería transformado posteriormente a lactato por la LDH y ello determinaría una disminución del pH, concordante con lo observado por otros autores *in vivo* (Nishijima *et al.*, 1973; Schumer, 1983). La posible disminución del pH, ha sido efectivamente puesta de manifiesto en el presente estudio con hepatocitos en cultivo, mediante técnicas fluorimétricas (Discusión, apdo. 2.5.7.) y prueba la existencia de un efecto directo de la endotoxina a este nivel.

2.3.2. Retención intracelular de fluoresceína.

En los estudios de viabilidad celular realizados con FDA sobre hepatocitos, se observa que el tratamiento con endotoxina (100 y 200 μ g/ml) (Tabla 10) produce un ligero aumento del número de células fluorescentes aunque éstas presentan una intensidad de fluorescencia considerablemente menor que las células control (Fig. 28). Una posible explicación de este aumento en el número de células con fluorescencia sería considerar que la unión LPS-membrana plasmática crea dominios hidrofóbicos en la membrana que facilitan la entrada del FDA. Esto está de acuerdo con la interacción del tipo lípido-lípido (lípido A-lípidos de la bicapa), que permite la unión de la endotoxina a liposomas artificiales y a membranas biológicas (Rietschel *et al.*, 1985). Por otra parte, también podría relacionarse con la unión inespecífica del LPS a la membrana plasmática de hepatocitos (Pagani *et al.*, 1985), que haría posible la existencia de estos dominios en cualquier zona de la membrana.

El aumento numérico de la viabilidad celular sería por tanto una consecuencia de la internación incrementada de la sonda. De hecho, cuando se utilizan dosis elevadas de endotoxina (1mg/ml) (Fig. 29), se produce una disminución considerable de la viabilidad, lo cual indica una alteración irreversible de la membrana plasmática que hace imposible la retención de fluoresceína en el interior de la célula. En este caso prevalece la alteración producida en la integridad de la membrana sobre la entrada facilitada de FDA, efectos ambos ejercidos por el LPS.

La disminución de la intensidad de fluorescencia emitida por los hepatocitos tratados con LPS y observada mediante microscopía óptica (Fig. 28) se confirma mediante citometría de flujo (Fig. 30). Esta disminución es tanto más elevada cuanto mayor es la dosis de endotoxina con que se incuba la suspensión de células (100, 200 y 500 μ g/ml) y puede ser debida fundamentalmente a dos causas:

- Una disminución de la concentración de fluoresceína presente en las células; lo cual implicaría que los hepatocitos tratados con endotoxina tienen una mayor dificultad para retener en su interior la fluoresceína. Esta sustancia polar no posee ningún transportador de membrana conocido, por lo que sólo un daño a nivel de membrana facilitaría la salida de dicho fluoróforo al medio.
- Una disminución de la intensidad de fluorescencia emitida por una misma concentración de fluoresceína presente en el interior de los hepatocitos. En este sentido se ha demostrado que el pH ejerce una notable influencia disminuyendo la intensidad de fluorescencia a medida que se acidifica el medio (Roman & Papermaster, 1966). De acuerdo con ésto, el LPS estaría disminuyendo el pH, de los hepatocitos.

La técnica espectrofluorimétrica, utilizando hepatocitos en cultivo, permite evaluar la fluorescencia procedente de la fluoresceína intracelular y la debida a la fluoresceína liberada al medio. Sirve por tanto para determinar si el descenso de la intensidad de fluorescencia en

el interior de los hepatocitos (Figs. 28 y 30), es o no debido a una salida facilitada del fluoróforo como consecuencia de lesiones en la membrana plasmática ocasionadas directamente por el LPS.

Los resultados representados en la Figura 32 ponen de manifiesto que las muestras preincubadas con la endotoxina emiten menor intensidad de fluorescencia que las control. Se comprueba por tanto, utilizando el modelo de cultivo primario de hepatocitos, lo ya observado con células en suspensión mediante las técnicas de microscopía y citometría de flujo. De nuevo la disminución de la intensidad de fluorescencia es directamente dependiente de la dosis de LPS empleada y además existe una dependencia respecto al tiempo.

Con relación a la liberación de fluoresceína al medio extracelular, se demuestra que es idéntica en los hepatocitos control y en los incubados con LPS, manteniéndose además constante a lo largo del tiempo ($\approx 10\%$ del máximo de intensidad de fluorescencia presente en el interior de las células) (Fig. 33). En consecuencia, la disminución de fluorescencia intracelular en los hepatocitos tratados, no se debe a un aumento de la salida del fluoróforo sino a la influencia del pH sobre la intensidad de fluorescencia emitida por la fluoresceína. Los estudios del pH intracelular llevados a cabo en hepatocitos en cultivo mediante técnicas espectrofluorimétricas, han puesto de manifiesto efectivamente una disminución en el pH, como consecuencia del tratamiento directo con endotoxina (Discusión, apdo. 2.5.6.).

Los resultados obtenidos sugieren, por tanto, que la interacción del LPS con la membrana de los hepatocitos favorece la entrada de la molécula apolar FDA en la célula, posiblemente aumentando la hidrofobicidad de la zona externa de la membrana y creando dominios lipofílicos que facilitan inespecíficamente la incorporación de la sonda (Pagani et al., 1985; Rietschel et al., 1985). Esta interacción perturba la integridad de la membrana plasmática (Discusión, apdos. 2.3.1. y 2.3.3.) pero no es suficiente (con dosis bajas de LPS) para permitir una salida masiva de la fluoresceína al medio extracelular. Los resultados obtenidos con FDA sugieren por otra parte, un efecto directo de la endotoxina sobre el pH, que sería disminuido ya a los 15min de incubación de los hepatocitos con el LPS como se comprueba en los estudios específicos de este parámetro (Discusión, apdo. 2.5.7.).

En el caso de los macrófagos de Kupffer, los resultados indican (Tabla 11, Fig. 31) que la incubación con LPS (10 y 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) produce un aumento de la intensidad de fluorescencia emitida por las células. No obstante, en el caso de la dosis baja de endotoxina (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$), el número de células fluorescentes disminuye (viabilidad menor que en los controles) y cuando la dosis de endotoxina es 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, el número de células fluorescentes es mayor que en el caso anterior (viabilidad igual que en los controles). Por ello, se podría pensar que en el primer caso (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) el LPS produce una activación de las esterasas citoplasmáticas mientras que en el segundo caso (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$), tiene lugar un efecto inespecífico sobre la membrana plasmática, favoreciéndose la incorporación de la sustancia apolar FDA.

Esta explicación concuerda con los resultados obtenidos para la incorporación de [^3C]-2-desoxiglucosa por cultivos de células de Kupffer (Discusión, apdo. 2.4.1.) y apoya la idea de una acción específica de dosis bajas de LPS (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) respecto de la acción inespecífica

ejercida por 100µg LPS/ml sobre las propiedades físicas de la membrana plasmática (Discusión, apdo. 2.3.3.).

2.3.3. Microviscosidad. Efecto de la endotoxina.

La endotoxina induce la desestabilización de membranas artificiales (Schuster et al., 1970; Benedetto et al., 1973) y su interacción hidrofóbica y electrostática con liposomas fosfolipídicos ocasiona cambios en las cargas superficiales de tales sistemas (Onji & Liu, 1979). Asimismo, el efecto del LPS sobre la temperatura de transición de fase de distintos fosfolípidos, parece indicar que disminuye la fluidez de fosfolípidos cargados negativamente como el ácido fosfatídico y la fosfatidiletanolamina (Liu et al., 1982). Esto sugiere que el LPS podría modificar la función de las membranas biológicas modificando las propiedades físicas de sus lípidos.

Teniendo en cuenta estos antecedentes y la repercusión fisiológica que puede tener esta interacción, se ha hecho necesario el estudio del efecto de la endotoxina sobre la fluidez de membranas plasmáticas hepáticas utilizando las sondas fluorescentes DPH y TMA-DPH. Los resultados indican que el LPS aumenta la microviscosidad de la zona externa e interna de la bicapa lipídica, siendo el incremento directamente dependiente de la dosis de LPS utilizada (Figs. 34 y 35). El efecto es muy rápido en el interior y se mantiene a lo largo del tiempo puesto que a los 15min de incubación con la endotoxina es similar que a los 45min (Tablas 12 y 13).

Con el fin de comprobar a nivel celular este efecto, que parece indicar una rápida integración de la endotoxina en la membrana plasmática, se utilizaron como sistema de estudio, suspensiones de los distintos tipos celulares hepáticos incubadas durante 30min a 37°C con la endotoxina.

El LPS produce un aumento de la microviscosidad de la zona externa de la membrana plasmática de los hepatocitos, mientras que casi no afecta al interior de la bicapa (Fig. 37). Ello no está en desacuerdo con lo observado en membranas plasmáticas hepáticas dado que en éstas existe una mayor accesibilidad del LPS al interior puesto que la superficie expuesta es mayor.

Estudios previos llevados a cabo a 25°C, habían puesto de manifiesto un notable incremento de la microviscosidad del interior de la membrana plasmática de células parenquimatosas aisladas, tras el tratamiento durante 30min con distintas dosis de endotoxina (Portolés et al., 1987). Evidentemente la temperatura influye de manera decisiva en este tipo de experimentos. La mayor fluidez de la membrana a 37°C respecto de 25°C, posiblemente enmascara el incremento de microviscosidad producido por el LPS y observado claramente a 25°C en ambas zonas de la membrana plasmática. Algunos autores, de acuerdo con este razonamiento, analizan la microviscosidad a 24°C cuando la sonda utilizada es DPH (aumentando la sensibilidad puesto que la zona interna es la más fluida de la membrana) y a 37°C si la sonda es TMA-DPH (aumentando así la sensibilidad pues una temperatura más

alta permite mayor movilidad en la zona externa que siempre es más rígida) (Dachet et al., 1990).

Los resultados obtenidos indican por tanto, un aumento de la microviscosidad producido por el LPS sobre la membrana plasmática de hepatocitos y concuerdan con la hipótesis de una unión de la endotoxina a regiones hidrofóbicas de la membrana plasmática de las Pc (Pagani et al., 1981) siguiendo el modelo bifásico de interacción propuesto por Price y Jacobs (1986) y que sugiere la existencia de dos etapas:

1ª) *Adherencia*: etapa reversible, de naturaleza iónica.

2ª) *Coalescencia*: etapa irreversible, que supone la inserción del lípido A en la bicapa lipídica.

Aunque las células del parénquima hepático son las mayoritarias en el hígado, el conocimiento del efecto de la endotoxina sobre este órgano requiere también el análisis de su acción sobre las células no parenquimatosas. Por ello, se ha estudiado también la influencia del LPS sobre la fluidez de la membrana plasmática de células no parenquimatosas hepáticas en suspensión.

Se comprueba que la endotoxina disminuye significativamente la microviscosidad de la zona externa de la membrana plasmática de las NPC (Fig. 38), al contrario de lo que ocurre con los hepatocitos, lo cual hace pensar en un diferente proceso de interacción LPS-membrana. Esto podría explicarse debido a que las preparaciones de células sinusoidales están constituidas fundamentalmente por células de Kupffer y células endoteliales que fácilmente fagocitarían el LPS (Steffan et al., 1986), estando este proceso fagocítico asociado a un aumento de fluidez (Berlin & Fera, 1977). Dicha fagocitosis se ve apoyada por los resultados obtenidos de los estudios de localización intracelular del LPS en cultivos de NPC enriquecidos en células de Kupffer (Discusión, apdo. 2.2).

Sin embargo, la microviscosidad de la zona interna de la bicapa lipídica es incrementada tras el tratamiento de NPC con endotoxina (Fig. 38). Esto concuerda con el efecto del LPS en hepatocitos, atribuido a una integración de la endotoxina en zonas hidrofóbicas de la bicapa lipídica.

Los datos sugieren que la incorporación del LPS por las NPC puede implicar de forma simultánea fagocitosis e integración de la endotoxina en la bicapa lipídica. De esta manera, a medida que avanza la fagocitosis y disminuye la microviscosidad en la zona externa (hasta un 26%), se va produciendo la integración del LPS en la membrana aumentando por ello la microviscosidad en el interior de la bicapa (hasta un 28%).

Comparando el efecto de la endotoxina sobre la zona interior de la bicapa de Pc y NPC, se aprecia que mientras en las primeras el aumento de microviscosidad es prácticamente nulo (a 37°C), en las segundas el aumento es muy significativo. Esto podría ser debido a la diferente composición fosfolipídica de la membrana plasmática en ambos tipos celulares. Se ha demostrado que preparaciones de membranas hepáticas ricas en membranas sinusoidales (NPC) tienen un elevado contenido en esfingomielina (18-25% del total de fosfolípidos) (Kremmer et al., 1976). Ello explica la mayor microviscosidad observada en la membrana

plasmática de las NPC frente a las Pc y hace que el aumento de η producido por el LPS sea mucho más perceptible en las primeras. De la misma manera, resultados previos obtenidos con hepatocitos a 25°C (Portolés *et al.*, 1987) demostraban un notable incremento de la microviscosidad en el interior de la bicapa lipídica tras el tratamiento con LPS, mientras que a 37°C (membrana más fluida) dicho aumento no se aprecia.

Por lo tanto, factores que incrementan la microviscosidad de la membrana como son el contenido en esfingomielina o el descenso de la temperatura (25°C) hacen más apreciable el efecto de la endotoxina, que es menos notorio en condiciones fluidificantes.

Con el fin de esclarecer los distintos efectos del LPS sobre la microviscosidad de las zonas externa e interna de la membrana de células sinusoidales, se ha analizado el efecto de la temperatura sobre la microviscosidad de células no parenquimatosas control y tratadas con endotoxina (Tabla 15), comprobándose que, efectivamente, cuanto menor es la temperatura mayor es el aumento de microviscosidad inducido por el LPS. Incluso con la sonda TMA-DPH, la disminución de microviscosidad observada a 37°C, se convierte en aumento cuando el ensayo se lleva a cabo a 25°C.

Estos resultados vuelven a poner de manifiesto que cuanto menor es la fluidez de la membrana sobre la que actúa el lipopolisacárido, más fácilmente detectable es el incremento de microviscosidad producido.

Durante los procesos de fagocitosis existe una reorganización microtúbulo-dependiente de los lípidos de la membrana, internándose zonas especialmente rígidas de la misma y fluidificándose por tanto la membrana plasmática residual (Berlin & Fera, 1977). El aumento de fluidez producido por el LPS en el caso de las NPC es detectable en el exterior de la membrana y no en el interior (Fig. 38 y Tabla 15).

En este sentido el LPS podría ejercer un efecto análogo al de la colchicina: este inhibidor del ensamblaje de microtúbulos, previene de los cambios de fluidez inducidos durante la fagocitosis en la zona interna de la membrana (Berlin & Fera, 1977), pero sin afectar a la captación de partículas (Oliver *et al.*, 1974). La endotoxina podría tener un efecto semejante dado que distorsiona el ensamblaje de los microtúbulos (Risco *et al.*, 1991), alterando de este modo la reorganización microtúbulo-dependiente de los lípidos de la membrana que tiene lugar durante los procesos de fagocitosis (Oliver *et al.*, 1974; Aszalos *et al.*, 1985; Benedetti *et al.*, 1990).

2.3.4. Microviscosidad. Efecto de sales biliares.

De acuerdo con la hipótesis de Van Bossuyt *et al.* (1990), las sales biliares (SB) tienen un doble papel en el desarrollo de endotoxemia de origen intestinal que ocurre durante estados colestáticos. Se ha comprobado que la obstrucción biliar origina a menudo un estado de shock endotóxico (25-85% de los casos) y que la administración oral de SB previene la absorción de LPS del intestino (Kocsar *et al.*, 1969; Cahill *et al.*, 1987). Por tanto parece que una baja concentración intestinal de SB favorece la absorción de LPS y, al mismo tiempo, elevados

niveles séricos de SB inducen una disminución en la capacidad fagocítica del sistema retículo-endotelial hepático (RES) (Tanaka et al., 1985; Takiguchi & Koga, 1988). Se ha demostrado mediante estudios *in vitro*, que algunas SB disminuyen la unión de la endotoxina a las células de Kupffer (Van Bossuyt et al., 1990), pudiendo deberse a un efecto de dichas SB sobre las propiedades físicas de la membrana celular que afectarían, por tanto, a la unión de LPS.

El posible efecto modulador de las sales biliares en la acción de la endotoxina y el hecho de que el ácido taurocólico (TCA) altera la fluidez de membranas hepáticas aisladas (Scharschmidt et al., 1981), han llevado a estudiar el efecto que, sobre la microviscosidad de la membrana plasmática de distintos tipos celulares hepáticos, tienen las siguientes sales biliares:

- Taurocolato sódico (TC) y taurodesocolato sódico (TDC), por ser los más importantes componentes de la bilis de rata (12mM y 5mM, respectivamente, frente a un 30mM total de sales biliares) (Lowe & Coleman, 1981).
- La mezcla (M) constituida por (TC (85%) + TDC (15%)), dado que es más similar a la situación fisiológica *in vivo*: mezcla de varias sales biliares de distinta hidrofobicidad con predominio de las hidrófilicas, menos tóxicas (Nakagawa et al., 1990).
- Tauroursodesocolato sódico (TUDC), ya que se ha comprobado que no afecta a la unión del LPS a las células de Kupffer, contrariamente a lo que ocurre con las anteriores (Van Bossuyt et al., 1990). (Control negativo).

Distintos autores han intentado relacionar las propiedades físico-químicas de las SB con sus actividades biológicas y citotoxicidad, poniéndose de manifiesto que éstas dependen fundamentalmente de tres factores (Crestani et al., 1989; Fasano et al., 1990; Zhao & Hirst, 1990):

- El estado de conjugación de la sal: la forma no conjugada es más citotóxica que la conjugada (Ohia et al., 1990).

En el presente estudio se han elegido los conjugados de taurina por ser ésta más polar y menos tóxica que la glicina (Nakagawa et al., 1990).

- La concentración micelar crítica (CMC): el posible daño celular inducido por las SB transcurriría según dos mecanismos en dependencia de su concentración (Oelberg et al., 1990):

- A concentraciones mayores que la CMC, las SB actúan como detergentes que solubilizan componentes de membrana y alteran su permeabilidad (Nagata et al., 1990).
- A concentraciones menores que la CMC, las SB inducen un acúmulo intracelular de calcio que puede resultar citotóxico (Hunt & Jawaharial, 1980; Anwer et al., 1989; Combettes et al., 1990; Oelberg et al., 1990).

Por ello, la concentración a la que se realizan los experimentos de este estudio es siempre 2mM, inferior a la CMC de todas las SB utilizadas (Hofmann, 1988), de manera que los resultados se deben a la interacción no lítica de lamelas de SB con la membrana. Además se ha demostrado que a esta concentración las SB empleadas no son citotóxicas para hepatocitos (Ohta et al., 1990).

- El índice de hidrofobicidad (IH): este parámetro se hace mayor, excepto en el caso del ácido ursodesoxicólico (UDC), al disminuir la hidroxilación del núcleo esteroídico y ello incrementa su poder citotóxico (Scholmerich et al., 1984; Muranishi, 1990), lítico (Nagata, 1990), su capacidad de interacción y penetración en sistemas modelo de membrana (Shoemaker & Nichols, 1990) y su efecto sobre la concentración intracelular de calcio (Anwer et al., 1989).

Teniendo ésto en cuenta se han representado los resultados de microviscosidad frente al IH de la sal biliar correspondiente (Lutton, 1990).

En términos generales, se aprecia un significativo efecto fluidificante de todas las sales biliares ensayadas sobre la membrana plasmática de las células hepáticas, tanto parenquimatosas como sinusoidales (Figs. 39, 40, 41 y 42). Dicho efecto guarda una proporcionalidad directa con el IH de la SB, sobre todo en el caso de las NPC.

En éstas, la disminución de la microviscosidad es mucho más pronunciada en el interior de la bicapa (DPH) que en la zona externa (TMA-DPH), excepto para el caso del TDC (el más apolar), que aumenta considerablemente la fluidez de la superficie (Tabla 16). Por el contrario, en los hepatocitos el efecto es mayor en el exterior (TMA-DPH) excepto para el TUDC (el más polar) que prácticamente no afecta dicha zona (Tabla 17).

Todo parece indicar que el efecto de las sales biliares depende, no sólo de su índice de hidrofobicidad, sino también de las características físicas de la membrana con la que interaccionan. Así, cuanto más elevada es la η de la membrana, más le afectan las SB muy apolares, tanto en el exterior como en el interior de la bicapa. En cambio, cuanto más fluida (baja η) es la membrana, más le afectan las SB muy polares, sobre todo en el interior (zona de mayor fluidez).

Esta hipótesis concuerda con la presentada por Lowe y Coleman (1981) quienes plantean que cuanto más fluida es la membrana del eritrocito (valores bajos de la relación esfingomielina/fosfatidilcolina), más susceptible es a la lisis por SB, sobre todo por las polares (glicocolato). Asimismo, sus resultados indican que cuanto más rígida es la membrana del eritrocito, tanto mayor poder lítico tiene la SB apolar (glicodesoxicolato) respecto de la hidrofílica (glicocolato).

Los mismos autores postulan que la baja fluidez, comprobada experimentalmente, de las membranas hepáticas ricas en membranas sinusoidales (Keefee et al., 1979), podría explicar, al menos parcialmente, su resistencia *in vivo* al poder lítico de las SB. Los estudios *in vitro* del presente trabajo, ponen de manifiesto que las membranas con mayor η (Sc, zona externa)

son más resistentes al efecto fluidificante de las SB sobre todo de las más polares, que son las mayoritarias en la bilis. Sin embargo, cuando las SB son preferentemente hidrofóbicas se ven menos afectadas las membranas más fluidas (Pc, zona interna).

Por otra parte, en condiciones colestáticas se observa una disminución de la capacidad fagocítica del RES (Tanaka *et al.*, 1985; Takiguchi & Koga, 1988) que podría ser explicada, al menos parcialmente, como consecuencia del efecto fluidificante de las SB sobre la membrana de las células sinusoidales hepáticas. Así, el TUDC, que no afecta a la microviscosidad de la zona externa de esa membrana (Fig. 41, Tabla 16), tampoco altera la capacidad fagocítica de las células de Kupffer (Van Bossuyt *et al.*, 1990), sugiriéndose la importancia de una especial microviscosidad en la zona externa de la membrana plasmática para una correcta fagocitosis. Este proceso parece ir acompañado de una reorganización microtúbulo-dependiente de los lípidos de la membrana, que implicaría la migración de los receptores de lectinas a zonas especialmente rígidas de la bicapa, que envuelven a la partícula fagocitada siendo posteriormente internadas y dejando por tanto una membrana plasmática residual más fluida (Berlin & Fera, 1977). Cabe por ello pensar que una anormal fluidez de la membrana plasmática podría alterar la actividad fagocítica.

Puesto que el efecto de las SB consiste en una fluidificación general de la membrana plasmática y considerando el incremento de microviscosidad ejercido por el LPS sobre la misma, resulta de gran interés estudiar la influencia del lipopolisacárido y las SB simultáneamente.

Los resultados (Tablas 18 y 19) ponen de manifiesto que los efectos contrarios ejercidos individualmente por la endotoxina y las SB se anulan al añadir ambos al medio de incubación, tanto en las células parenquimatosas como en las no parenquimatosas.

Esto podría deberse a que ambos efectos simplemente se contrarresten: en Pc, el LPS (200 µg/ml) aumenta la microviscosidad ≈13% y las SB (2mM) la disminuyen ≈18% (máximo), excepto en el caso del TDC; en NPc, el LPS (200 µg/ml) aumenta la microviscosidad ≈28% y las SB (2mM) la disminuyen ≈20%, excepto en el caso del TDC.

Por otra parte, también podría existir una interacción LPS-SB, formando agregados lamelares o micelas mixtas que no tengan ningún efecto sobre la microviscosidad de Pc o de NPc. En este sentido, Van Bossuyt *et al.* (1990) han demostrado una menor captura de [³H]-LPS por las Kc cuando se incuban las células simultáneamente con la endotoxina y SB. Puesto que no se han observado alteraciones en la microviscosidad de la membrana de estas células en dichas condiciones, se puede efectivamente postular la existencia de una rápida interacción LPS-SB base del efecto protector de dichos agentes. Así, Shands y Chun (1980) postulan que el DC interacciona con el LPS disgregando las moléculas de lipopolisacárido. Además, las SB forman complejos reversibles con la albúmina a la cual se unen con gran afinidad (Pico & Houssier, 1989), habiéndose observado que dicha proteína desplaza al LPS de su unión a Pc (Pagani *et al.*, 1981). Por otra parte, las lipoproteínas interaccionan con las sales biliares (Fromm, 1989) y también con el LPS (Van Lenten *et al.*, 1986; Warren *et al.*, 1986), siendo esta interacción dependiente del contenido de colesterol de la Lp (Van Lenten *et al.*, 1986). Todo

ello apoyaría la existencia de la interacción LPS-SB que impediría la interacción de ambos agentes con la membrana plasmática.

2.4. FUNCIONALIDAD DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA.

Para estudiar las alteraciones que puede ocasionar la endotoxina en la funcionalidad de la membrana plasmática, se han considerado los siguientes mecanismos:

- Incorporación de 2-desoxiglucosa: permite obtener información sobre la viabilidad funcional de las células parenquimatosas y no parenquimatosas en relación con el transporte de glucosa a través de la membrana.
- Unión e internación de insulina: dada la importancia de la insulina en la regulación del metabolismo hepático y considerando las alteraciones metabólico-hormonales observadas durante el *shock* endotóxico *in vivo* (Hinshaw et al, 1983), resulta de notable interés analizar el efecto de la endotoxina sobre la unión e internación de esta hormona en hepatocitos.
- Unión e internación de LDL: la naturaleza lipoprotéica del ligando aporta un interés adicional al análisis de su unión a las células parenquimatosas debido a la posible interacción LPS-LDL (Van Lenten et al, 1986).

2.4.1. Incorporación de [¹⁴C]-2-desoxiglucosa.

Los resultados obtenidos en ausencia de endotoxina (Tablas 20, 21 y 22), permiten comprobar la viabilidad funcional de las células parenquimatosas y no parenquimatosas en cultivo primario, indicando que el transporte de glucosa a través de la membrana es normal.

El tratamiento con lipopolisacárido produce en los hepatocitos una disminución del transporte de glucosa lo cual podría ser consecuencia de la alteración de las características físicas de la membrana tras su interacción con la endotoxina (Discusión, apdo. 2.3.). Esta disminución de la captación de glucosa conduciría a una ausencia intracelular cada vez mayor de compuestos energéticamente activos, siendo ésta una alteración característica del estado de *shock* endotóxico.

En el caso de las células no parenquimatosas, el LPS produce un aumento del transporte de glucosa a dosis bajas de endotoxina (10 µg/ml). Este efecto ha sido demostrado para las células de Kupffer en estudios *in vivo* (Spitzer et al, 1990) y es un índice del estado hipermetabólico en el que se encuentran los macrófagos tras el tratamiento con LPS. Todo parece indicar que dosis bajas de endotoxina (10 µg/ml) activan específicamente el metabolismo celular de los macrófagos hepáticos, mientras que dosis mayores (100 µg/ml)

actúan inespecíficamente alterando las propiedades de la membrana plasmática (*Discusión, apdos. 2.3.2 y 2.3.3.*).

Esto concuerda con lo postulado por Bautista *et al.* (1990) que sugieren que el estado hipermetabólico inducido por el LPS *in vivo* en macrófagos hepáticos, puede estar relacionado con una elevada generación de O₂ (*Discusión, apdos. 1.1 y 2.5.3.*), contribuyendo esto último a la inducción de las lesiones hepáticas características de la endotoxemia.

2.4.2. Unión e internación de [¹²⁵I]-insulina.

Durante los procesos de endotoxemia se producen graves alteraciones que afectan al metabolismo hepático así como a su regulación hormonal. En este sentido el LPS induce una hiperglucemia temprana transitoria, seguida de hipoglucemia y disminución de las reservas de carbohidratos del organismo (*Hinshaw, 1976; McCallum, 1980*). La respuesta hiperglucémica de la primera fase parece deberse a un incremento de la secreción de glucagón. Esta hormona hiperglucemiante estimula los procesos de glucogenólisis y gluconeogénesis hepáticos (*Sutherland & Robinson, 1969*) a través de su unión a los receptores hormonales en la membrana plasmática y la activación de la adenilato ciclasa (*Bimbaum & Fain, 1977*).

Estudios previos han demostrado que el LPS disminuye *in vitro* la unión de glucagón a hepatocitos aislados (*Pagani et al., 1985*), lo cual podría contribuir al desencadenamiento de la segunda fase hipoglucémica característica del *shock* (*Hinshaw, 1976; McCallum, 1980*).

La disminución de la gluconeogénesis hepática y el aumento de la utilización de glucosa por tejidos periféricos, determinan esta profunda hipoglucemia, que ha sido relacionada con la transición entre la endotoxemia reversible y el *shock* endotóxico letal.

Los sucesos metabólicos de esta segunda fase son característicos de un estado hiperinsulinémico y por esta razón la insulina ha sido implicada como factor clave en la dishomeostasis de la glucosa desarrollada durante la endotoxemia (*Yelich & Filkins, 1980*). Dicho estado hiperinsulinémico ha sido comprobado durante el *shock* endotóxico (*Spitzer et al., 1976*) y, aunque parece relacionado con un estado de hipersecreción pancreática (*Yelich & Filkins, 1982*), el mecanismo responsable de la elevación de los niveles de insulina no está completamente esclarecido. Existen evidencias de la implicación de algunas monoquinas (IL-1) en la hiperinsulinemia postséptica, lo que pone de manifiesto la importancia de algunos mediadores en el desarrollo del *shock*.

Por otra parte, ha sido descrita una cierta resistencia a insulina durante el *shock* (*Stoner et al., 1983*).

Con el fin de conocer si existe un efecto directo de la endotoxina sobre la interacción de la insulina con los hepatocitos, se ha investigado la influencia del LPS bacteriano sobre distintas etapas del mecanismo de acción de la hormona.

Los resultados obtenidos de los estudios de unión de [¹²⁵I]-insulina a monocapas de hepatocitos muestran las características típicas de la unión hormona-receptor (*Fig. 43*) como ha sido descrito para diferentes tipos celulares y preparaciones de membranas plasmáticas

(Donner, 1982; Olefsky & Kao, 1982). La interacción de la endotoxina con hepatocitos en cultivo disminuye la unión específica de insulina con todas las dosis de hormona utilizadas (Fig. 43), tras 90min de incubación a 25°C. Esto concuerda con los resultados obtenidos previamente utilizando hepatocitos en suspensión (Pagani et al., 1985) y demuestra que la unión del LPS a la membrana del hepatocito no permite la normal interacción hormona-receptor.

Este efecto ha sido investigado a diferentes tiempos y temperaturas de incubación con insulina observándose que la acción del LPS sobre la unión de la hormona es más evidente a 30min y bajas temperaturas (4°C). Sin embargo, dicho efecto desaparece a tiempos más largos de incubación (90min) y a temperaturas más altas (37°C) (Tabla 23, Figs. 44 y 45).

Previamente se ha postulado que el LPS se une a ingredientes particulares de la bicapa lipídica mediante interacciones fisico-químicas que no implican la existencia de un receptor específico (Pagani et al., 1981). Dado que la unión del LPS induce un aumento de la microviscosidad de la membrana plasmática de hepatocitos (Discusión apdo. 2.3.3.), permaneciendo sobre la superficie celular de forma más prolongada a temperaturas bajas (Municio et al., 1990; Díaz-Laviada et al., 1991), las moléculas de lipopolisacárido podrían alterar los receptores de insulina o interactuar con ellos, disminuyendo así la unión de la hormona.

También se ha investigado la internación de la hormona a diferentes temperaturas y tiempos, comprobándose que la endocitosis es un proceso tiempo- y temperatura-dependiente (Figs. 44 y 45), lo cual apoya los resultados de otros autores (Ose et al., 1980; Olefsky & Kao, 1982). Tanto la endocitosis de insulina (Fig. 45) como la internación de LPS (Municio et al., 1990; Díaz-Laviada et al., 1991), son más lentas a temperaturas bajas (4°C) pero incluso a esa temperatura ambos procesos tienen lugar.

La endotoxina disminuye significativamente la internación de insulina en todas las condiciones experimentales ensayadas (Figs. 44 y 45), incluso cuando la unión de la hormona está menos afectada (37°C/90min).

La acidificación del citoplasma celular disminuye los procesos de internación (Sandvig et al., 1987; Núñez et al., 1990) y, dado que se ha comprobado que el LPS reduce el pH, en 0.3 unidades a los 10min de su incubación con hepatocitos en cultivo (Discusión, apdo. 2.5.7.), ésta puede ser la causa de la disminución de la endocitosis de la insulina.

Además estos resultados concuerdan con los mecanismos de unión e incorporación del LPS observados mediante técnicas de inmunomarcaje con oro coloidal (Municio et al., 1990; Díaz-Laviada et al., 1991), que indican que la unión e incorporación de la endotoxina a los hepatocitos son procesos tiempo- y temperatura-dependientes. Así, el LPS permanece en la superficie celular a temperaturas bajas y/o tiempos cortos de incubación, mientras que a tiempos y temperaturas superiores, se observa una unión e internación más rápidas de la endotoxina. Por esta razón, cuando el tiempo de incubación es corto o la temperatura baja, la endotoxina afecta a la unión y a la internación de insulina. Sin embargo, cuando la incorporación del LPS es mayor (tiempos más largos o temperaturas mayores), la unión de la hormona se ve menos afectada permaneciendo la endocitosis alterada.

Teniendo en cuenta que el aumento de microviscosidad producido en la membrana de las células parenquimatosas por la acción directa del LPS (*Discusión, apdo. 2.3.3.*), podría ser la causa de una alteración de los procesos endocíticos, se ha analizado el efecto ejercido por un conocido inhibidor de endocitosis (óxido de fenilarsina, PhAsO) sobre la microviscosidad de membranas hepáticas aisladas. La Fig. 36 pone de manifiesto un paralelismo entre la acción del LPS y la del PhAsO, que supone una disminución notable de la fluidez de la membrana, sobre todo en el caso del inhibidor de endocitosis (*Tabla 14*).

Esto permite concluir que un incremento de la microviscosidad de la membrana plasmática afectaría negativamente a la endocitosis de complejos receptor-ligando, disminuyendo la movilidad de los componentes de la membrana, alterando los mecanismos de transducción de señales y pudiendo ser responsable de la resistencia a insulina observada durante la endotoxemia. Asimismo, se ha observado que el tratamiento con LPS altera la síntesis de AMPc inducida por glucagón (*Pagani et al., 1985*).

Todos estos datos apoyan la existencia de una acción directa del LPS sobre los mecanismos de unión e internación de la insulina.

2.4.3. Unión e internación de [¹²⁵I]-LDL.

El hígado está implicado en la eliminación de LDL circulantes (*Brown & Goldstein, 1983*), lipoproteínas de baja densidad que contienen la mayor parte del colesterol plasmático (*Goldstein & Brown, 1977*). En el curso de bacteremias Gram-negativas, se ha observado la existencia de estados hipercolesterolémicos (*Gallin et al., 1969; Blackburn, 1977*) que podrían estar relacionados con las alteraciones hormonales características del *shock*.

Por otra parte, la especial estructura química de las LDL, formadas por un núcleo apolar de colesterol esterificado y triacilgliceroles, rodeado por una monocapa de fosfolípidos y colesterol libre con proteínas integradas (*Shen et al., 1977*), les confiere la capacidad de interaccionar con la molécula del LPS (*Van Lenten et al., 1986; Warren et al., 1986*).

Es, por tanto, de notable interés estudiar el efecto de la endotoxina sobre la unión e internación de LDL a hepatocitos, ya que una alteración de este proceso podría tener consecuencias importantes en relación con los estados hipercolesterolémicos que se inducen durante el desarrollo del *shock*.

Los resultados obtenidos indican que el LPS (200 µg/ml) disminuye la unión total de LDL a las células del parénquima (*Fig. 46*), siendo el efecto más significativo a tiempos largos (240 min). Sin embargo, dosis más bajas de endotoxina (100 µg/ml) no alteran de forma significativa dicha unión.

Se ha demostrado que el LPS disminuye la fluidez de la membrana plasmática de los hepatocitos (*Discusión, apdo. 2.3.3.*). Ello podría alterar la funcionalidad del receptor de LDL (R_{LDL}) disminuyendo la unión de lipoproteína. De hecho este efecto ha sido observado en membranas hepáticas que, tras ayuno del animal, ven incrementada su microviscosidad y presentan una unión disminuida de LDL (*Loo et al., 1990*). Sin embargo, en las condiciones

del ensayo (37°C/tiempos largos) no debería estar alterado considerablemente este parámetro de la membrana.

Además, la unión inespecífica del LPS a la membrana de los hepatocitos (Pagani et al, 1981; Pagani et al, 1988), podría alterar total o parcialmente el R_{LDL} disminuyendo su accesibilidad a la lipoproteína según un mecanismo paralelo al postulado para la unión de insulina (Discusión, apdo. 2.4.2), y ésto explicaría la dependencia de la dosis observada en la unión de LDL.

En ensayos paralelos, las células se incubaron con HDL para estimular la respuesta celular a las LDL, puesto que ha sido descrito un efecto activador de la presencia de R_{LDL} en la superficie celular, como consecuencia de la exposición a dicha lipoproteína de alta densidad (Havekes et al, 1986a; Havekes et al, 1986b). Los resultados obtenidos (Fig. 47) indican, sin embargo, una inhibición total de la unión específica de LDL a los hepatocitos control. Ello puede explicarse por una interacción HDL- R_{LDL} , como consecuencia de la presencia de apolipoproteína E en las HDL (Naito, 1986). Dicha apo E reconoce los receptores hepáticos de la apo B/E (R_{LDL}) (Utermann, 1987), pudiendo determinar estas reacciones cruzadas, sobre todo en el caso de utilizar especies heterólogas (Fernández & Mc Namara, 1990).

Por otra parte, en estas condiciones se observa una clara diferencia entre el efecto de la preincubación con LPS 100 y con LPS 200. En el primer caso la unión de LDL es mayor que la unión control pudiéndose pensar en una acción sinérgica del LPS y las HDL que determina la activación de los mecanismos celulares de captación de colesterol de las LDL.

Cuando la preincubación se ha llevado a cabo con una dosis mayor de LPS (200µg/ml), se ve negativamente afectado el metabolismo celular impidiéndose la captación de LDL. Esta alteración ya había sido observada en ausencia de incubación con HDL (Fig. 46).

El estudio de la influencia de distintas dosis de HDL sobre la unión de [125 I]-LDL (Fig. 48), concuerda con esta explicación puesto que incluso a la menor concentración empleada (130µg/ml), la HDL es capaz de bloquear todos los R_{LDL} (Control), cosa que no ocurre si previamente se han incubado los hepatocitos con LPS (100 y 200µg/ml).

Las Figuras 49 y 50 muestran la unión específica de [125 I]-LDL a hepatocitos control y tratados con LPS, respectivamente. Se observa que, en el caso de las células preincubadas con endotoxina, la unión inespecífica es mayor ($\approx 10\%$) sobre todo a tiempos cortos (60min). Se deduce, por tanto, que la endotoxina parece favorecer la unión inespecífica de LDL. Este efecto tiende a desaparecer a tiempos largos de incubación, que implican una total internación de las moléculas de LPS en la célula (Municio et al, 1990; Diaz-Laviada et al, 1991).

Esta hipótesis estaría de acuerdo con un aumento del intercambio directo de colesterol entre Lp (HDL o LDL) y la membrana plasmática de los hepatocitos, la cual ha visto incrementada su microviscosidad tras la interacción inespecífica con el LPS (Discusión, apdo. 2.3.3.).

Por otra parte, se conoce la existencia de una endocitosis inespecífica de la LDL no mediada por receptor, que se activa en presencia de elevadas concentraciones de lipoproteína. Teniendo en cuenta las condiciones experimentales del estudio, este mecanismo podría

estar incrementado. La internación del LPS en los hepatocitos, inespecífica y no asociada a vesículas (Municio *et al.*, 1990; Diaz-Laviada *et al.*, 1991), podría estar facilitando esta segunda vía de internación de las LDL. La Tabla 24 apoya esta hipótesis puesto que el pretratamiento con endotoxina (100 µg/ml) hace que la cantidad de [²⁵I]-LDL internada sea prácticamente el doble (77%) que en células control (39.5%).

Todos estos estudios indican la existencia de un efecto directo del LPS sobre la unión de LDL a hepatocitos en cultivo, siendo la respuesta celular dependiente de la dosis de endotoxina.

2.5. PARAMETROS BIOQUIMICOS INTRACELULARES.

Diversos estudios han descrito que la alteración del metabolismo celular es la causa de la irreversibilidad del *shock* (Sayeed, 1983). Como ejemplo sirva mencionar la resistencia de la especie C3H/HeJ de ratón a muchos de los efectos fisiopatológicos que se suceden en el cuadro de *shock* endotóxico (Rosenstreich, 1977). Dicha resistencia parece deberse a la ausencia del efecto inhibitorio de la endotoxina sobre la inducción de la enzima gluconeogénica fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK) (McCallum & Pontius, 1979). Así pues, es fundamental conocer la dishomeostasis celular en la instauración y desarrollo del *shock* endotóxico.

La influencia directa o indirecta del LPS en este sentido, se ha analizado utilizando los siguientes parámetros:

- Actividad intra y/o extracelular de enzimas características de la funcionalidad celular en distintos aspectos: LDH, su liberación al medio está directamente relacionada con la integridad de la membrana plasmática (Pagani *et al.*, 1985; Morel *et al.*, 1990; Ohta *et al.*, 1990) (Discusión, apdo. 2.3.1.); GK, enzima implicada en el metabolismo hepático de hidratos de carbono; FA, enzima lisosomal por lo que una alteración de su actividad indicaría lesión a ese nivel subcelular.
- Actividad de la SOD y producción de radicales libres de oxígeno, cuyo papel en la patogénesis del fallo hepático ha sido inequívocamente establecido, siendo la causa de alteraciones metabólicas y lesiones celulares mediante distintas vías (Slater, 1984).
- Peroxidación lipídica, cuya alteración es una de las tres principales vías de acción por las que los radicales libres de oxígeno inducen daño celular (Slater, 1984).
- Niveles de citocromo b₅, cuya implicación en los procesos de desaturación de ácidos grasos y en el sistema de oxidasas de función mixta microsomales, le confiere una especial importancia en estados citotóxicos ya que éstos van a requerir la utilización

de los mecanismos de remodelación de membranas y de destoxificación hepática (Lu *et al.*, 1973; Srittmatter *et al.*, 1974; Morgan & Coon, 1984).

- Homeostasis del calcio intracelular, catión reconocido como un importante segundo mensajero dada su participación en numerosos procesos reguladores (Yagi & Miyazaki, 1988).
- pH intracelular (pH_i), que suele modificarse paralelamente a flujos alterados de calcio, actuando como mensajero sinérgico a través del contexto metabólico en el que están integradas las acciones de otros efectores (Busa & Nuccietelli, 1984).

2.5.1. Glucoquinasa.

La actividad intracelular de esta enzima (GK) se ve incrementada en hepatocitos como consecuencia del tratamiento con endotoxina, de forma dosis y tiempo dependiente (Figs. 51 y 52). La ausencia de efecto a los 30min de incubación con LPS y el aumento de casi un 100% a las 2 horas, induce a pensar en un efecto a largo plazo de la endotoxina sobre dicha actividad. Esta enzima transforma la glucosa en su metabolito activo glucosa-6-fosfato, que, al estar inhibida la gluconeogénesis, sería sustrato de la vía degradativa que llevará a la formación de piruvato y por acción de la LDH a lactato (Discusión, apdo. 2.3.1.).

Por otra parte, la no alteración de la actividad GK en hepatocitos tratados con distintas sales biliares (Fig. 52), indica la ausencia de citotoxicidad de estos compuestos a la concentración utilizada (2mM), ausencia demostrada previamente por otros autores (Ohza *et al.*, 1990). Las sales biliares además protegen a las células del efecto inducido por el LPS sobre la GK (Fig. 52). Este carácter protector de las SB, ya ha sido mencionado y discutido previamente (Discusión, apdo. 2.3.4.), llevando a considerar la posibilidad de una interacción LPS-SB.

2.5.2. Fosfatasa ácida.

Los resultados reflejados en la *Tabla 25* indican que sólo con concentraciones elevadas de endotoxina (1mg/ml), se produce un aumento significativo de la actividad extracelular de fosfatasa ácida. Esto concuerda con la disminución de viabilidad puesta de manifiesto mediante la incubación con FDA a esa misma dosis de LPS (Fig. 29) y sugiere de nuevo la existencia de alteraciones de la membrana plasmática que facilitan la salida de la enzima al medio.

Las dosis menores de lipopolisacárido (100, 200 y 500µg/ml) no son suficientes para provocar la salida de fosfatasa al exterior de la célula, o bien no producen daño lisosomal apreciable mediante este ensayo, manteniéndose así constante la actividad extracelular de la

enzima. Para comprobar si la actividad FA está aumentada en el citoplasma, se ha realizado la valoración intracelular de la hidrolasa, observándose que el LPS (100, 200 y 500 μ g/ml) no tiene ningún efecto (Tabla 26). Todo parece indicar por tanto, que el LPS no estimula la actividad de esta enzima lisosomal, si bien no puede descartarse por ello que exista una activación de los sistemas lisosomales.

2.5.3. Superóxido dismutasa y capacidad oxidativa intracelular.

La complejidad de la respuesta *in vivo* no permite diferenciar entre una acción directa del LPS sobre las células del parénquima y una acción indirecta debida a la intervención de mediadores (IL-1, TNF) liberados fundamentalmente por macrófagos circulantes y células de Kupffer. Por ello se han llevado a cabo estudios *in vitro* que han demostrado (Figs. 53 y 54) que el LPS ejerce un efecto directo sobre los hepatocitos, alterando la actividad intracelular de la SOD.

Así pues también el parénquima hepático colabora, junto con las células de Kupffer y los polimorfonucleares infiltrados (Bautista *et al.*, 1990), en la liberación de O₂⁻ manifestada *in vivo* por una reducida actividad de la SOD durante la fase aguda del shock (Tabla 8) (Discusión, apdo. 1.1.).

Se puede apreciar que la incubación con dosis bajas de LPS (50 μ g/ml), durante 2h (Fig. 54), da lugar a efectos análogos a los resultantes de una incubación con dosis mayores de LPS (200 μ g/ml) durante tiempos más cortos (30min) (Fig. 53); reproduciendo la reducida actividad de SOD característica de la fase aguda del shock (Tabla 8).

Cuando el tiempo de incubación es mayor (Fig. 54, 4h), el comportamiento se aleja del observado *in vivo*, lo cual sería debido a una considerable disminución de la viabilidad celular.

La elevación de los niveles de O₂⁻ puede ser causa y también consecuencia de alteraciones complejas de la membrana plasmática de los hepatocitos. Un exceso de radicales libres puede incrementar la microviscosidad de membranas biológicas mediante la activación de peroxidación lipídica (Watanabe *et al.*, 1990), mecanismo que se sumaría a la disminución de la fluidez producida por el tratamiento directo con LPS (Discusión, apdo. 2.3.3.) y que podría activar la NAD(P)H oxidasa determinando la producción de radicales libres. Esta hipótesis basada en alteración de la membrana plasmática celular como desencadenante de la cascada de reacciones de producción de radicales, ha sido postulada previamente para el caso de macrófagos (Berton & Gordon, 1983).

Ello explicaría los resultados puestos de manifiesto en la Fig. 55 que indican un efecto de las SB (TC y TC+TDC) sobre la actividad de la SOD. Dicho efecto es además contrario al ejercido por el LPS, coincidiendo con lo observado para el parámetro de microviscosidad de la membrana plasmática de los hepatocitos (Discusión, apdos. 2.3.3. y 2.3.4.). No obstante, cabe destacar que la incubación simultánea con SB y LPS no produce variaciones significativas en la fluidez de la membrana y, sin embargo, sí determina disminución de la actividad de SOD. Por tanto, aunque la integridad de la membrana plasmática sea un factor

a tener en cuenta, no es el único determinante de la liberación de radicales libres de oxígeno tras el tratamiento directo con LPS. Así, por ejemplo, se ha descrito que el calcio puede participar en la formación hepática de radicales libres de oxígeno durante la endotoxemia (Sakaguchi *et al.*, 1989).

Los resultados obtenidos con suspensiones de NPC enriquecidas con células de Kupffer, muestran una rápida elevación de la capacidad oxidativa intracelular como consecuencia del tratamiento con LPS (Fig. 56), demostrándose una acción directa de la endotoxina sobre los distintos tipos celulares hepáticos.

2.5.4. Peroxidación lipídica.

Con el fin de completar el análisis realizado *in vivo* respecto a la peroxidación lipídica en el hígado durante el shock (Discusión, apdo. 1.2.), se ha llevado a cabo un estudio paralelo *in vitro*. Los resultados obtenidos (Fig. 57) reflejan un comportamiento análogo al obtenido *in vivo* (Fig. 17), sugiriendo una acción directa de la endotoxina sobre los hepatocitos en lo que a peroxidación lipídica se refiere. La evolución que experimenta dicho comportamiento al ir incrementándose la dosis de endotoxina, implica un alejamiento progresivo del observado en el shock endotóxico reversible y podría ser debido a que dosis excesivamente elevadas de lipopolisacárido (500 µg/ml) (Fig. 57D) producen un descenso notable de la viabilidad (Fig. 29) (lesión celular irreversible), sobre todo a tiempos largos de tratamiento. De ahí que las diferencias entre las cuatro dosis empleadas se aprecien fundamentalmente a las 6 horas de incubación.

El aumento de la peroxidación lipídica en hepatocitos como consecuencia del tratamiento con LPS, implica una alteración estructural y funcional de la membrana plasmática (Sevanian & Kim, 1985) que podría distorsionar los gradientes transmembrana e inhibir procesos metabólicos celulares. Se ha descrito (Mal'Tseva *et al.*, 1989) la existencia de modificación de la señal de información a nivel de la proteína quinasa C, imprescindible en el control transmembrana de procesos celulares (Myung-Ho & Bell, 1986).

Entre esas alteraciones estructurales, cabe destacar la disminución de la fluidez observada tanto en membranas biológicas como en sistemas modelo, tras ser sometidos a peroxidación (Bruch & Thayer, 1983; Watanabe *et al.*, 1990). El LPS también ejerce un efecto semejante sobre la membrana plasmática (Discusión, apdo. 2.3.3.) que, por tanto, podría deberse en parte a la peroxidación lipídica. Además, habría que tener en cuenta también factores tan importantes como las características de la unión de la endotoxina y la concentración intracelular de calcio. Livingstone y Schachter (1980) han propuesto una acción moduladora del calcio sobre la dinámica lipídica de la membrana plasmática de hepatocitos de rata. Dicha acción parece llevarse a cabo mediante dos mecanismos que permiten al catión modificar la fluidez lipídica:

- Mecanismo directo: implicaría la unión del calcio a sitios aniónicos de la bicapa. Puede ser revertido en presencia de un exceso de EDTA.
- Mecanismo indirecto: supondría la estimulación de ciertas enzimas ligadas a membrana y que alteran la composición lipídica de ésta. No es revertido por agentes quelantes como el EDTA.

Alternativamente, y puesto que la fluidez de la membrana podría modular funciones como permeabilidad y actividades enzimáticas (por ejemplo la Ca^{++} -ATPasa, Ohta et al., 1989), las alteraciones en la microviscosidad deberían dar lugar a su vez a un aumento de la concentración intracelular de Ca^{++} .

La complejidad de esta cascada de fenómenos hace que uno de los principales problemas radique en determinar si la peroxidación lipídica es una causa o una consecuencia de las alteraciones de la membrana plasmática (Kappus, 1987).

Considerando las interrelaciones existentes entre la peroxidación lipídica, la concentración intracelular de calcio y la microviscosidad (Watanabe et al., 1990) y puesto que tanto los radicales libres de O_2 como el calcio se acumulan en el hígado durante el shock (Fantone & Ward, 1982; Deaciuc & Spitzer, 1987; Flohé & Giertz, 1987), se puede postular que las alteraciones de las propiedades físico-funcionales de la membrana celular ocasionadas por radicales libres de oxígeno (y/o el LPS), juegan un papel fundamental en la citotoxicidad de la endotoxina, actuando el calcio acumulado como un amplificador de la alteración de la membrana, que ha sido dañada por los radicales.

Según esta teoría, el uso de scavengers conduciría a un mejor funcionamiento de los distintos órganos afectados durante la endotoxemia, como efectivamente ha sido comprobado por distintos autores (Kuminoto et al., 1987; Sugeno et al., 1987; Seekamp et al., 1988).

2.5.5. Niveles de citocromo b_5 .

La utilización del modelo *in vitro* mediante el tratamiento directo de hepatocitos en cultivo con LPS, ha permitido estudiar las alteraciones inducidas en los niveles de citocromo b_5 , de forma paralela a lo realizado con el modelo de shock endotóxico reversible (Discusión, apdo. 1.3.).

Estos estudios *in vitro* vuelven a poner de manifiesto un aumento de los niveles de dicho citocromo a las 4 y 6 horas de incubación de las monocapas con la endotoxina, no existiendo una relación de dependencia con la dosis empleada de LPS (Fig. 58). Existe, por tanto, una acción directa sobre los hepatocitos.

Esta respuesta celular puede hacer referencia no sólo a una activación de los procesos de detoxificación, sino también a la necesidad de incrementar la reparación y remodelación de la membrana (Schenkman et al., 1976; Nagi et al., 1983) que ha resultado parcialmente dañada tras el tratamiento con LPS (Discusión, apdo. 2.3.). Asimismo, el aumento de la biosíntesis de metabolitos relacionados con la respuesta inflamatoria (ácido araquidónico y sus

derivados) podría relacionarse con el incremento observado de los niveles de citocromo b_5 , (Cook *et al.*, 1982).

Por otra parte, estudios *in vitro* han demostrado que la incorporación del citocromo b_5 a la cadena de electrones dependiente de NADPH, reduce la formación de H_2O_2 , (Gorsky & Coon, 1986; Jansson & Schenkman, 1987). La explicación dada por estos autores se basa en que el citocromo b_5 proporciona electrones al complejo intermedio $\{O_2^- \cdot Fe^{++}$ -citocromo P450-sustrato} más rápidamente que la NADPH-P450 oxidoreductasa. Así, la ausencia de b_5 , facilita la generación de un exceso de O_2^- y H_2O_2 . En consecuencia, los elevados niveles de este citocromo desarrollados tras el tratamiento *in vivo* e *in vitro* con LPS, podrían suponer un intento por parte de la célula de disminuir la producción de radicales libres resultantes de un mecanismo activado de detoxificación NADPH-dependiente. Adicionalmente, dicha incorporación de citocromo b_5 a la cadena electrónica dependiente de NADPH, es activada por cationes divalentes como el Ca^{++} (Tamura *et al.*, 1990). El incremento de calcio inducido por la endotoxina a nivel hepático (Discusión, apdo. 2.5.6.) favorecería el hecho de que el citocromo b_5 , suplemente al P450 en los procesos de detoxificación.

2.5.6. Homeostasis del calcio intracelular.

Algunas de las alteraciones metabólicas y funcionales producidas durante el shock endotóxico, han sido interpretadas como consecuencias de una acumulación de calcio en hígado y corazón de rata (Deaciuc & Spitzer, 1987). También se ha comprobado que la administración de bloqueantes de Ca^{++} (verapamil, nivaldipina, nitrendipina), previa al tratamiento con la endotoxina, produce en ratas una reducción dosis-dependiente de la mortalidad (Lee & Lum, 1986).

Los resultados obtenidos tras el tratamiento directo de hepatocitos en suspensión con endotoxina, indican que ésta produce un significativo incremento del contenido citosólico de Ca^{++} (Fig. 59 y Tabla 27). Este incremento es directamente dependiente de la dosis y del tiempo de incubación con el LPS. Todo ello concuerda con el aumento del contenido hepático total de calcio observado *in vivo* durante el shock endotóxico (Deaciuc & Spitzer, 1987) y con la acción protectora de los bloqueantes mencionados (Lee & Lum, 1986).

La concentración de Ca^{++} citosólico, muy inferior a la extracelular, está mantenida por distintos mecanismos que controlan el intercambio del catión con el medio extracelular así como con las reservas intracelulares (Rasmussen & Barret, 1984). La existencia de este importante gradiente de concentración entre el exterior y el citosol hace posible la generación de respuestas inmediatas ante estímulos extracelulares que desencadenan la entrada de dicho catión. Sin embargo, una elevación inapropiada de la concentración intracelular de calcio, como la producida por el LPS en los hepatocitos, puede producir graves alteraciones metabólicas así como la activación de procesos citolíticos (Farber, 1981; Joffe *et al.*, 1981; Carafoli, 1982; Baracos *et al.*, 1986).

Estudios previos demostraron que el tratamiento de células del parénquima hepático con endotoxina ($100\mu\text{g}/10^6$ Pc/10min/ 37°C), incrementa la incorporación de $^{45}\text{Ca}^{++}$ extracelular en más de un 20% respecto a la control, pudiendo relacionarse con alteraciones estructurales y/o funcionales de la membrana plasmática, inducidas por el LPS (Portolés, 1984). No obstante, esta mayor incorporación del catión no puede justificar por sí misma el alto contenido citosólico observado con Fura-2, que es superior en un $\approx 60\%$ (10min/ 37°C) al determinado en células control (Fig. 59).

Con el fin de conocer si la endotoxina producía una movilización de calcio de las reservas intracelulares, se llevaron a cabo ensayos con hepatocitos en cultivo tratados con LPS en presencia y ausencia de calcio extracelular. Estos estudios demostraron que la endotoxina incrementa la concentración citosólica de este catión aun cuando no esté presente en el medio de incubación, siendo este aumento aproximadamente las 2/3 partes del efecto observado cuando el medio de incubación posee Ca^{++} (Tabla 28). Así pues debe existir una importante movilización de las reservas intracelulares de Ca^{++} inducida por el LPS tanto en hepatocitos en suspensión como en cultivo primario.

Dicha influencia parece claramente debida a una acción directa de la endotoxina sobre la célula, implicando la interacción con estructuras subcelulares. Mediante la técnica de inmunomarcaje con oro coloidal (LPS-proteína A-Au) y la posterior observación por microscopía electrónica, ha sido analizada la incorporación de endotoxina por los hepatocitos, desde su unión a la membrana plasmática hasta su penetración alcanzando orgánulos subcelulares (Municio et al., 1990; Diaz-Laviada et al., 1991). Probablemente una interacción directa del LPS con mitocondrias y/o retículo endoplásmico, podría perturbar los mecanismos de transporte a través de membrana implicados en la homeostasis del calcio (Becker et al., 1980) induciendo el aumento demostrado de la concentración citosólica de este catión. A este respecto se ha asignado un importante papel a la bomba de Ca^{++} ATP-dependiente (Lowrey et al., 1981; Landon et al., 1986). Así, la disminución en los niveles de ATP característica del shock, podría también colaborar al desarrollo de la dishomeostasis del calcio intracelular.

Otro aspecto a tener en cuenta es la distinta respuesta de Pc y NPe frente al LPS en lo que a la concentración intracelular de calcio se refiere. Estudios preliminares realizados mediante citometría de flujo ponen de manifiesto que los macrófagos de Kupffer tratados con LPS, sufren una elevación instantánea de los niveles citosólicos del catión, pero que inmediatamente se igualan con los valores control. Sin embargo, en los hepatocitos la elevación de la $[\text{Ca}^{++}]_i$ se mantiene incluso a los 30min, siendo por tanto una respuesta no puntual sino continua y progresiva a lo largo del tiempo (Figs. 60 y 61).

Esto se relacionaría con un diferente mecanismo de incorporación del LPS por Pc y NPe ya que en este último caso se ha propuesto un proceso fagocítico, que podría producir el inmediato incremento de la concentración intracelular de calcio dado el papel clave de este catión en los procesos microtúbulo-dependientes (Espinal, 1989).

Además, datos recientes sugieren que la exposición de macrófagos al LPS induce la hidrólisis de fosfatidilinositol hasta 1,4,5-inositol-trifosfato (IP₃) y diacilglicerol, conduciendo

a un aumento de la $[Ca^{++}]$, y a la activación de la proteína quinasa C (Weiel *et al.*, 1986; Prpic *et al.*, 1987). Ello explicaría también los resultados obtenidos con macrófagos hepáticos.

Por otra parte, la peroxidación lipídica consecuencia de unos niveles anormalmente elevados de radicales libres de oxígeno (Discusión, apdos. 2.5.2 y 2.5.3.), parece alterar la homeostasis del calcio (Cronenwett *et al.*, 1989; Franceschi *et al.*, 1990) posiblemente determinando la formación de ionóforos que aumentan la incorporación de Ca^{++} (Franceschi *et al.*, 1990). También se han observado en células del endotelio alteraciones morfológicas relacionadas con un aumento de los niveles de calcio y que revierten con el uso de SOD y catalasa. Dichas alteraciones morfológicas implican disminución del perímetro celular con adquisición de una forma redondeada (Franceschi *et al.*, 1989) y han sido igualmente observadas en hepatocitos tras el tratamiento con LPS (Pagani *et al.*, 1988). Se podría, por tanto, pensar que el efecto de la endotoxina sobre la $[Ca^{++}]$ citosólico esté mediado, al menos parcialmente, por radicales libres de oxígeno.

El Ca^{++} a su vez, alteraría el metabolismo celular hepático, mediante la activación de enzimas catabólicas como fosfolipasas, proteasas y endonucleasas, que pueden llegar a ocasionar un daño celular irreversible (Nicotera *et al.*, 1986; Starke *et al.*, 1986).

Todo ello indica que los cambios en la concentración intracelular de calcio podrían justificar muchas de las alteraciones inducidas por el LPS durante los procesos de endotoxemia (McLeish *et al.*, 1989).

2.5.7. pH intracelular.

Los ensayos de determinación del pH, han permitido comprobar que el LPS disminuye de forma tiempo-dependiente el pH citoplasmático de hepatocitos en cultivo (Tabla 29). Esto concuerda con la lactoacidosis observada *in vivo* (Nishijima *et al.*, 1973; Schumer, 1983*) (Discusión, apdo. 2.3.1.) así como con los resultados obtenidos en los estudios de viabilidad realizados con hepatocitos y la sonda fluorescente FDA (Discusión, apdo. 2.3.2.).

En estas células, ha sido demostrado que un pH ácido suprime drásticamente la ureogénesis y la gluconeogénesis, de tal modo que estas rutas no pueden ser estimuladas de forma efectiva por los principales reguladores hormonales (Kashiwagura *et al.*, 1985). Por tanto y puesto que durante la endotoxemia *in vivo* es inhibida la gluconeogénesis hepática (Filkins & Cornell, 1974), dicha inhibición podría estar relacionada con la acidificación citosólica inducida en los hepatocitos por una acción directa del LPS.

Por otra parte, pequeños cambios del pH, también pueden tener un efecto importante sobre la concentración intracelular de AMP_c , de manera que la acidificación o alcalinización intracelulares implicarían una disminución o incremento, respectivamente, de la actividad de la adenilato ciclasa (Busa & Nuccitelli, 1984). Ello concuerda con la inhibición que el LPS produce sobre la síntesis de AMP_c y sobre la gluconeogénesis estimuladas por glucagón en hepatocitos (Pagani *et al.*, 1985).

Además, la $[H^+]_i$ puede estar relacionada con el intercambio Ca^{++}/H^+ postulado para la Ca^{++} -ATPasa (Niggli *et al.*, 1982). El exceso de calcio citosólico comprobado en hepatocitos tratados con LPS, podría dar lugar a una entrada excesiva de H^+ extracelulares como consecuencia del intento por parte de la célula de disminuir la $[Ca^{++}]_i$. De hecho, en vesículas endocíticas se ha postulado que la bomba de Ca^{++} puede regular el proceso de acidificación y por tanto la ruta intracelular de ligandos y receptores (Núñez *et al.*, 1990).

También se ha observado que la acidificación del citoplasma celular reduce considerablemente la endocitosis de transferrina y EGF mediada por sus receptores (Sandvig *et al.*, 1987). Paralelamente, el LPS inhibe la endocitosis de la insulina (Discusión, apdo. 2.4.2.), inhibición a la que podría contribuir la disminución del pH, ahora puesta de manifiesto.

2.6. INTERACCION CELULAS NO PARENQUIMATOSAS (NPc) ↔ CELULAS PARENQUIMATOSAS (Pc).

Los resultados de los experimentos realizados en este sentido, muestran que el medio de incubación de las NPc no altera la funcionalidad de las Pc puesto que se mantiene el transporte de $[^{14}C]$ -2-desoxiglucosa igual que en medio William's (Tabla 32).

Las NPc (Kc fundamentalmente) parecen secretar factores que determinan un aumento de la actividad extracelular de la GOT en cultivos de hepatocitos (Tabla 30). Dicho efecto es potenciado por la incubación de los macrófagos con LPS, lo cual confirma la activación celular inducida *in vivo* por la endotoxina en las células de Kupffer (Spitzer *et al.*, 1990) y puesta de manifiesto en los estudios de incorporación de $[^{14}C]$ -2-desoxiglucosa (Discusión, apdo. 2.4.1.) así como en los estudios referentes a la capacidad oxidativa (Discusión, apdo. 2.5.2.) y al calcio intracelular (Discusión, apdo. 2.5.6.).

No obstante, la influencia de los sobrenadantes de los macrófagos de Kupffer sobre los hepatocitos, podría ser debida a la presencia conjunta de mediadores con el LPS y/o LPS modificado por las Kc, ya que sobrenadantes obtenidos 48 horas después de un pulso (2h) con LPS (100µg/ml), no incrementan la actividad extracelular de GOT en hepatocitos. También podría pensarse en una degradación de los mediadores secretados como causa de esta ausencia de efecto.

El efecto potenciador del LPS sobre la actividad extracelular de GOT en hepatocitos, va disminuyendo a medida que aumenta el tiempo de incubación LPS-NPc (Tabla 31): podría ser consecuencia de una metabolización progresiva de la endotoxina por las células sinusoidales, lo cual determinaría una disminución de su capacidad inductora de secreción de mediadores solubles. Esta metabolización ha sido demostrada en estudios *in vitro* con células de Kupffer y, no obstante, no parece implicar destoxificación total de la endotoxina (Van Bossuyt, 1989).

Por tanto, si bien se ha demostrado una acción directa de la endotoxina sobre Pc y NPc, la interacción entre las distintas poblaciones celulares hepáticas sigue siendo un punto clave en la instauración y desarrollo de los estados de endotoxiosis.

SHOCK ENDOTOXICO

SHOCK ENDOTOXICO REVERSIBLE



MEDIADORES ↔ *LPS ↔ HIPOXIA

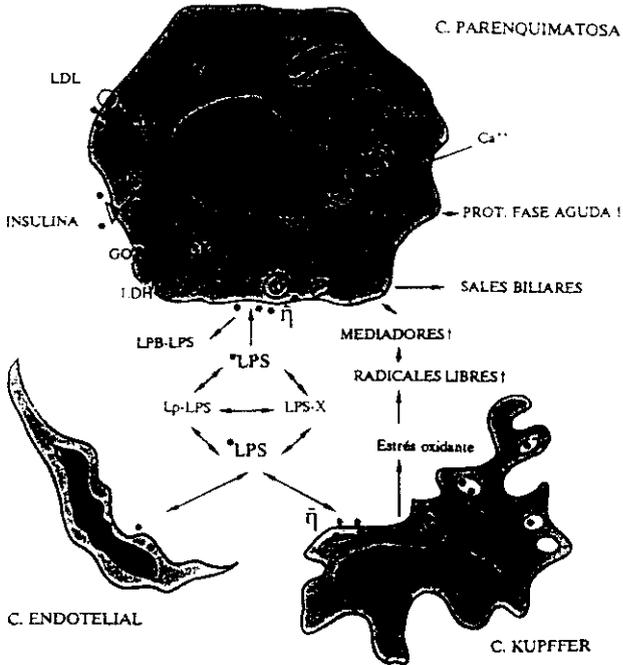
DAÑO HEPATICO

RADICALES LIBRES DE OXIGENO

PEROXIDACION LIPIDICA

ALTERACION DE MEMBRANA

DESTOXIFICACION



V. CONCLUSIONES.

La acción de las endotoxinas bacterianas sobre el hígado ha sido investigada en el presente trabajo utilizando los siguientes modelos experimentales:

- a) Inducción de un estado de *shock endotóxico reversible* en ratas mediante la administración *in vivo* del lipopolisacárido de *E.coli 0111:B4* (LPS).
- b) Tratamiento directo *in vitro* de distintos tipos celulares hepáticos (hepatocitos y macrófagos de Kupffer) en suspensión y en cultivo con dicho lipopolisacárido, así como el tratamiento de las células del parénquima con sobrenadantes de células sinusoidales.

Los resultados obtenidos con ambos modelos, *in vivo* e *in vitro*, conducen a las conclusiones que se detallan a continuación.

1. Acción del LPS *in vivo*:

- 1.1. La actividad de la enzima superóxido dismutasa disminuye en el hígado durante la *fase aguda del shock* (4-6h) como respuesta al estrés oxidante, aumentando en la *fase de recuperación* (24-72h).
- 1.2. La peroxidación lipídica hepática aumenta como consecuencia de la producción de radicales libres de oxígeno de la *fase aguda*, disminuyendo en la *fase de recuperación*.
- 1.3. Los niveles de citocromo b_5 en el hígado se elevan notablemente a las 4-6 horas de la inyección del LPS, revirtiendo el efecto a las 24 horas del tratamiento.

Todo ello indica una participación activa de los mecanismos de producción de radicales libres y peroxidación lipídica en la alteración hepática, así como la importancia de los mecanismos de detoxificación y remodelación de membranas en la respuesta al *shock*. Los experimentos *in vivo* no permiten diferenciar entre acción directa o indirecta del LPS, por lo que se analizó la acción del LPS *in vitro*.

2. Acción del LPS *in vitro*:

2.1. El LPS ejerce su acción sobre el hígado de forma directa en los siguientes aspectos:

2.1.1. Morfología celular: se ha comprobado que la incorporación de la endotoxina (técnicas isotópicas e inmunocitoquímicas) en células sinusoidales enriquecidas en macrófagos de Kupffer origina la aparición de alteraciones estructurales relacionadas con una rápida activación celular.

2.1.2. Propiedades físicas de la membrana plasmática: la integración del LPS en la membrana induce un incremento de su microviscosidad, tanto en la zona externa como en el interior de la bicapa y el efecto es dependiente de la temperatura. Las alteraciones producidas por la endotoxina sobre la membrana plasmática favorecen la liberación de LDH al medio extracelular, así como la incorporación de la sonda FDA.

2.1.3. Unión de ligandos: la interacción insulina-receptor y LDL-receptor se ve dificultada como consecuencia de la preincubación de las células con endotoxina, apreciándose en el primer caso una disminución de la internación mediada por receptor y en el segundo un incremento de la incorporación inespecífica del ligando.

2.1.4. Actividades enzimáticas: la actividad intracelular de la enzima glucoquinasa se ve incrementada tras tiempos largos de incubación con el LPS. Sin embargo, la fosfatasa ácida, enzima marcadora de lesión lisosomal, no experimenta variación de su actividad como consecuencia del tratamiento directo de los hepatocitos con endotoxina.

2.1.5. Superóxido dismutasa y peroxidación lipídica: la disminución de la actividad hepática de la SOD observada *in vivo* (fase aguda del shock) y relacionada con una mayor producción de radicales libres de oxígeno, implica la contribución no sólo de los macrófagos de Kupffer sino también de las células del parénquima, puesto que el tratamiento directo con LPS *in vitro* incrementa la capacidad oxidativa de las células no parenquimatosas y disminuye la actividad de la SOD en las parenquimatosas. Ello además parece ser la causa del incremento paralelo de los procesos de peroxidación lipídica que ha sido comprobado igualmente tras tratamiento *in vivo* e *in vitro* con endotoxina.

2.1.6. Niveles de citocromo b_5 : durante la fase aguda del *shock* endotóxico reversible se ven incrementados notablemente, al igual que ocurre tras el tratamiento directo de las células parenquimatosas con LPS. Ello podría corresponder a un intento por parte de la célula de reparar las alteraciones producidas en la membrana plasmática y de potenciar el transporte electrónico microsomal necesario en los procesos de detoxificación, alterados por la disminución de los niveles de citocromo P450.

2.1.7. Calcio citosólico: el LPS induce un aumento notable de sus niveles en los hepatocitos como consecuencia de un incremento de la incorporación de calcio extracelular y de una movilización activa de las reservas intracelulares. Ello concuerda con el acúmulo hepático de este catión durante los estados de endotoxemia.

2.1.8. pH intracelular: el LPS disminuye el pH_i de los hepatocitos pudiendo alterar con ello numerosos procesos metabólicos celulares y relacionándose este efecto directo con la acidosis metabólica característica del *shock in vivo*.

2.2. Las distintas poblaciones celulares hepáticas responden de forma diferente ante el LPS:

2.2.1. El incremento de la microviscosidad producido en la membrana plasmática tras la interacción con la endotoxina es mucho más evidente en condiciones no fluidificantes (temperatura baja, zona externa de la bicapa, membranas con elevado contenido en esfingomielina). Ello determina un comportamiento diferente de las células parenquimatosas y no parenquimatosas. En éstas se debe considerar además un aumento de fluidez producido durante el proceso de fagocitosis del LPS por los macrófagos de Kupffer.

2.2.2. La endotoxina activa específicamente y rápidamente el metabolismo celular de los macrófagos hepáticos, de manera que a dosis bajas induce un incremento de la incorporación de [¹⁴C]-2-desoxiglucosa y de la intensidad de fluorescencia procedente de la hidrólisis del FDA por esterasas citoplasmáticas. Sin embargo, en los hepatocitos la acción del LPS sobre estos parámetros produce el efecto contrario.

2.3. Existen diversos compuestos que modulan la respuesta celular hepática frente a la endotoxina:

2.3.1. Las sales biliares, posiblemente por una interacción con las moléculas de lipopolisacárido, anulan los efectos de éste sobre la microviscosidad de la membrana plasmática.

2.3.2. Las lipoproteínas (HDL, LDL) que pueden formar complejos estables con el LPS, determinan un comportamiento especial de la endotoxina sobre los procesos de unión de las lipoproteínas a sus receptores celulares.

2.3.3. Factores secretados por cultivos enriquecidos en células de Kupffer modulan el metabolismo celular de los hepatocitos, aumentando la actividad extracelular de GOT en estos últimos, sobre todo tras el tratamiento de los macrófagos con LPS.

Los diferentes aspectos analizados en el presente trabajo aportan nuevos datos para el esclarecimiento de los mecanismos primarios de acción de los lipopolisacáridos bacterianos y apoyan el uso de cultivos celulares como modelo experimental para el estudio de las bases moleculares de la compleja fisiopatología del *shock* endotóxico.

VII. BIBLIOGRAFIA.

- Abecassis M., Falk J.A., Makowka L., Dindzans V.J., Falk R.E. & Levy G.A. (1987) *J. Clin. Invest.* 80:881-889.
- Altura B.M. (1983) *Handbook of Shock and Trauma* vol.I pp.51-95. B.M. Altura et al. (Eds.). Raven Press, New York.
- Altura B.M., Leffer A.M. & Schumer W. (1983) *Handbook of Shock and Trauma* vol.I pp.1-2. B.M. Altura et al. (Eds.). Raven Press, New York.
- Andersson S., Holmberg I. & Wikvall K. (1983) *J. Biol. Chem.* 258: 6777-6782.
- Anwer M.S., Little J.M., Oelberg D.G., Zimniak P. & Lester R. (1989) *P.S.E.B.M.* 191:147-152.
- Aoyama T., Nagata K., Yamazoe Y., Kato R., Matsunaga E., Gelboin H. & González F.J. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:5425-5429.
- Araci F.M., Bosch M.A. & Municio A.M. (1985) *Mol. Cell. Biochem.* 68:59-66.
- Arthur M.J.L., Bentley I.S., Tanner A.R., Kowalski-Saunders P., Millward-Sadler G.H. & Wright R. (1985) *Gastroenterology* 89:1114-1120.
- Aszalos A., Yang G.C. & Gottesman M.N. (1985) *J. Cell Biol.* 100:1357-1362.
- Bacon B.R., Healey J.F., Brittenham G.M., Park C.H. & Recknagel R.O. (1986) *Gastroenterology* 90:1844-1853.
- Balibrea J.L., García-Barreno P. & Municio A.M. (1978a) *Eur. Surg. Res.* 10:36-37.
- Balibrea J.L., García-Barreno P., García-Barreno B. Municio A.M. (1978b) *Int. J. Biochem.* 10:91-96.
- Ballet F. (1989) *Gastroenterol. Clin. Biol.* 13:712-719.
- Baracos V., Grossberg R. & Goldberg A.L. (1986) *Am. J. Physiol.* 250:E702-E710.
- Baumgartner J.D., Heumann D., Gerain J., Weinbreck P., Grau G.E. & Glauser M.P. (1990) *J. Exp. Med.* 171:889-896.
- Bautista A.P., Mézáros K., Bojta J. & Spitzer J.J. (1990) *J. Leukocyte Biol.* 48:123-128.
- Becker G.L., Fiacum G. & Lehninger A.L. (1980) *J. Biol. Chem.* 255:9009-9012.
- Beeson P.B. (1974) *J. Exp. Med.* 86:39-44.
- Behling U.H., Campbell B., Chang C.M., Rumpf C. & Nowotny A. (1976) *J. Immunol.* 117:847-852.
- Beisel W.R. (1975) *Annu. Rev. Med.* 26:9-14.
- Benedetti A., Marucci L., Perretti G., Curatola G., Jzebquel A.M. & Orlandi F. (1990) *J. Hepatol.* 10:144-148.
- Benedetto D.A., Shands J.W. Jr. & Shah D.O. (1973) *Biochim. Biophys. Acta* 298:145-157.
- Berlin R.D. & Fera J.P. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74:1072-1076.
- Berry L.J. (1977) *CRS Crit. Rev. Toxicol.* 5:239-318.
- Berry L.J. (1982) *Klin. Wochenschr.* 60:3-7.
- Berry L.J. & Friend D.S. (1969) *J. Cell. Biol.* 43:506-510.
- Berton G. & Gordon S. (1983) *Immunology* 49:693-680.
- Beutler B. & Cerami A. (1988) *Annu. Rev. Biochem.* 57:505-518.
- Bhagwande S.B., Apte M. & Manwarring L. (1987) *Med. Sci. Res.* 15:303-304.
- Bhakdi S., Tranum-Jensen J., Utermann G. & Füssie R. (1983) *J. Biol. Chem.* 258:5899-5904.
- Bhattacharya S., Balasubramanian S. & Simmons L.A. (1984) *Biochem. J.* 220:333-338.
- Billiar T.R., Curran R.D., Stuehr D.J., West M.A., Bentz B.G. & Simmons R.L. (1989) *J. Exp. Med.* 169:1467-176.
- Billiar T.R., Lysz T.W., Curran R.D., Bentz B.G., Machiedo G.W. & Simmons R.L. (1990) *J. Leukocyte Biol.* 47:304-311.
- Birmelin M. & Decker K. (1983) *Eur. J. Biochem.* 131:539-543.
- Birnbaum M.J. & Fain J.N. (1977) *J. Biol. Chem.* 252:528-535.
- Bissel D.M. & Hammaker L.E. (1976) *Arch. Biochem. Biophys.* 176:91-102.
- Blackburn G.L. (1977) *Am. J. Clin. Nutr.* 30:1321-1333.
- Bladen H.A. & Mergenhagen S.E. (1964) *J. Bacteriol.* 88:1462.
- Blouin A. (1977) *Kupffer Cells and Other Liver Sinusoidal Cells*, pp.61-71. E. Wisse & D.L. Knook (Eds.). Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam.
- Bode C., Kugler V. & Bode J.C. (1987) *J. Hepatol.* 4:8-14.
- Boivin A. & Mesrobian L. (1933) *C. R. Soc. Biol.* 113:490-494.
- Bond R.F. (1984) *Mediator Mechanisms in Shock* 68th Annual Meeting of the Federation of American Societies for Experimental Biology, St. Louis, Missouri.
- Bonfils C., Baily C. & Maurer F. (1981) *J. Biol. Chem.* 256: 9457-9465.
- Borden C. & Hale W. (1951) *N. Engl. J. Med.* 245:760-763.
- Bors W., Buettner G.R., Michel C. & Saran M. (1990) *Arch. Biochem. Biophys.* 278:269-272.
- Bosch M.A., García R., Paganí R., Portoiés M.T., Diaz-Laviada I., Abarca S., Ainaga M.J., Risco C. & Municio A.M. (1988) *Brit. J. Exp. Path.* 69:805-812.
- Bosch M.A., Risco C. & Municio A.M. (1990) *Mol. Cell. Biochem.* 93:167-172.
- Bosterling B., Trudell J.R., Trevor A.J. & Bendix M. (1982) *J. Biol. Chem.* 257:4375-4379.
- Boughton-Smith N.K., Hutchison I. & Whittle B.J.R. (1989) *Prostaglandins* 38:319-333.
- Bouwens L., Backeland M., De Zanger R. & Wisse E. (1986) *Hepatology* 6:718-722.
- Bouwens L., Remels L., Backeland M., Van Bossuyt H. & Wisse E. (1987) *Eur. J. Immunol.* 17:37-42.
- Boyer J.L. (1976) *Physiol. Rev.* 60:303-326.

- Brade H., Brade L., Schade U., Zahringer U., Holst O., Kuhn H.M., Rozalski A., Rohrscheidt E. & Rietschel E.T. (1988) "Bacterial Endotoxins: Pathophysiological Effects, Clinical Significance and Pharmacological Control, Progress in Clinical Biological Research", pp. 17-43. J. Levin, S.J.H. Van Deventer & A. Sturk (Eds.). Alan R. Liss, New York.
- Bradley S.G. (1976) *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 151:267-271.
- Bradley S.G. (1979) *Ann. Rev. Microbiol.* 33:67-71.
- Bradley S.G. (1985) "Handbook of Endotoxin" vol. 3:340-371. L.J. Berry (Ed.). Elsevier Sci. Publ., Amsterdam.
- Bradley S.G. & Bond J.S. (1975) *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 31:208-213.
- Bradley S.G., Munson A.E., Dewey W.L. & Harris L.S. (1977) *Infect. Immun.* 17:325-330.
- Brandenburg K. & Seydel U. (1988) *Eur. Biophys. J.* 16:83-94.
- Brandenburg K. & Seydel U. (1990) *Eur. J. Biochem.* 191:229-236.
- Brass E.P., Alford C.E. & Garrity M.J. (1987) *Biochim. Biophys. Acta* 930:122-128.
- Braude A.I., Williams D., Siemieniowski J. & Murphy R. (1953) *Arch. Intern. Med.* 92:75-82.
- Brawn K. & Fridovich I. (1981) *Arch. Biochem. Biophys.* 206:414-419.
- Brill N.E. & Libman E. (1899) *Am. J. Med. Sci.* 118:153-159.
- Brown M.S. & Goldstein J.L. (1983) *J. Clin. Invest.* 72:743-747.
- Brown M.S. & Goldstein J.L. (1986) *Science* 232:34-47.
- Bruch R.C. & Thayer W.S. (1983) *Biochim. Biophys. Acta* 733:216-222.
- Buit H. & Herman A.G. (1983) *Biochem. Pharmacol.* 32:2523-2528.
- Buit H., Herman A.G. & Rampart M. (1985) *Br. J. Pharmacol.* 84:317-321.
- Burchett S.K., Weaver W.M., Westall J.A., Larsen A., Kronheim S. & Wilson C.B. (1988) *J. Immunol.* 140:3473-3478.
- Busa W.B. & Nuocitelli R. (1984) *Am. J. Physiol.* 246(Regulatory Integrative Comp. Physiol. 15):R409-R438.
- Cahill C.J. (1983) *Br. J. Surg.* 70:590-595.
- Cahill C.J., Pain J.A. & Bailey M.E. (1987) *Surg. Gynecol. Obstet.* 165:519-522.
- Camera D.S., Caruana J.A., Schwartz K.A., Montes M. & Nolan J.P. (1983) *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 172:255-260.
- Cano M.J., Soriano J., Monturiol J., Garcia-Dorado D., Desco M., Del Cañizo F.J. & Garcia-Barreno P. (1988) *Eur. Surg. Res.* 20:108-112.
- Canova-Davis E. & Waskell L. (1984) *J. Biol. Chem.* 259: 2541-2546.
- Carafoli E. (1982) "Pathophysiology of Shock, Anoxia and Ischemia" pp. 95-112. R.A. Cowley & B.F. Trump (Eds.). Williams & Wilkins, Baltimore, MD.
- Carleman E., Gratuño R.M. & Villiger W. (1982) *J. Microsc.* 126:123-128.
- Carr C. & Morrison D.C. (1984) *Rev. Infect. Dis.* 6:497-500.
- Cavanagh D., Rao P.S. & Comas M.R. (1977) "Major Problems in Obstetrics and Gynecology" vol. 11:1-129. W.B. Saunders (Ed.). Philadelphia.
- Chen T.Y., Bright S.W., Pace J.L., Russel S.W. & Morrison D.C. (1990) *J. Immunol.* 145:8-14.
- Chiang J.Y.L. (1981) *Arch. Biochem. Biophys.* 211:662-667.
- Chokri M., Freudenberg M., Galanos C., Poindron P. & Bartholeyns J. (1989) *Anticancer Res.* 9:1185-1190.
- Chow C.K. & Tappel A.L. (1972) *Lipids* 7:518-524.
- Clowes G.H.A., O'Donnell T.F., Ryan N.T. & Blackburn G.L. (1974) *Ann. Surg.* 179:684-687.
- Clowes G.H.A., Martin H., Walji S., Hirsch E., Gazitua R. & Goodfellow R. (1978) *Am. J. Surg.* 135:577-581.
- Coleman R., Lowe P.J. & Billington D. (1980) *Biochim. Biophys. Acta* 599:294-300.
- Combettes L., Berthon B., Doucet E., Erlinger S. & Claret M. (1990) *Eur. J. Biochem.* 190:619-623.
- Comporti M. (1985) *Lab. Invest.* 53:599-623.
- Conde G. (1982) *Tesis Doctoral*, Facultad de Ciencias Químicas.
- Conde G., García-Barreno P., Municio A.M. & Suárez A. (1981) *FEBS Lett.* 127:115-120.
- Cook K.R., Halushka P.V. & Wise W.C. (1982) *Circ. Shock* 9:605-617.
- Cook J.A., Wise W.C. & Halushka P.V. (1985) *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 235:470-475.
- Crestani M., De Fabiani E., Malvasi B., Cancellieri M., Galli G. & Bosio E. (1989) *Chem. Phys. Lipids* 51:119-126.
- Crile G.W. (1899) "An Experimental Research into Surgical Shock". Lippincott, Philadelphia.
- Cronenwet J.L., Lee K.R., Shlafer M. & Zelenock G.B. (1989) *Microcirc. Endoth. Lymphatics* 5:172-187.
- Cuthbertson D.P. (1932) *Q. J. Med.* 1:233-238.
- Dacher C., Motta C., Neufcour D. & Jacotot B. (1990) *Biochim. Biophys. Acta* 1046:64-72.
- Dailey H.A. & Strittmatter P. (1980) *J. Biol. Chem.* 255:5184-5189.
- Darlington G.J., Wilson D.R. & Lachmann L.B. (1986) *J. Cell Biol.* 103:787-790.
- Davis C.G., Goldstein J.L., Sudhof T.C., Anderson R.G.W., Russell D.W. & Brown M.S. (1987) *Nature* 326:760-765.
- De Marco G.J. & McCoy G.D. (1985) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 128:621-627.
- Deaciacu I.V. & Spitzer J.A. (1987) *Cell Calcium* 8:365-376.
- Deaciacu I.V. & Spitzer J.A. (1988) *Circ. Shock* 25:1-7.
- Diamond T., Dolan S., Thompson R.L.E. & Rowlands B.J. (1990) *Surgery* 108:370-375.
- Diaz-Laviada I., Aínaga M.J., Portolós M.T., Carrascosa J.L., Municio A.M. & Pagani R. (1991) *Histochem. J.* 23: (en prensa).
- Dijkstra J., Mellors J.W., Ryan J.L. & Szoka F.C. (1987) *J. Immunol.* 138:2663-2670.
- Dijkstra J., Larrick J.W., Ryan J.L. & Szoka F.C. (1988) *J. Leukocyte Biol.* 43:436-444.
- Dijkstra J., Mellors J.W. & Ryan J.L. (1989) *Infect. Immun.* 57:3357-3363.

- Ding A. & Nathan C. (1988) *J. Exp. Med.* 167:1154-1159.
- Ding A.H., Porteu F., Sánchez E. & Nathan C.F. (1990) *Science* 248:370-372.
- Dixon R.E. (1978) *Ann. Intern. Med.* 89:749-753.
- Donner R.B. (1982) *Biochem. J.* 208:211-219.
- Doolittle R.L. & Richter G.W. (1981) *Lab. Invest.* 45:558-566.
- Dunham C.M. (1982) *Shock Trauma and Critical Care Manual* pp.59-68. R.A. Cowley y C.M. Dunham (Eds.) University Park Press, Baltimore.
- Enoch H.G. & Strittmatter P. (1979) *J. Biol. Chem.* 254:8976-8981.
- Espinal J. (1989) *Understanding Insulin Action: Principles and Molecular Mechanisms* chap.2:18-38. A. Wiseman (Ed.) Ellis Horwood Ltd., Chichester, England.
- Essabrook R.W. (1984) *Drug Metabolism and Drug Toxicity* pp. 1-20. J.R. Mitchell & M.E. Horning (Eds.) Raven Press, New York.
- Fantone J.C. & Ward P.A. (1982) *Am. J. Physiol.* 107:397-381.
- Farber J.L. (1981) *Life Sci.* 29:1289-1295.
- Fasano A., Budillon G., Guandalini S., Cuomo R., Parrilli G., Cangjotti A.M., Morrioni M. & Rubino A. (1990) *Digest. Dis. Sci.* 35:801-808.
- Faulk W.P. & Taylor G.M. (1971) *Immunochem.* 17:208-213.
- Fernández M.L. & McNemara D.J. (1990) *Biochim. Biophys. Acta* 1042:142-145.
- Fernández M.L. & Buchanan B.J. (1977) *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 155:216-220.
- Filkins J.P. & Cornell R.P. (1974) *Am. J. Physiol.* 227:778-781.
- Filkins J.P. & Heard S.O. (1990) *J. Surg. Res.* 49:186-196.
- Flad H.D., Kirchner H. & Raach K. (1989) *Lymphokine Res.* 8:227-233.
- Fletcher J.R., Disimone A.G. & Barnett M.A. (1990) *Annals of Surgery* 211:312-316.
- Flöhé L. & Gierth H. (1987) *Rev. Infect. Dis.* 9:553-5561.
- Flynn J.T. (1985) *Handbook of Endocrinology* vol.1. L.B. Hinshaw (Ed.) Elsevier, New York.
- Fox E.S., Thomas P. & Broitman S.A. (1988) *Hepatology* 8:1550-1554.
- Fox E.S., Thomas P. & Broitman S.A. (1989) *Gastroenterology* 96:456-460.
- Fox E.S., Broitman S.A. & Thomas P. (1990a) *Lab. Invest.* 63:733-741.
- Fox E.S., Broitman S.A. & Thomas P. (1990b) *Circ. Shock* 37:316-321.
- Franceschi D., Graham D., Sarasin M. & Zollinger R.M. (1990) *Surgery* 108:292-297.
- Franceschi D., Graham D., Sarasin M. & Zollinger R.M. (1990) *Surgery* 108:292-297.
- Fryn K.N. (1985) *Brit. Med. Bull.* 41: 232-239.
- Freudenberg M.A. & Galanos C. (1985) *Eur. J. Biochem.* 152:353-358.
- Freudenberg M.A., Bog-Hansen T., Back U. & Galanos C. (1980) *Infect. Immun.* 28:373-378.
- Freudenberg M.A., Bog-Hansen T., Back U. & Galanos C. (1984) *Rev. Infect. Dis.* 6:483-487.
- Freudenberg M.A., Klein B. & Galanos C. (1986) *Infect. Immun.* 51:891-897.
- Freudenberg M.A., Keppeler D. & Galanos C. (1986) *Br. J. Exp. Pathol.* 70:267-272.
- Fromm H. (1989) *Digest. Dis. Sci.* 34:215-235.
- Fukuda I., Tanamoto K., Kanegasaki S., Yajima A.F. & Abornathly C.O. (1986) *Life Sci.* 39:453-460.
- Gaeta G.B., Adinolfi L.D., Ulivi R., Tripodi M.F. & Abornathly C.O. (1986) *Mechanism of Action, Role in Disease and Therapy*, pp.187-193. B. Bosanvida & G. Grainger (Eds.), Basel, Karger.
- Galanos C. & Freudenberg M.A. (1990) *Tumor Necrosis Factor Source, Mechanism of Action, Role in Disease and Therapy*, pp.187-193. B. Bosanvida & G. Grainger (Eds.), Basel, Karger.
- Galanos C., Rietschel E.T., Lüderitz O., Westphal O., Kim Y.B. & Watson D.W. (1972) *Eur. J. Biochem.* 31:230-234.
- Galanos C., Lüderitz O., Rietschel E.T. & Westphal O. (1977) *The Biochemistry of Lipids II* vol.IV pp.239-334 T.W. Woodwin (Ed.) University Park Press, Baltimore.
- Galanos C., Lehmann V., Lüderitz O., Rietschel E.T., Westphal O., Brade H., Brade L., Freudenberg M.A., Hansen-Hagge T., Lüderitz T., Mckenzie G., Schade U., Strittmatter W., Tanamoto K., Zahring U., Imoto M., Yoshimura H., Yamamoto M., Shimamoto T., Kusumoto S. & Shiba T. (1984) *Eur. J. Biochem.* 140: 221-245.
- Gallin J.J., Kaye D. & O'Leary W.M. (1969) *N. Engl. J. Med.* 280:1081-1086.
- Gallin J.J., Kaye D. & Balibrea J.L. (1977) *Eur. Surg. Res.* 9:30-31.
- García-Barrero P. & Balibrea J.L. (1978a) *Surg. Gynecol. & Obstet.* 146:182-190.
- García-Barrero P. & Balibrea J.L. (1978b) *Surg. Gynecol. & Obstet.* 147:5-12.
- García-Barrero P. & Balibrea J.L. (1978c) *Surg. Gynecol. & Obstet.* 22:377-385.
- García-Barrero P. & Municio A.M. (1983) *J. Steroid Biochem.* 22:377-385.
- García R., Victoria D. & Municio A.M. (1990a) *Circ. Shock* 30:365-374.
- García R., Abarca S. & Municio A.M. (1990b) *Circ. Shock* 30:365-374.
- García R., Díaz-Laviada I., Bosch M.A., Abarca S., Portolés M.T., Risco C., Ainaga M.J., Pagani R., Municio A.M. & Escalona J. (1990b) *Histol. Histopath.* 4:43-48.
- Gauleté J., Richards C., Harnish D., Lansdorp P. & Baumann H. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:7251-7254.
- Ghezzi P., Saccardo B., Villa P., Rossi V., Bianchi M. & Dinarello C.A. (1986) *Infect. Immun.* 54:837-840.
- Ghuyssen J.M. (1977) *Cell. Surface Rev.* 4:463-467.
- Gibson G.G., Cinti D.L., Sligar S.G. & Schenckman J.B. (1980) *J. Biol. Chem.* 255:1867-1872.
- Girardin E., Grau G., Doyer J.M. & Lous-Lombard P. (1988) *N. Engl. J. Med.* 319:397-400.
- Giri S.N., Hyde D.M., Eman P. & Misra H.P. (1988) *Exp. Mol. Pathol.* 49:295-409.
- Gleson D., Smith N.D. & Boyer J.L. (1989) *J. Clin. Invest.* 84:312-321.
- Goldstein J.L. & Brown M.S. (1977) *Ann. Rev. Biochem.* 46:897-930.
- Goldstein J.L., Brown M.S., Anderson R.G.W., Russell D.W. & Schneider W.J. (1985) *Ann. Rev. Cell Biol.* 1:1-39.

- Gorasky L.D. & Coon M.J. (1986) *Drug Metab. Dispos.* 14:89-96.
- Grabarek J., Her G.R., Reinhold V.N. & Hawiger J. (1990) *J. Biol. Chem.* 265:8117-8121.
- Greer G.G. & Melazzo F.H. (1975) *Can. J. Microbiol.* 21:877-881.
- Grundin R., Moldes P., Vadi H., Orrenius S., Von Bahr C., Backstrom D. & Ehrenberg A. (1975) *Adv. Exp. Med. Biol.* 58: 251-257.
- Guillouzo A. (1986) "Isolated and Cultured Hepatocytes", Chap. 14:313-332. Guillouzo A. & Guguen-Guillouzo C. (Eds.), John Libbey Eurotext Ltd./INSERM, Paris.
- Gump F.E. (1983) "Handbook of Shock and Trauma" vol.1 pp.241-252 B.M. Altura et al (Eds.) Raven Press, New York.
- Gump F.E., Long C., Killian P. & Kinney J.M. (1974) *J. Trauma* 14:378-381.
- Haglund U. (1983) "Handbook of Shock and Trauma" vol.3:277-390. B.M. Altura et al. (Eds.). Raven Press, New York.
- Haigler H.T., Maxfield F.R., Willingham M.C. & Pastan I. (1980) *J. Biol. Chem.* 255:1239-1241.
- Hale D.J., Robinson J.A., Loeb H.S. & Gunnar R.M. (1986) "Handbook of Endotoxin" vol.4:1-17. R.A. Proctor (Ed.) Elsevier Science Publ. Amsterdam.
- Hamill R.J. & Maki D.G. (1986) "Handbook of Endotoxin" vol.4:55-126. R.A. Proctor (Ed.). Elsevier Science Publ., Amsterdam.
- Hardaway R.M. (1966) "Syndromes of Disseminated Intravascular Coagulation with Special References to Shock and Haemorrhage" C.C. Thomas y A. Springfield (Eds.) Illinois.
- Hatley R.H.M. & Franks F. (1986) *Cryo-Lett.* 7:226-230.
- Havekes L.M., Schouten D., De Wit E.C.M., Cohen L.H., Griffioen M., Van Hinsbergh V.W.M. & Princen H.M.G. (1986a) *Biochim. Biophys. Acta* 875:236-246.
- Havekes L.M., Verboom H., De Wit E.C.M., Yap S.H. & Princen H.M.G. (1986b) *Hepatology* 6:1356-1360.
- Hayter J.B., Rivera M. & McGroarty E.J. (1987) *J. Biol. Chem.* 262:5100-5105.
- Heath D.F. (1985) *Brit. Med. Bull.* 41:240-245.
- Heinzl F.P. (1990) *J. Immunol.* 145:2920-2924.
- Heremans H., Van Damme J., Dillen C., Dijkmans R. & Billiau A. (1990) *J. Exp. Med.* 171:1853-1856.
- Hinshaw L.B. (1972) "Shock in Low- and High-flow States" pp 245-249. B.K. Forscher, R.C. Lillehei y S.S. Stubbs (Eds.) Excerpta Medica, Amsterdam.
- Hinshaw L.B. (1976) *Circ. Shock* 3:1-10.
- Hinshaw L.B. & Cox B.G. (Eds.) (1972) "The Fundamental Mechanisms of Shock", Plenum Press, New York.
- Hinshaw L.B., Greenfield L.J., Owen S.E., Black M.R. & Guenter C.A. (1972) *Surg. Gynecol. Obstet.* 135:39-48.
- Hinshaw L.B., Beller-Tood B.K., Archer L.T. & Peyton M.D. (1983) "Handbook of Shock and Trauma" vol.1: 425-435. B.M. Altura et al. (Eds.) Raven Press, New York.
- Hinshaw L.B., Beller-Tood B.K., Archer L.T. & Schamer W. (1985) "The Reversible Step Toward Death". R.M. Hardaway (Ed.), J. Wright PSG Inc.
- Hinshaw L.B., Tekamp-Olson P., Chang A.C.K., Lee P.A., Taylor F.B. Jr., Murray C.K., Peer G.T., Emerson T.E. Jr., Passey R.B. & Kuo G.C. (1990) *Circ. Shock* 30:279-292.
- Hitchcock P.J., Leive L., Makeja P.H., Rietschel E.T., Strittmatter W. & Morrison D.C. (1986) *J. Bacteriol.* 166:699-703.
- Hlavica P. (1984) *Arch. Biochem. Biophys.* 228:600-605.
- Hofmann A.F. (1988) "The Liver Biology and Pathology" pp.553-572. I.M. Arias, W.B. Jakoby, H. Popper, D. Schachter & D.A. Shafritz (Eds.).
- Holley D.C. & Spitzer J.A. (1980) *Circ. Shock* 7:3-7.
- Hopf U., Stemerowicz R., Rodloff A., Galanos C., Möller B., Lobeck H., Freudenberg M. & Huhn D. (1989) *The Lancet* pp.1419-1421.
- Horibarger M., Rosset J. & Bauer H. (1975) *Experientia* 31:1147-1151.
- Horn T. & Christoffersen P. (1988) "Sinusoids in Human Liver. Health and Disease", pp.189-206. P. Bioulac-Sage & C. Balabaud (Eds.). The Kupffer Cell Foundation, Rijswijk, The Netherlands.
- Hunt G.R.A. & Jawaharlal K. (1980) *Biochim. Biophys. Acta* 601:678-684.
- Hunt J.S., Soares M.J., Lei M.G., Smith R.N., Wheaton D., Atherton R.A. & Morrison D.C. (1989) *J. Immunol.* 143:1606-1609.
- Inai Y. (1981) *J. Biochem.* 89:351-362.
- Inauen W., Suzuki M. & Granger D.N. (1989) *Microcirc. Endoth. Lymphatics* 5:143-155.
- Ingelman-Sundberg M. & Johansson I. (1980) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 97: 582-589.
- Innes G.K., Fuller B.J. & Hobbs K.E.F. (1988) *In Vitro Cell. Develop. Biol.* 24:126-132.
- Issekutz A.C., Megyeri P. & Issekutz T.B. (1987) *Lab. Invest.* 56:49-59.
- Jacobs D.M. & Price R.M. (1987) *Adv. Med. Exp. Biol.* 216A:691-699.
- Jansson I. & Schenkman J.B. (1987) *Drug Metab. Dispos.* 15:344-348.
- Jansson I., Tamburini P.P., Fvreau L.V. & Schenkman J.B. (1985) *Drug Metab. Dispos.* 13:453-458.
- Joffe M., Savage N. & Isaacs H. (1981) *Biochem. J.* 196:663-667.
- Kabir S., Roseinreich D.L. & Mergenhagen S.E. (1978) "Bacterial Toxins and Cell Membranes" pp.59-83. J. Jeljaszewicz y T. Wadström (Eds.) Academic Press, New York.
- Kappus H. (1967) *Chem. Phys. Lipids* 45:105-115.
- Kereck U., Peters T. & Decker K. (1988) *J. Hepatol.* 7:352-361.
- Kashiwagura T., Erocinka M. & Wilson D.F. (1985) *J. Biol. Chem.* 260:407-414.
- Kauffmann R.L., Matson C.E. & Beisei W.R. (1976) *J. Infect. Dis.* 133:548-553.

- Kawada N, Mizoguchi Y, Shin T, Tsutsui H, Kobayashi K, Morizawa S, Monna T. & Yamamoto S. (1990) *Prostaglandins Leukotrienes & Ess. Fatty Acids* 40:275-279.
- Koefoe E.B., Scharschmidt B.F., Blankenship N.M. & Ockner R.K. (1979) *J. Clin. Invest.* 64:1590-1598.
- Kelly C.L., Kiechle F.L. & Jarett L. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:1089-1092.
- Keppler D., Hagmann W. & Rapp S. (1987) *Rev. Infect. Dis.* 9:S580-S584.
- Kessel R.G. & Kardon R.H. (1979) *Tissues and Organs* W.H. Freeman (Ed.). San Francisco.
- Kettluth I.C., Fiers W. & Goldberg A.L. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:4273-4277.
- Klebanoff S.J. (1980) *Ann. Intern. Med.* 93:480-484.
- Kleinherenbrink-Stins M.F., Van Der Boom J., Bakkeren H.P., Rohoff P.J.M., Brouwer A., Van Berkel Th. J.C. & Knook D.L. (1990) *Lab. Invest.* 63:73-86.
- Knook D.L. & Sleyster C. (1976) *Exp. Cell Res.* 99:444-449.
- Knook D.L., Blansjaar N. & Sleyster E.C. (1977) *Exp. Cell Res.* 109:317-329.
- Knook D.L., Praaning-Van Dalen D.P. & De Leeuw A.M. (1986) *Cells of the Hepatic Sinusoid* vol. 1:445-450. A. Kim, D.L. Knook & E. Wisse (Eds.). Kupffer Cell Foundation, Rijswijk, The Netherlands.
- Kocsar L.T., Bertok L. & Varterez V. (1969) *J. Bacteriol.* 108:220-223.
- Koj A., Gauldie J., Sweeney G.D., Regoeczi E. & Sauder D.M. (1985) *J. Immun. Methods* 76:317-327.
- Koj A., Kurdowska A., Magielska-Zero D., Rokita H., Sipe J.D., Dayer J.M., Denozuk S. & Gauldie J. (1987) *Biochem. Int.* 14:553-557.
- Kotani S., Takada H., Tsujimoto M., Ogawa T., Harada K., Mori Y., Kawasaki A., Tanaka A., Nagao S., Tanaka S., Shiba T., Kusumoto S., Imoto M., Yoshimura H., Yamamoto M. & Shimamoto T. (1984) *Infect. Immun.* 45:293-297.
- Kotani S., Takada H., Tsujimoto M., Ogawa T., Takahashi I., Ikeda T., Otsuka K., Shimauchi H., Kasai N., Mashimo J., Nagao S., Tanaka A., Tanaka S., Harada K., Nagaki K., Kitamura H., Shiba T., Kusumoto S., Imoto M. & Yoshimura H. (1985) *Infect. Immun.* 49: 225-230.
- Kovach A.G.B., Stoner H.B. & Spitzer J.J. (Eds.) (1973) *Neurohumoral and Metabolic Aspects of Injury* Adv. Exp. Med. Biol. vol.33, Plenum Press, New York.
- Kremmer T., Wisber H.H. & Evans W.H. (1976) *Biochim. Biophys. Acta* 455:655-664.
- Kuiper J., Casteloys E. & Van Berkel T.J.C. (1987) *Advances in Enzyme Regulation*, vol. 27:193. Weber G. (Ed.). Pergamon Press, Oxford.
- Kunimoto F., Morita T. & Ogawa R. (1986) *Oxygen Free Radicals in Shock* pp.114. Novelli & Ursini (Eds.). Italia.
- Kunimoto F., Morita T., Ogawa R. & Fujita T. (1987) *Circ. Shock* 21:15-22.
- Kuttner R.E. (1983) *Handbook of Shock and Trauma* vol.1:129-147 B.M. Altura et al (Eds.) Raven Press, New York.
- Kurahara S. & Omura T. (1980) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 96:1562-1567.
- Laakso T. & Smolendoff B. (1987) *Int. J. Pharmacocutics* 36:253-262.
- Labischinski H., Bernickel G., Bradaczek H., Naumana D., Rietschel E.Th. & Giesbrocht P. (1985) *J. Bacteriol.* 162:9-20.
- Labischinski H., Naumann D., Schultz C., Kusumoto S., Shiba T., Rietschel E.Th. & Giesbrocht P. (1989) *Eur. J. Biochem.* 179:659-665.
- Landon E.J., Naulam R.J. & Sastry B.V.R. (1986) *Biochem. Pharmacol.* 55:697-705.
- Laskin D.L., Sirak A.A., Pilaro A.M. & Laskin J.D. (1988) *J. Leukocyte Biol.* 44:71-75.
- Le Dran H.F. (1743) *A Treatise or Reflections Drawn from Practice on Gunshot Wounds*. Clarke. London.
- Lee H.C. & Lum B.K.B. (1986) *Circ. Shock* 18:193-203.
- Leffer A.M. (1983) *Handbook of Shock and Trauma* vol.1:291-308. B.M. Altura et al. (Eds.). Raven Press, New York.
- Leibowitz A.I. & Viadutiu A.O. (1980) *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 165:453-458.
- Leroux-Roesis G. & Offner F. (1990) *JAMA* 263:1494-1495.
- Levin W., Thomas P.E., Oldfield N. & Ryan D.E. (1986) *Arch. Biochem. Biophys.* 248:158-163.
- Liehne H. (1980) *The Reticuloendothelial System and the Pathogenesis of Liver Disease*, pp.427-436. Liehne H. & Grun M. (Eds.). Elsevier/North-Holland Biochemical Press, Amsterdam.
- Lipka J.J. & Waskell L.A. (1989) *Arch. Biochem. Biophys.* 268:153-160.
- Liu M.S., Onji T. & Snelgrove N.E. (1983) *Infect. Immun.* 39:431-434.
- Livingstone C.J. & Schachter D. (1980) *Biochem.* 19:4823-4827.
- Loda M., Clowes G.H.A., Dinarello C.A., George B.C., Lane B. & Richardson W. (1984) *Surgery* 96:204-213.
- Loo G., Berlin E. & Allen P.C. (1990) *Comp. Physiol.* 96B:361-366.
- Lowe P.J. & Coleman R. (1981) *Biochim. Biophys. Acta* 640:55-65.
- Lowrey K., Glende E.A. Jr. & Recknagel R.O. (1981) *Biochem. Pharmacol.* 30:135-140.
- Lowry O.H., Rosenbrough N.J., Farr A.L. & Randall R. (1951) *J. Biol. Chem.* 193: 265-270.
- Lu A.Y.H., Levin W., West S.B., Jacobson M., Rysin D., Kuntzman R. & Conney A.H. (1973) *J. Biol. Chem.* 248: 456-460.
- Lu A.Y.H., Levin W., Selander H. & Jerina D.M. (1974) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 61: 1348-1355.
- Lüderitz O., Freudenberg M.A., Galanos C., Lehmann V., Rietschel E.T. & Shaw D.H. (1982) *Membrane Lipids of Prokaryotes. Current Topics in Membranes and Transport*, pp.79. S. Razin & S. Rotten (Eds.). Academic Press Inc., New York.
- Lüderitz T., Brandenburg K., Seydel U., Roth A., Galanos C. & Rietschel E.Th. (1989) *Eur. J. Biochem.* 179:11-16.
- Lutton C. (1990) *Reprod. Nur. Dev.* 30:145-160.

- Majerus T.C. (1984) *Arch. Int. Physiol. Biochem.* 92: S1-S7.
- Mai' Tseva E.L., Kurnakova N.V., Burlakova E.B. & Pa'Mina N.P. (1989) *Studia Biophys.* 132:69-76.
- Malavolti M., Fromm H., Ceryak S. & Shehan K.L. (1989) *Lipids* 24:673-676.
- Malgaroli A., Milani D., Meldolesi J. & Pazzan T. (1987) *J. Cell Biol.* 105:2445-2455.
- Mathison J.C. & Ulevitch R.J. (1979) *J. Immunol.* 123:2133-2136.
- Maunders R.J., Winn R.K., Gleason J.M., Hildebrandt J. & Harlan J.M. (1988) *J. Appl. Physiol.* 64:697-702.
- McCabe W.R. (1974) *Adv. Intern. Med.* 19:135-158.
- McCallum R.E. (1980) "Microbiology" pp. 87-90. D. Schlessinger (Ed.). Am. Soc. Microbiol., Washington.
- McCallum R.E. & Berry L.J. (1973) *Infect. Immun.* 7:642-654.
- McCallum R.E. & Pontius M.L. (1979) *Adv. Shock Res.* 2:113-127.
- McGivney A. & Bradley S.G. (1977) *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 155:390-395.
- McGovern V.J. & Tiller D.J. (1980) "Shock: A Clinicopathologic Correlation". Masson Publ. New York.
- McIntyre F.C., Barlow G.H., Sievert H.W., Finley R.A. & Yoo A.L. (1969) *Biochem.* 8: 4063-4067.
- McLeish K.R., Dean W.L., Wellhausen S.R. & Stetzer G.T. (1989) *Inflammation* 13:681-692.
- Michie H.R., Manogue K.R., Spriggs D.R., Revhaug A., O'Dwyer S., Dinarello C.A., Cerami A., Wolff S.M. & Wilmore D.W. (1988) *N. Engl. J. Med.* 318:1481-1486.
- Mikashims H. & Muramoto Y. (1990) *Thrombosis Res.* 57:499-505.
- Miara H.P. & Fridovich I. (1972) *J. Biol. Chem.* 247:3170-3175.
- Moldeus P. (1987) "Drug Metabolism: From Molecules to Man", pp 309-316. D.J. Benford, J.W. Bridges & G.G. Gibson (Eds.). Taylor & Francis, London.
- Moody C.S. & Hassan H.M. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79:2855-2859.
- Moore D.A., Goodrum K.J., Couch R.E. & Berry L.J. (1978) *J. Resuscitacendotel. Soc.* 23:321-322.
- Morel I., Lescoat G., Cillard J., Pasdeloup N., Brisot P. & Cillard P. (1990) *Biochem. Pharmacol.* 39:1647-1655.
- Morgan E.T. (1989) *Mol. Pharmacol.* 36:699-707.
- Morgan E.T. & Coon M.J. (1984) *Drug Metab. Disp.* 12:358-363.
- Mori K., Matsumoto K. & Gans H. (1973) *Ann. Surg.* 177:159-163.
- Morris E.A. (1867) "A Practical Treatise on Shock after Operations and Injuries". Hardwicke, London.
- Morris D.D. & Moore J.N. (1987) *Circ. Shock* 23:295-303.
- Morris D.D., Moore J.N., Fischer K. & Tarleton R.L. (1990) *Circ. Shock* 30:229-236.
- Morrison D.C. (1985) "Handbook of Endotoxin" vol. 3:25-55. R.A. Proctor (Ed.). Elsevier Science, Amsterdam.
- Morrison D.C. & Alving C.R. (1984) *Rev. Infect. Dis.* 6:427-578.
- Morrison D.C. & Ulevitch R.J. (1978) *Am. J. Pathol.* 93:527-617.
- Moscat J., Iglesias S., Moreno F., Herrero C. & Garcia-Barreno P. (1987) *Circ. Shock* 23:85-92.
- Munford R.S. & Hall C. (1985) *Infect. Immun.* 46:464-469.
- Munford R.S. & Hall C. (1986) *Science* 234:203-210.
- Munford R.S., Hall C.L. & Dietsch J.M. (1981) *Infect. Immun.* 34:835-843.
- Muncio A.M., Abraca S., Carrasosa J.L., Garcia R., Diaz-Laviada I., Ainaga M.J., Portolés M.T., Pagani R., Risco C. & Bosch M.A. (1990) "Endotoxin" H. Friedman, T.W. Klein, M. Nakano & A. Nowotny (Eds.). Plenum Publ. Corp., Japan.
- Munthe-Kaas A.C., Berg T., Seglen P.O. & Seljelid R. (1975) *J. Exp. Med.* 141:1-10.
- Muranishi S. (1990) *Crit. Rev. Therap. Drug Carr. Systems* 7:1-33.
- Myung-Ho L. & Bell R. (1986) *J. Biol. Chem.* 261:14867-14870.
- Nagata M., Yotsuyanagi T. & Ikeda K. (1990) *Chem. Pharm. Bull.* 38:1341-1344.
- Nagi M., Cook L., Prasad M.R. & Cinti D.L. (1983) *J. Biol. Chem.* 258:14823-14828.
- Naito H.K. (1986) *J. Clin. Immunocassay* 9:11-20.
- Nakagawa M., Colombo C. & Satchell K.D.R. (1990) *Hepatology* 12:322-334.
- Naumann D., Schultz C., Born J., Labischinski H., Brandenburg K., Brade H. & Seydel U. (1987) *Eur. J. Biochem.* 164:159-169.
- Nebert E.W. & González F.J. (1987) *Annu. Rev. Biochem.* 56:945-993.
- Neufeld H.A., Pace J.G. & Kaminski M.V. (1980) *Endocrinol.* 107:596-599.
- Neupert G. & Vogel W. (1984) *Exp. Pathol.* 26:113-117.
- Nicotera P., Hartzell P., Baldi C., Svensson S.A., Bellomo G. & Orrenius S. (1986) *J. Biol. Chem.* 261:14628-14635.
- Niggi V., Sigel E. & Carrafoli E. (1982) *J. Biol. Chem.* 257:2350-2356.
- Nishijima H., Weil M.H., Shubin H. & Cavanilles J. (1973) *Medicine* 52:287-292.
- Nolan J.P. (1975) *Gastroenterology* 69:1346-1356.
- Nolan J.P. (1989) *Hepatology* 10:887-891.
- Nolan J.P., Canavagh D., Rao P.S. & Comas M.R. (1977) "Major Problems in Obstetrics and Gynecology" vol.11:1-129. W.B. Saunders (Ed.), Philadelphia.
- Nolan J.P., Leibowitz A.I. & Vladutiu A.O. (1980) *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 165:453-459.
- Noshiro M., Ullrich V. & Omura T. (1981) *Eur. J. Biochem.* 116:521-526.
- Nowotny A. (1987) *Rev. Infect. Dis.* 9:5503-5511.
- Núñez M.T., Gaete V. & Escobar A. (1990) *Biochim. Biophys. Acta* 1028:21-24.
- Oelberg D., Downey S.A. & Flynn M.M. (1990) *Lung* 168:297-308.
- Oettinger W., Berger D. & Beger H.G. (1987) *Klin. Wochenschr.* 65:61-66.
- Ogawa R. & Fugita T. (1982) *Circ. Shock* 9:369-373.
- Ohta A., Mohri T. & Ohyanuki T. (1989) *Biochim. Biophys. Acta* 984:151-157.
- Ohta M., Kanai S. & Kitani K. (1990) *Life Sci.* 46:1503-1508.

- Olesfaký J.M. & Kao M. (1962) *J. Biol. Chem.* 237:8667-8673.
- Oliver J.M., Ukena T.E. & Berlin R.D. (1974) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71:394-398.
- Omura T. & Sato R. (1964) *J. Biol. Chem.* 239: 2370-2373.
- Onji T. & Liu M.S. (1979) *Biochim. Biophys. Acta* 598:320-324.
- Ose L., Ose T., Reinertsen R. & Berg J. (1980) *Exp. Cell Res.* 126:109-119.
- Pagani R., Portolés M.T. & Muncio A.M. (1981) *FEBS Lett.* 131:103-107.
- Pagani R., Portolés M.T. & Muncio A.M. (1985) *Mol. Cell. Biochem.* 65:37-44.
- Pagani R., Portolés M.T., Bosch M.A., Díaz-Laviada I. & Muncio A.M. (1987) *Eur. J. Cell Biol.* 43: 243-246.
- Pagani R., Portolés M.T., Díaz-Laviada I. & Muncio A.M. (1988) *Brit. J. Exp. Path.* 69:537-549.
- Pagani R., Bosch M.A., García R. & García-Barreno P. (1990) *"Bioquímica"* pp.113-143. Facultad C.C. Químicas U.C.M.
- Pain J.A., Cahill C.J. & Bailey M.E. (1985) *Br. J. Surg.* 72:942-945.
- Paton C.J., Ning S.M., Lu A.Y.H. & Yang C.S. (1986) *Arch. Biochem. Biophys.* 251:629-638.
- Peters T.J., O'Connell M.J. & Ward R.J. (1985) *"Free Radicals in Liver Injury"* pp. 107-115. G. Poli, K.H. Cheeseman, M.U. Drazzani & T.F. Slater (Eds.), Oxford, IRL Press.
- Pico G.A. & Housier C. (1989) *Biochim. Biophys. Acta* 999:128-134.
- Pompon D. & Coon M.J. (1984) *J. Biol. Chem.* 259:15377-15385.
- Portolés M.T. (1984) *Tesis Doctoral*. Facultad de Ciencias Químicas.
- Portolés M.T., Pagani R., Díaz-Laviada I. & Muncio A.M. (1987) *Cell Biochem. Funct.* 5: 55-61.
- Praaning Van-Dalen D.P. & Knook D.L. (1982) *FEBS Lett.* 141:229-232.
- Praaning Van-Dalen D.P., Brouwer A. & Knook D.L. (1981) *Gastroenterology* 81:1036-1040.
- Prasad R.N., Virk K.J., Mahajan R.C. & Ganguly N.K. (1990) *Japan J. Exp. Med.* 60:1-4.
- Prendergast F.G., Haugland R.P. & Callahan P.J. (1981) *Biochemistry* 20:7333-7338.
- Price R.M. & Jacobs D.M. (1966) *Biochim. Biophys. Acta* 859:26-32.
- Printon K.J., Keefe W.E., Foster E. & Brown W. (1974) *Surg. Gynecol. Obstet.* 138:686-689.
- Pypic V., Weisel J.E., Somers S.D., Dignisoppi J., Gonias S.L., Pizzo S.V., Hamilton T.A., Herman B. & Adams D.O. (1987) *J. Immunol.* 139:526-533.
- Raetz C.R.H., Brozek K.A., Clementz T., Coleman J.D., Galloway S.M., Goltenbock D.T. & Hampton R.Y. (1988) *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* vol. LIII:973-982.
- Raesack J., Grun M. & Liehr H. (1974) *Acta Hepato-gastroenterol.* 22:29-36.
- Rasmussen H. & Barrett P.Q. (1984) *Physiol. Rev.* 64:938-984.
- Raymond R.M., Harkness J.M. & Emerson T.E. Jr. (1981) *Am. J. Physiol.* 240:H342-H347.
- Remick D.G., Strieter R.M., Skandari M.K., Nguyen D.T., Genord M.A., Raiford C.L. & Kunkel S.L. (1990) *Am. J. Pathol.* 136:49-60.
- Rowhang A., Michie H.R., Manson J.McK., Watters J.M., Dinarello C.A., Wolff S.M. & Wilmore D.W. (1988) *Arch. Surg.* 123:162-167.
- Reynolds J. (1963) *J. Cell Biol.* 17:208-212.
- Rietschel E.Th., Shade U., Lüderitz O., Fisher H. & Pesker B.A. (1980) *"Prostaglandins in Endotoxaemia"*, pp.66-72. D. Schlesinger (Ed.), American Society for Microbiology, Washington D.C.
- Rietschel E.Th., Schade U., Jensen M., Wollenweber H.W., Lüderitz O. & Greisman S.G. (1982) *Scand. J. Infect. Dis. (suppl.)* 31:8-21.
- Rietschel E.Th., Wollenweber H.W., Brade H., Zähringer U., Lindner B., Seydel U., Bradaczek H., Barnikel G., Labischinski H. & Giesbrecht P. (1984) *"Handbook of Endotoxin"* vol.I pp.187-220. E.Th. Rietschel (Ed.) Elsevier Biomedical Press, Amsterdam.
- Rietschel E.Th., Brade H., Brade L. & Kaca W. (1985) *"Bacterial Endotoxins: Structure, Biomedical Significance and Detection with the Limulus Amebocyte Lysate Test"* pp.31-50. A.R. Liss (Ed.).
- Rietschel E.Th., Brade H., Brade L., Brandenburg K., Schade U., Seydel U., Zähringer U., Galanos C., Lüderitz O., Westphal O., Labischinski H., Kusumoto S. & Shiba T. (1987) *"Detection of Bacterial Endotoxins with the Limulus Amebocyte Lysate Test"*, pp. 25-53. S.W. Watson (Ed.), Alan R. Liss, New York.
- Rippe D.F. & Berry L.J. (1972) *Infect. Immun.* 6:97-98.
- Risco C., Carrasosa J.L. & Bosch M.A. (1991) *J. Histochem. Cytochem. (en prensa)*.
- Romano E.L., Stollnick C. & Highes N.C. (1974) *Immunocytochem.* 11:521-525.
- Romanosky A.J., Bagby G.J., Bockman E.L. & Spitzer J.J. (1980) *Am. J. Physiol.* 239:E391-E396.
- Romanowska E. (1970) *Anal. Biochem.* 33:383-389.
- Rosenstreich D.L., Glode L.M., Wahl L.M., Sandberg A.L. Mergenhagen S.E. (1977) *"Microbiology"* pp. 314-320. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Rossi F., Dellabianca V., Grzeskowiak M. & Zeni L. (1986) *"Oxygen Free Radicals in Shock"* pp.15. Novelli & Ursini (Eds.), Italia.
- Roth J. (1982) *"Techniques in Immunocytochemistry"* vol. 1:108-117. Bullock & Petrusz (Eds.), Academic Press, London.
- Roth J. & Binder M. (1978) *J. Cytochem. Histochem.* 26:163-168.
- Rothstein J.L. & Schreiber H. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:607-611.
- Rotman B. & Papermaster B.W. (1966) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 55:134-139.
- Ruitter D.J., Van Der Meulen J., Brower A., Hummel M.J.R., Mauw B.J., Van Der Ploeg J.C.M. & Wisse E. (1981) *Lab. Invest.* 45:38-43.
- Sakaguchi S., Iwata H. & Yokota K. (1989) *Microbiol. Immunol.* 33:99-110.

- Sakai A., Hori T., Okuda T., Matsubara T., Saitoh K., Yajima M. & Nishio S. (1989) *Japan J. Pharmacol.* 51:450-454.
- Salvio G., Lugli R., Pradelli J.M. & Gigliotti G. (1985) *FEBS Lett.* 187:272-276.
- Sandvig K., Olmese S., Petersen O.W. & Van Deurs B. (1987) *J. Cell Biol.* 105:679-689.
- Sato R. & Omura T. (1978) "Cytochrome P450" Kodansha (Ed.) Scientific Books, Tokyo.
- Sayeed M.M. (1983) "Handbook of Shock and Trauma" vol.I pp.255-282. B.M. Altura et al. (Eds.). Raven Press, New York.
- Scharnshmidt B.F., Keefe E.B., Beatty D.A., Blankenship N.M. & Ockner R.K. (1981) *Hepatology* 1:137-145.
- Schenkman J.B., Janason I. & Robio-Sah K.M. (1976) *Life Sci.* 19:611-624.
- Schneider J. & Marthiesen T. (1990) *Life Sci.* 46:1421-1426.
- Scholmerich J., Becher M.S., Schmidt K. (1984) *Hepatology* 4:661-666.
- Schumer W. (1979) *J. Am. Med. Assoc.* 242:1906-1912.
- Schumer W. (1983) "Handbook of Shock and Trauma" vol.I pp.185-290. B.M. Altura et al. (Eds.). Raven Press, New York.
- Schuster B.G., Palmer R.F. & Aronson R.S. (1970) *J. Membr. Biol.* 3:87-102.
- Schwartzman M.L., Marasek P., Rjos A.R., Levere L.D., Solangi K., Goodman A.I. Abraham N.G. (1990) *Kidney Int.* 37:94-99.
- Seekamp A., LaLonde C., Zhu D. & Demling R. (1988) *J. Appl. Physiol.* 65:1210-1216.
- Seglen P.O. (1972) *Exp. Cell. Res.* 74:450-454.
- Seglen P.O. (1973) *Exp. Cell. Res.* 76:25-30.
- Seljelid & Smedsrød B. (1980) "Methods for Studying Mononuclear Phagocytes", pp.97-102. Adams, Edelson & Koren (Eds.). Academic Press, New York.
- Sevanian A. & Kim E. (1985) *Free Radical Biol. Med.* 1:263-271.
- Saylor U., Brandenburg K., Koch M.H.J. & Rietschel E.Th. (1989) *Eur. J. Biochem.* 184:325-332.
- Shalaby M.R., Waage A., Aarden L. & Spevik T. (1989) *Clin. Immunol. Immunopathol.* 53:488-498.
- Shands J.W. (1973) "Bacterial Lipopolysaccharides" pp. 189-193. E.H. Kass y M.S. Wolff (Eds.) University of Chicago Press, Chicago & London.
- Shands J.W. & Chun F.W. (1980) *J. Biol. Chem.* 255:1221-1226.
- Shen B.W., Scano A.N. & Kezdy F.J. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74:837-841.
- Shiba T. & Kusumoto S. (1984) "Handbook of Endotoxin" vol.I pp.284-307. E. Th. Rietschel (Ed.). Elsevier Biomedical Press, Amsterdam.
- Shibayama Y. (1989) *J. Pathol.* 159:335-339.
- Shintzky M. & Barenholz Y. (1978) *Biochim. Biophys. Acta* 515:367-394.
- Shiratori Y., Tanaka M., Umiara J., Kawase T., Shiina S. & Sugimoto T. (1990) *J. Hepatol.* 10:51-61.
- Shoemaker D.G. & Nichols J.W. (1990) *Biochemistry* 29:5837-5842.
- Siegel J.H., Cerra F.B., Border J.R., Coleman B. & McMenamy R.H. (1982) *Pathophysiology of Shock, Anoxia and Ischemia*, pp. 235-253. R.A. Cowley & B.F. Trump (Eds.). Williams & Wilkins, Baltimore.
- Slater T.F. (1984) *Biochem. J.* 222:1-15.
- Smedsrød B. & Perotto H. (1985) *J. Leukocyte. Biol.* 38:213-230.
- Smedsrød B., Perotto H., Eggertsen G. & Sundström Ch. (1985) *Cell Tiss. Res.* 241:639-649.
- Smith-Erickson N., Aasen A.O. & Amundsen E. (1984) *Adv. Exp. Med. Biol.* 167:455-461.
- Spink W.W. (1972) "Shock in Low- and High-flow States", pp.226-229. B.K. Forscher, R.C. Lillehei & S.S. Stubbs (Eds.). Excerpta Medica, Amsterdam.
- Spink W.W., Braude A.I., Castaneda M.R. & Groytea R.S. (1948) *J. Am. Med. Assoc.* 138:1145-1148.
- Spitzer J.A. (1985) "Handbook of Endotoxin", vol. 3:151-165. L.J. Berry (Ed.). Elsevier Sci. Publ., Amsterdam.
- Spitzer J.J. (1979) *Circ. Shock (suppl)* 1:69-73.
- Spitzer J.J. & Spitzer J.A. (1982) *Klin. Wochenschr.* 60:717-722.
- Spitzer J.J., Wagner G.G. & Blackard W.G. (1976) *Circ. Shock* 3:31-38.
- Spitzer J.J., Bojta J., Lang C.H. & Mészáros K. (1990) "Cellular Metabolic Responses in Endotoxaemia and a Hypothesis for the Mechanism of Hepatic Failure in Endotoxic Shock" G. Schlag, H. Redl & J.H. Siegel (Eds.). Springer Verlag.
- Stabrook R.W. (1984) "Drug Metabolism and Drug Toxicity" pp. 1-20. J.R. Mitchell & M.E. Horning (Eds.). Raven Press, New York.
- Starke P.E., Hoock J.B. & Faber J.L. (1986) *J. Biol. Chem.* 261:3006-3012.
- Stayton P.S., Fisher M.T. & Sligar S.G. (1988) *J. Biol. Chem.* 263:13544-13548.
- Stayton P.S., Poulos T.L. & Sligar S.G. (1989) *Biochemistry* 28:8201-8205.
- Steffan A.M., Gendreau J.L., McCluskey R.S., McCluskey P.A. & Kirn A. (1986) *Hepatology* 6:830-836.
- Steinbrecher U.P. (1987) *J. Biol. Chem.* 262:3603-3608.
- Stoner H.B., Lütke R.A., Frayn K.N., Elebute A.E., Treasdaem J. & Gross E. (1983) *Br. J. Surg.* 70:32-35.
- Strittmatter P., Spatz L., Corcoran D., Rogers M.J., Setlow B. & Redline R. (1974) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71:4565-4570.
- Stry T. (1978) *Kova. Folia Microbiol.* 23:465-469.
- Suiffredini A.F., Parker M.M., Brenner M., Schlesinger T. & Parrillo J.E. (1987) *Clin. Res.* 35:386A-391A.
- Sugino K., Dobi K., Yamada K. & Kawasaki T. (1987) *Surgery* 101:746-752.
- Sun X.M. & Haseh W. (1988) *J. Clin. Invest.* 81:1328-1331.
- Suteu I., Bandita T., Căfriza A., Bucur A.I. & Candea V. (1977) "Shock". Abacus Press, Rumania.
- Sutherland E.W. & Robinson G.A. (1969) *Diabetes* 18:797-819.

- Szilagyi T., Toth S., Czernyansky H. & Sumegi J. (1976) *Agents Actions* 6:721-725.
- Takada H., Kotani S., Tsujimoto M., Ogawa T., Takahashi I., Harada K., Katsukawa C., Tanaka S., Shiba T., Kusumoto S., Imoto M., Yoshimura H., Yamamoto M. & Shimamoto T. (1985) *Infect. Immun.* 48:219-223.
- Takiguchi S. & Koga A. (1988) *Virchows Archiv. B Cell. Pathol.* 54:303-311.
- Talmadge J.E., Bowersox O., Tribble H., Lee S.H., Shepard H. & Liggins D. (1987) *Am. J. Pathol.* 128:410-418.
- Tamburini P.P. & Gibson G.G. (1983) *J. Biol. Chem.* 258:13444-13450.
- Tamburini P.P. & Schenkmann J.B. (1986) *Arch. Biochem. Biophys.* 245:512-516.
- Tamburini P.P., White R.E. & Schenkmann J.B. (1985) *J. Biol. Chem.* 260:4007-4016.
- Tamura M., Yoshida S., Tamura T., Saitoh T. & Takeshita M. (1990) *Arch. Biochem. Biophys.* 280:313-319.
- Tanaka N., Bergqvist L., Christensen P. & Bengmark S. (1985) *Br. J. Surg.* 72:946-949.
- Tanamoto K.I., Schade U. & Rietchel E.Th. (1989) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 165:526-532.
- Tanamoto K.I., Shade U., Rietchel E.Th., Kusumoto S. & Shiba T. (1990) *Infect. Immun.* 58:217-221.
- Tesh V.L., Duncan R.L. & Morrison D.C. (1986) *J. Immunol.* 137:1328-1334.
- Tobias P.S., Soldau K. & Ulevitch R.J. (1986) *J. Exp. Med.* 164:777-793.
- Toth C.A., Thomas F., Brotkman S.A. & Zarnchock N. (1985) *Cancer Res.* 45:392-395.
- Tracy K.J., Fong Y., Hesse D.G., Manogue K.R., Lee A.T., Kuo G.C., Lowry S.F. & Cerami A. (1987) *Nature* 325:295-303.
- Trachte G.J. (1983) *"Handbook of Shock and Trauma"* vol.I pp.337-354 B.M. Altura et al (Eds.) Raven Press, New York.
- Trump B.F., Berezansky I.K. & Cowley R.A. (1982) *"Pathophysiology of Shock, Anoxia and Ischemia"*, pp.6-46. R.A. Cowley & B.F. Trump (Eds.) Williams & Wilkins, Baltimore, London.
- Tison R.Y. (1980) *Biochemistry* 19:2396-2400.
- Tsutsumi Y., Kakumu S., Yoshioka K., Arai M., Inoue M. & Wakita T. (1989) *Digestion* 44:191-199.
- Ulevitch R.J., Johnson A.R. & Weinstein D.B. (1981) *J. Clin. Invest.* 67:827-831.
- United States Department of Health and Human Services. Advance Report of Final Mortality Statistics (1986) *NCHS Monthly Vital Statistics Report* 37 (6) Supp. 4-7.
- Utarmann G. (1987) *Am. Heart J.* 113:433-439.
- Uttil R., Abernathy C.O., Zimmerman H.J., Gaeta G.B., Adinolfi L. & Lukacs L. (1981) *Gastroenterology* 80:673-680.
- Van Boesuyt H. (1989) *"Bacterial Lipopolysaccharide and Kupffer Cells"* pp.104-108. Free University of Brussels (V.U.B.), Brussels.
- Van Boesuyt H. & Wisse E. (1988) *J. Hepatol.* 7:45-56.
- Van Boesuyt H., Bouwens L. & Wisse E. (1988) *"Sinusoids in Human Liver: Health and Disease"*, pp.1-16. P. Bioulic-Sage & C. Deleband (Eds.) The Kupffer Cell Foundation, Rijswijk, The Netherlands.
- Van Boesuyt H., Demarez C., Gaeta G. & Wisse E. (1990) *J. Hepatol.* 10:274-279.
- Van Doovert S.J., Ten Cate J.W. & Tytgat G.N. (1988) *Gastroenterology* 94:825-831.
- Van Lenzen B.J., Fogelman A.M., Haberland M.E. & Edwards P.A. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:2704-2708.
- Vatsis K.P., Theodorides A.D., Kupfer D. & Coon M.J. (1982) *J. Biol. Chem.* 257:11221-11225.
- Veterans Administration Cooperative Study N°209 (1983) *"Evaluation of Corticosteroid Therapy in Severe Sepsis"*. Washington, DC.
- Visser G.A., Dougall W.C., Wilson J.M., Burr LA. & Nick H.S. (1990) *J. Biol. Chem.* 265:2856-2864.
- Voelckel K., Tobias P., Mueller H., Allen R.A., Arfors K.E., Ulevitch R.J. & Sklar L.A. (1990) *J. Leukocyte Biol.* 47:97-104.
- Vukajlovich S.W. & Morrison D.C. (1985) *J. Immunol.* 135:2546-2550.
- Waage A. & Espvik T. (1988) *J. Exp. Med.* 167:1987-1992.
- Waage A., Brandzaag P., Halstensen A., Kjerulf P. & Spveik T. (1989) *J. Exp. Med.* 169:333-340.
- Wada T., Ohara H., Watanabe K., Kiroshita H. & Yachi A. (1970) *J. Reticuloendothel. Soc.* 8:185-191.
- Waishoren B.A. (1951) *Arch. Intern. Med.* 88:467-488.
- Waishoren B.A. (1964) *Am. J. Med.* 36:819-824.
- Walker R.I. & Snyder S.L. (1978) *"Toxins: Animal, Plant and Microbial"* pp.933-946. P. Rosemberg (Ed.) Pergamon Press, New York.
- Wannemacher R.W. Jr., Pace J.G., Beall F.A., Dinterman R.E., Petrella V.J. & Neufeld H.A. (1979) *J. Clin. Invest.* 64:1563-1568.
- Warren H.S., Knights C.V. & Siber G.R. (1986) *J. Infect. Dis.* 154:784-791.
- Warren H.S., Rhew G.R., Deckker Y. & Chedid L.A. (1988) *Infect. Immun.* 56:204-212.
- Watanabe H., Kobayashi A., Yamamoto T., Suzuki S., Hayashi H. & Yamazaki N. (1990) *Free Radical Biol. Med.* 9:507-514.
- Wasson D.J. & Walsh C. (1983) *Biochemistry* 22:4846-4851.
- Wasson D.J., Ko A. & Walsh C. (1983) *J. Biol. Chem.* 258:11937-11940.
- Weibel E.R., Staubli W., Gnani H.R. & Hess F.A. (1969) *J. Cell Biol.* 42:68-91.
- Weiel J.E., Hamilton T.A. & Adams D.O. (1986) *J. Immunol.* 136:3012-3018.
- Weil M.H. (1972) *"The Fundamental Mechanisms of Shock"* pp.13-23. L.B. Hinshaw y B.G. Cox (Eds.) Plenum Press, New York.
- Weisiger R.A. (1986) *Gastroenterology* 90:494-496.
- West M.A., Billiar T.R., Mazzanti J.E., Curran R.D. & Simmons R.L. (1988) *Arch. Surg.* 123:1400-1409.
- Wessphal O. & Lüderitz O. (1954) *Angew. Chem.* 66:407-411.

- Westphal O., Lüderix O. & Bister F. (1952) *Z. Naturf.* 76:148-152.
- Wichterman K.A., Baue A.E. & Chaudry I.H. (1980) *J. Surg. Res.* 29:189-196.
- Wiggers C. (1950) *Physiology of Shock*. The Commonwealth Fund, New York.
- Willerson J.T., Trelstad R.L., Fincus T., Levy S.B. & Wolff S.M. (1970) *Infect. Immun.* 1:440-445.
- Williams J.F. (1985) *Int. J. Immunopharmacol.* 7:501-509.
- Williamson J.R., Refino C. & La Noue K. (1970) "Energy Metabolism in Trauma" Ciba Symposium pp.145-154 R. Porter y J. Knight (Eds.). J. & A. Churchill, London.
- Wisse E. (1977) *Kupffer Cells and Other Liver Sinusoidal Cells*, pp.33-60. E. Wisse & D.L. Knook (Eds.). Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam.
- Wisse E., Van Der Meulen J. & Van't Noordende J.M. (1974) *J. Ultrastruct. Res.* 46:393-426.
- Wisse E., Van't Noordende J.M., Van Der Meulen J. & Daems W.T. (1976) *Cell Tiss. Res.* 173:423-435.
- Wisse E., Van Dierendonck J.H., Zanger R.B.D., Fraser R. & McCuskey R.S. (1979) "Communications of liver cells", pp.195-200 H. Popper, L. Bianchi, F. Gudat & W. Reutter (Eds.). Int. Med. Publ., Suiza.
- Wisse E., De Zanger R.B., Charls K., Van Der Smitsen P. & McCuskey R.S. (1985) *Hepatology* 5:683-692.
- Wisse E., Geerts A., Bourwens L., Van Bossuyt H., Vanderkerken K. & Van Goethem F. (1989) "Cells of the Hepatic Sinusoid" vol. 2:1-9. E. Wisse, D.L. Knook & K. Decker (Eds.). Kupffer Cell Foundation, Rijswijk, The Netherlands.
- Wong G.G. & Clark S.C. (1988) *Immunol. Today* 9:137-141.
- Wong C., Flynn J. & Demling R.H. (1984) *Arch. Surg.* 119:77-82.
- Wood A.W., Ryan D.E., Thomas P.E. & Levin W. (1983) *J. Biol. Chem.* 258:8839-8843.
- Wortelboer H.M., De Kruijff C.A., Van Iersel A.A.J., Falke H.E., Noordhoek J. & Blaauboer B.J. (1990) *Biochem. Pharmacol.* 40:2525-2534.
- Wright S.D., Tobias P.S., Ulevitch R.J. & Ramos R.A. (1989) *J. Exp. Med.* 170:1231-1238.
- Yagi K. & Miyazaki T. (1988) "Calcium Signal and The Cell Response". Japan Sci. Soc. Press, Tokyo/Springer, Berlin.
- Yelich M.R. & Filkins J.P. (1980) *Am. J. Physiol.* 239 (Endocrinol. Metab. 2):E156-E160.
- Yelich M.R. & Filkins J.P. (1982) *Circ. Shock* 9:589-603.
- Yoshida M., Egawa K. & Kasai N. (1982) *Toxicol. Lett.* 12:185-193.
- Yoshida M., Hirata M., Inada K., Tsunoda N., Kirikae T., Onodera T., Ishikawa Y., Sasaki O., Shiba T., Kusumoto S., Galanos C., Lüderix O., Kondo S. & Hisatsune K. (1989) *Microbiol. Immunol.* 33:797-810.
- Zhao D. & Hira B.H. (1990) *Digest. Dis. Sci.* 35:589-595.
- Zimmerman J.J. & Dietrich K.A. (1987) *Pediatric. Clin. North Am.* 34:131-163.
- Zydasyk J.D. & Moon R.J. (1976) *Infect. Immun.* 14:100-106.