

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CC. QUÍMICAS
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I



**MECANISMOS BIOQUÍMICOS DEL SHOCK
ENDOTÓXICO: RESPUESTA HEPÁTICA AL ESTRÉS
OXIDATIVO**

**MEMORIA PRESENTADA PARA OPTAR AL GRADO DE
DOCTOR POR Myriam Catalá Rodríguez**

Bajo la dirección de las Doctoras:
M^a Teresa Portolés Pérez
Raffaella Pagani Balletti

Madrid, 2002

ISBN: 84-669-1816-7

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I

MECANISMOS BIOQUÍMICOS
DEL SHOCK ENDOTÓXICO:
RESPUESTA HEPÁTICA
AL ESTRÉS OXIDATIVO

MEMORIA

que para optar al título de
Doctora en Ciencias Químicas presenta

MYRIAM CATALÁ RODRÍGUEZ

Madrid, diciembre 2001

AGRADECIMIENTOS

Mi primer agradecimiento va dedicado, sin duda, a mis directoras de tesis. A la Dra. Teresa Portolés, que tantas horas ha pasado planificando, llevando a cabo y discutiendo los innumerables experimentos, siempre apoyándome y dándome ánimos y revisando minuciosamente todo mi trabajo, sufriendo conmigo cada aislamiento. A la Dra. Raffaella Pagani por darme la oportunidad de integrarme en el grupo de Biomedicina, por todo lo que he aprendido de ella, científica y personalmente y por la confianza en mí que siempre ha mostrado. El resto del grupo de Biomedicina también merece mi más cariñoso agradecimiento, las Dras. Paloma Bosch y Resurrección García, que hicieron, por su buen humor y profunda vocación docente, agradables y enriquecedoras cada jornada de trabajo en el laboratorio. En este sentido tengo que recordar a mis compañeros de empresa, a Adolfo, que me enseñó a moverme en el laboratorio y con quien di mis primeros pasos en la investigación, a Amalia por nuestras largas conversaciones sobre Ciencia y lo que no es ciencia, a Quique, siempre de buen humor, a Laura e Isabel, que aunque pasaron poco tiempo conmigo fue muy agradable. Recordando los inicios tengo que mencionar a la Dra. Rosa M^a Arahuetes y a sus estudiantes, por enseñarnos con gran dedicación las técnicas de análisis de sistemas antioxidantes, clave para el desarrollo de la presente tesis.

Aunque corta, la estancia en el Laboratorio de Biofarmacia de los Laboratorios Sylvius de la Universidad de Leiden fue enormemente provechosa. Por ello quiero agradecer al Dr. Johan Kuiper y al Prof. Theo van Berkel que me aceptaran en su grupo y que me ofrecieran la posibilidad de realizar los estudios de interacción de la endotoxina con las lipoproteínas de alta densidad de la mano del Dr. Edwin van Amersfoort, entonces estudiante de doctorado. A Edwin quiero agradecerle que se

ilusionara tanto con mi trabajo como para retrasar temporalmente el suyo y me diera esa visión crítica imprescindible para obtener conclusiones válidas.

Siento un profundo agradecimiento hacia todos mis compañeros de la Universidad Rey Juan Carlos que me han apoyado durante estos años para que finalizara esta tesis. Especialmente quiero mencionar al Dr. Ángel Gil, que me dio la oportunidad de reinsertarme en el mundo Científico y darle el empujón definitivo a la presente tesis, y al Dr. Eduardo García, que ha puesto su confianza en mi labor científica y docente. En este momento me gustaría mencionar a todos los que han trabajado codo con codo conmigo: Paloma, que siempre tiene más fe en mí que yo misma, Manoli, Maribel, Consuelo, Inés, Sofía, Pilar, Victoria, Elena, los chicos de la planta baja de Independencia, el área de Salud Pública y Medicina Preventiva y sobre todo a la gente de Internacional...

Quizás suene extraño, pero quiero mostrar mi agradecimiento al Programa ERASMUS, por innumerables razones personales y profesionales, pero en particular por permitirme conocer a la Dra Pagani, entonces Vicedecana de Relaciones Internacionales y darme sustento económico para poder realizar mi vocación, la investigación.

He dejado para el final el agradecimiento más profundo quizás porque afecta a lo que me ha impulsado a realizar esta tesis. Este pensamiento va dedicado a mi madre y a mi padre, Margarita y Rafael, por inculcarme desde la infancia el amor por el Conocimiento y las ganas de aprender. Quizás esto también sea algo culpa de mi abuela, Dña. Concepción Menéndez, que siempre ha tenido razón en que la mejor herencia que pueden dejarnos nuestros mayores es nuestra Educación. La finalización de esta tesis no hubiera sido posible sin el apoyo incondicional de mi marido Jon, apoyo moral y técnico, ya que los hermosos gráficos y dibujos que aparecen en el trabajo son sólo una pequeña muestra de todos los que ha realizado para mí. Gracias por compartir conmigo tantas horas frente al ordenador, te prometo que a partir de ahora estaré libre para fines de semana, puentes, vacaciones...

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	I-8
I.1. SHOCK ENDOTÓXICO. CARACTERÍSTICAS FISIOPATOLÓGICAS	I-10
I.2. ENDOTOXINAS	I-14
I.2.1. LOCALIZACIÓN Y ESTRUCTURA DE LOS LIPOPOLISACÁRIDOS	I-15
I.2.2. ESTRUCTURA SUPRAMOLECULAR DEL LIPOPOLISACÁRIDO	I-16
I.3. ESTRUCTURA Y FUNCIONES HEPÁTICAS	I-17
I.3.1. HEPATOTOXICIDAD DE LA ENDOTOXINA	I-20
I.3.1.1. Alteraciones Hepáticas Durante el <i>Shock</i> Endotóxico	I-21
I.3.1.2. Respuesta Hepática a la Endotoxemia. Mediadores Endógenos	I-23
I.4. EQUILIBRIO REDOX EN LOS SERES VIVOS	I-27
I.4.1. RADICALES LIBRES Y PEROXIDACIÓN LIPÍDICA	I-27
I.4.1.1. Especies Reactivas de Oxígeno	I-28
I.4.1.2. El Óxido Nítrico	I-30
I.4.1.3. Peroxidación Lipídica	I-31
I.4.2. MECANISMOS DE DEFENSA ANTIOXIDANTE EN LOS SISTEMAS BIOLÓGICOS	I-32
I.4.2.1. Mecanismos no Enzimáticos	I-32
I.4.2.2. Mecanismos Enzimáticos	I-34
I.5. ESTRATEGIAS TERAPÉUTICAS CONTRA EL SHOCK	I-37
II. OBJETIVOS	II-41
III. MATERIALES Y MÉTODOS	III-43
III.1. ENDOTOXINA	III-43
III.2. MATERIAL BIOLÓGICO	III-43
III.3. MODELOS EXPERIMENTALES	III-44
III.3.1. INDUCCIÓN DEL <i>SHOCK</i> ENDOTÓXICO REVERSIBLE	III-44
III.3.2. AISLAMIENTO DE DISTINTOS TIPOS CELULARES HEPÁTICOS	III-44

III.3.2.1.	Aislamiento de Células Parenquimatosas	III-44
III.3.2.2.	Aislamiento de Células Sinusoidales	III-47
III.3.2.3.	Purificación de Células de Kupffer y Endoteliales: Elutriación	III-49
III.3.2.4.	Caracterización de las Células de Kupffer y Endoteliales Mediante Citometría de Flujo	III-50
III.3.3.	CULTIVOS PRIMARIOS	III-51
III.3.3.1.	Cultivo Primario de Células Parenquimatosas	III-51
III.3.3.2.	Cultivos Mixtos de Células Sinusoidales	III-52
III.3.4.	ESTUDIOS MORFOLÓGICOS	III-53
III.3.4.1.	Microscopía Óptica	III-53
III.3.4.2.	Microscopía Confocal	III-53
III.3.5.	TRATAMIENTO DE CULTIVOS CELULARES CON ENDOTOXINA Y CITOQUINAS	III-54
III.3.6.	TRATAMIENTO DE CULTIVOS DE CÉLULAS PARENQUIMATOSAS CON SOBRENADANTES DE CÉLULAS SINUSOIDALES	III-54
III.3.7.	CO-CULTIVOS DE CÉLULAS PARENQUIMATOSAS Y CÉLULAS SINUSOIDALES	III-55
III.3.7.1.	Comunicación Celular en Presencia de LPS	III-55
III.3.7.2.	Comunicación Celular tras la Exposición de las Células Sinusoidales a LPS	III-55
III.4.	VALORACIÓN DE SISTEMAS ANTIOXIDANTES	III-56
III.4.1.	GLUTATIÓN	III-56
III.4.2.	GLUTATIÓN REDUCTASA	III-57
III.4.3.	GLUTATIÓN PEROXIDASA	III-58
III.4.4.	SUPERÓXIDO DISMUTASA	III-60
III.4.4.1.	Aislamiento de la Fracción Mitocondrial	III-60
III.4.5.	CATALASA	III-61
III.5.	ESTUDIO DE LA UNIÓN DE LA ENDOTOXINA A CÉLULAS DE KUPFFER Y ENDOTELIALES HEPÁTICAS MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO	III-62
III.6.	INTERACCIÓN LPS-LIPOPROTEÍNAS	III-63
III.6.1.	AISLAMIENTO DE LIPOPROTEÍNAS POR ULTRACENTRIFUGACIÓN EN GRADIENTE DE DENSIDAD	III-63
III.6.1.1.	Estudio de la Interacción del LPS con las Lipoproteínas Presentes en el Suero Deficiente en Lipoproteínas	III-65
III.6.1.2.	Valoración de Colesterol	III-65
III.6.2.	ELECTROFORESIS EN GELES DE AGAROSA	III-65
III.6.2.1.	Efecto de la Dosis de HDL en la Interacción HDL/LPS	III-66

III.6.2.2.	Efecto del Suero en la Movilidad del I ¹²⁵ -LPS y de los Complejos I ¹²⁵ -LPS-HDL	III-67
III.6.2.3.	Efecto del LPS en la Movilidad Electroforética de las HDL. Uso de I ¹²⁵ -HDL	III-67
III.6.2.4.	Efecto de la Sonicación en la Movilidad Electroforética del LPS y en su Interacción con Suero Humano y Albúmina Bovina	III-68
III.6.2.5.	Cinética de la Interacción I ¹²⁵ -LPS-HDL en Presencia de Suero Humano	III-68
III.6.2.6.	Efecto de Cationes Divalentes en la Interacción HDL-LPS	III-69
III.7.	OBTENCIÓN DEL LIPOPOLISACÁRIDO MARCADO CON I¹²⁵	III-70
III.8.	TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS DATOS	III-71
III.8.1.	PRECISIÓN DE LA MEDICIÓN	III-71
III.8.2.	PROBABILIDAD DE LAS DESVIACIONES Y CÁLCULO DE LA SIGNIFICATIVIDAD	III-72
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN		IV-74
<hr/>		
IV.1.	CARACTERIZACIÓN DEL MODELO DE <i>SHOCK</i> ENDOTÓXICO REVERSIBLE EN RATA	IV-74
IV.2.	ACCIÓN DEL LPS <i>IN VIVO</i> SOBRE SISTEMAS ANTIOXIDANTES	IV-76
IV.2.1.	VALORACIONES EN TEJIDO HEPÁTICO	IV-76
IV.2.1.1.	Glutación	IV-78
IV.2.1.2.	Superóxido Dismutasa Mitocondrial (Mn-SOD)	IV-81
IV.2.1.3.	Catalasa	IV-83
IV.2.2.	VALORACIÓN DE GLUTATIÓN EN PLASMA	IV-84
IV.3.	MODELOS EXPERIMENTALES <i>IN VITRO</i>	IV-89
IV.3.1.	CÉLULAS PARENQUIMATOSAS EN CULTIVO	IV-89
IV.3.1.1.	Estudios Morfológicos de Células Parenquimatosas. Microscopía Óptica y Confocal	IV-90
IV.3.1.2.	Contenido Intracelular de Glutación	IV-92
IV.3.2.	CÉLULAS SINUSOIDALES	IV-92
IV.3.2.1.	Células en Suspensión. Caracterización Mediante Citometría de Flujo	IV-93
IV.3.2.2.	Células en Cultivo. Caracterización Mediante Microscopía Óptica y Confocal	IV-95
IV.3.2.2.1.	Inmunomarcaje de las Células de Kupffer con ED1/ED2-PE	IV-99
IV.3.2.2.2.	Contenido Intracelular de Especies Reactivas de Oxígeno.	IV-101
IV.3.3.	CO-CULTIVO DE CÉLULAS PARENQUIMATOSAS CON CÉLULAS SINUSOIDALES	IV-103
IV.3.3.1.	Liberación de Lactato Deshidrogenasa al Medio	IV-103
IV.3.3.2.	Contenido Intracelular de Glutación	IV-104

IV.3.4.	CÉLULAS PARENQUIMATOSAS EN CULTIVO TRATADAS CON SOBRENADANTES DE CÉLULAS SINUSOIDALES. CONTENIDO INTRACELULAR DE GLUTATIÓN	IV-105
IV.4.	ACCIÓN DIRECTA DEL LPS SOBRE SISTEMAS ANTIOXIDANTES EN CÉLULAS PARENQUIMATOSAS EN CULTIVO	IV-106
IV.4.1.	SISTEMA GLUTATIÓN	IV-107
IV.4.2.	GLUTATIÓN PEROXIDASA (SE-GPX)	IV-110
IV.4.3.	GLUTATIÓN REDUCTASA (GR)	IV-112
IV.5.	ACCIÓN DE CITOQUINAS SOBRE SISTEMAS ANTIOXIDANTES EN CÉLULAS PARENQUIMATOSAS EN CULTIVO	IV-113
IV.5.1.	SISTEMA GLUTATIÓN	IV-114
IV.5.2.	GLUTATIÓN PEROXIDASA	IV-116
IV.5.3.	GLUTATIÓN REDUCTASA	IV-117
IV.6.	EFEECTO DE LOS MEDIADORES LIBERADOS POR CÉLULAS SINUSOIDALES ACTIVADAS CON LPS SOBRE CÉLULAS PARENQUIMATOSAS EN CULTIVO	IV-118
IV.6.1.	EFEECTO DEL LPS SOBRE EL CONTENIDO DE GSH DE CÉLULAS PARENQUIMATOSAS EN CO-CULTIVO CON CÉLULAS SINUSOIDALES	IV-119
IV.6.2.	ACCIÓN DE SOBRENADANTES DE CÉLULAS SINUSOIDALES TRATADAS CON LPS SOBRE EL SISTEMA GLUTATIÓN DE CULTIVOS PRIMARIOS DE CÉLULAS PARENQUIMATOSAS	IV-122
IV.6.3.	EFEECTO DEL CO-CULTIVO DE CÉLULAS PARENQUIMATOSAS CON CÉLULAS NO PARENQUIMATOSAS PREESTIMULADAS CON LPS	IV-125
IV.7.	EFEECTO DE LAS LIPOPROTEÍNAS SOBRE EL CONTENIDO EN GSH DE CÉLULAS PARENQUIMATOSAS CULTIVADAS Y SOBRE SU REGULACIÓN POR EL LPS	IV-127
IV.7.1.	CARACTERIZACIÓN DE LA INTERACCIÓN LPS-HDL	IV-128
IV.7.1.1.	Efecto de la Incubación de LPS Y HDL sobre su Densidad	IV-128
IV.7.1.2.	Efecto de la Dosis de HDL en la Interacción HDL/LPS	IV-129
IV.7.1.3.	Efecto del Suero en la Movilidad del I ¹²⁵ -LPS y de los Complejos I ¹²⁵ -LPS-HDL	IV-131
IV.7.1.4.	Efecto del LPS en la Movilidad Electroforética de las HDL	IV-132
IV.7.1.5.	Efecto de la Sonicación en la Movilidad Electroforética del LPS y en su Interacción con Suero Humano y Albúmina Bovina	IV-134
IV.7.1.6.	Cinética de la Interacción I ¹²⁵ -LPS-HDL en Presencia de Suero Humano	IV-134
IV.7.1.7.	Efecto de Cationes Divalentes en la Interacción HDL-LPS	IV-136
IV.7.1.8.	Lipoproteínas de Muy Alta Densidad (VHDL)	IV-138

IV.7.2.	EFFECTO DE LA INTERACCIÓN LPS-HDL EN EL CONTENIDO EN GSH DE CÉLULAS PARENQUIMATOSAS CULTIVADAS	IV-141
IV.8.	ESTUDIO <i>IN VITRO</i> DE LA UNIÓN DE LPS-FITC A CÉLULAS HEPÁTICAS	IV-142
IV.8.1.	ESTUDIO DE LA INCORPORACIÓN SIMULTÁNEA DE LPS-FITC EN CÉLULAS DE KUPFFER Y ENDOTELIALES	IV-143
IV.8.1.1.	Cinética de Incorporación de FITC-LPS	IV-146
IV.8.1.2.	Curva de Saturación de la Incorporación de FITC-LPS	IV-148
IV.8.2.	EFFECTO DE LAS HDL EN LA CINÉTICA DE INCORPORACIÓN DE FITC-LPS EN CÉLULAS PARENQUIMATOSAS Y SINUSOIDALES	IV-150
V. CONCLUSIONES		IV-74
VI. BIBLIOGRAFÍA		V-154

ABREVIATURAS

ACTH	Adrenocorticotropina
ARDS	“Adult Respiratory Distress Syndrome”, síndrome de alteración respiratoria del adulto
BIM-LPS	Metil-4-hidroxibenzimidato de LPS
BSA	Seroalbúmina Bovina
Cat	Catalasa
CETP	“Cholesterol Ester Transfer Protein”, proteína de transferencia del ester de colesterol
CM	“Chylomicrons”, Quilomicrones
DCFH	2',7'-diclorodihidrofluoresceína
DCFH-DA	Diacetildiclorofluoresceína
DIC	“Disseminated Intravascular Coagulation”, coagulación intravascular diseminada
DMEM	Medio esencial mínimo de Dulbecco
DTPA	Ácido dietileno-triamino-pentaacético
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
Ec	Células endoteliales
G6PD	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa
GBSS	“Gey’s balanced salt solution”, solución salina equilibrada de Gey
GP, GPx	Glutación peroxidasa
GR	Glutación reductasa
GSH	Tripéptido glutación en su forma reducida
GSSG	Disulfuro de glutación.
GST	Glutación S-transferasa
HDL	“High Density Lipoproteins”, lipoproteínas de alta densidad
IDL	“Intermediate Density Lipoproteins”, lipoproteínas de densidad intermedia
IL	Interleuquina
iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible
IP	Yoduro de propidio
I ¹²⁵ -HDL	Lipoproteínas de alta densidad marcadas con I ¹²⁵
I ¹²⁵ -LPS	Lipopolisacárido marcado con I ¹²⁵
Kc	Células de Kupffer
KDO	Ácido desoxioctanoico
KRB	“Krebs-Ringer Balanced”, solución salina equilibrada de Krebs-Ringer
LBP	“Lipopolysaccharide Binding Protein”, proteína de unión al lipopolisacárido
LCAT	Lecitina colesterol aciltransferasa
LDL	“Low Density Lipoproteins”, lipoproteínas de baja densidad
LPDS	“Lipoprotein Deficient Serum”, suero deficiente en lipoproteínas

LPS	Lipopolisacárido, endotoxina
NPc	Células no parenquimatosas
NOS	Óxido nítrico sintasa
P	Peso
Pc	Células parenquimatosas
PE	R. ficoeritrina
PGs	Prostaglandinas
PLTP	“Phospholipid Transfer Protein”, proteína de transferencia de fosfolípidos
PMN	Células polimorfonucleadas
Q	Carga electrostática
RES	“Reticulo-endothelial System”, sistema retículo-endotelial
rHDL	Lipoproteína de alta densidad preparada <i>in vitro</i> a partir de sus componentes purificados o recombinantes
ROS	“Reactive Oxygen Species”, especies reactivas del oxígeno
Sc	Células sinusoidales hepáticas
SNC	Sistema nervioso central
Se-GPx	Glutación peroxidasa dependiente de Se
SOD	Superóxido dismutasa
tGSH	Contenido total de glutación, suma de GSH y de GSSG tomado en equivalentes de GSH
TNF	Factor de necrosis tumoral
UI	Unidades Internacionales
V	Volumen
VHDL	“Very High Density Lipoproteins”, lipoproteínas de muy alta densidad
VLDL	“Very Low Density Lipoproteins”, lipoproteínas de muy baja densidad
γ -GCD-HS	Unidad reguladora de la γ -glutamilcisteína sintetasa
γ -GCS	γ -glutamilcisteína sintetasa

TRADUCCIONES

Ruiz Torres

Diccionario de términos médicos

Inglés-Español/Español-Inglés

Editor Erich Ruiz Albrecht y Francisco Ruiz Albrecht

10ª Edición

Zirtabe S.A. 2000

I. INTRODUCCIÓN

I.1. *SHOCK* ENDOTÓXICO. CARACTERÍSTICAS FISIOPATOLÓGICAS

El término *shock* define la situación de extrema gravedad consecuencia de cualquier tipo de agresión contra el organismo^{1,2} y se caracteriza por una disminución del flujo sanguíneo, hipoxia tisular y alteración del metabolismo celular.

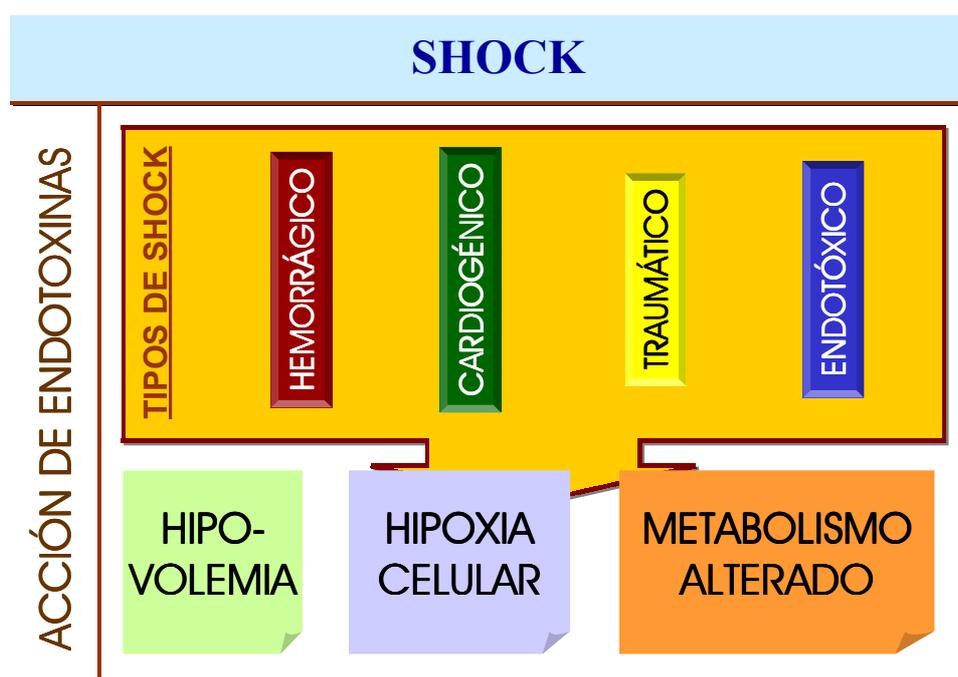


Ilustración I-1: Etiología y tipos de *shock*

Se pueden dividir las manifestaciones patológicas en dos etapas, atendiendo a los fenómenos vasculares, celulares y metabólicos característicos de cualquier tipo de *shock*:

- *Shock* reversible o moderado.
- *Shock* irreversible o severo, estado que se instaura cuando los mecanismos homeostáticos del organismo no son capaces de contrarrestar las alteraciones producidas.

El término ***shock séptico***, designa el estado de disfunción metabólico-circulatoria aguda³ que se desencadena tras la liberación en el organismo de endotoxinas bacterianas, secundaria a un proceso séptico principal⁴. La bacteriemia es un fenómeno transitorio, fácilmente controlado en sujetos sanos. Sin embargo en ciertos casos (edades avanzadas, inmunodeficiencias,

enfermedades crónicas), el estímulo séptico junto con la agresión microbiana induce una cascada de alteraciones metabólicas y hemodinámicas cuya consecuencia clínica es el **shock séptico**. En la práctica clínica no siempre se detecta la presencia de microorganismos en sangre durante los procesos sépticos, por ello se utiliza una serie de definiciones propuestas por Bone^{6,7} (Tabla I-1).

Término	Definición
Bacteriemia	Cultivos positivos en sangre
Sepsis	Evidencia clínica de infección, taquipnea, taquicardia, hipertermia o hipotermia
Síndrome séptico	Sepsis más hipoxemia o lactato plasmático elevado u oliguria
Shock séptico	Síndrome séptico más hipotensión (a pesar de la terapia adecuada)

Tabla I-1: Espectro de desórdenes asociados a la sepsis^{6,7}

El tratamiento experimental de animales con endotoxinas bacterianas aisladas reproduce muchas de las alteraciones hematológicas, hemodinámicas y metabólicas características de pacientes con infecciones bacterianas que desencadenan el *shock*^{8,9}. De hecho se han descrito casos de **shock endotóxico** indistinguibles clínicamente del **shock séptico**^{10,11} por administración de medicación parenteral contaminada con endotoxina. Está ampliamente aceptado que las endotoxinas son los agentes etiológicos responsables del **shock séptico**^{6,12-15} y por ello se habla indistintamente de **shock séptico** o **shock endotóxico**. En la Ilustración I-2 se resumen otros síntomas clínicos relevantes y los órganos más afectados en el **shock endotóxico**.

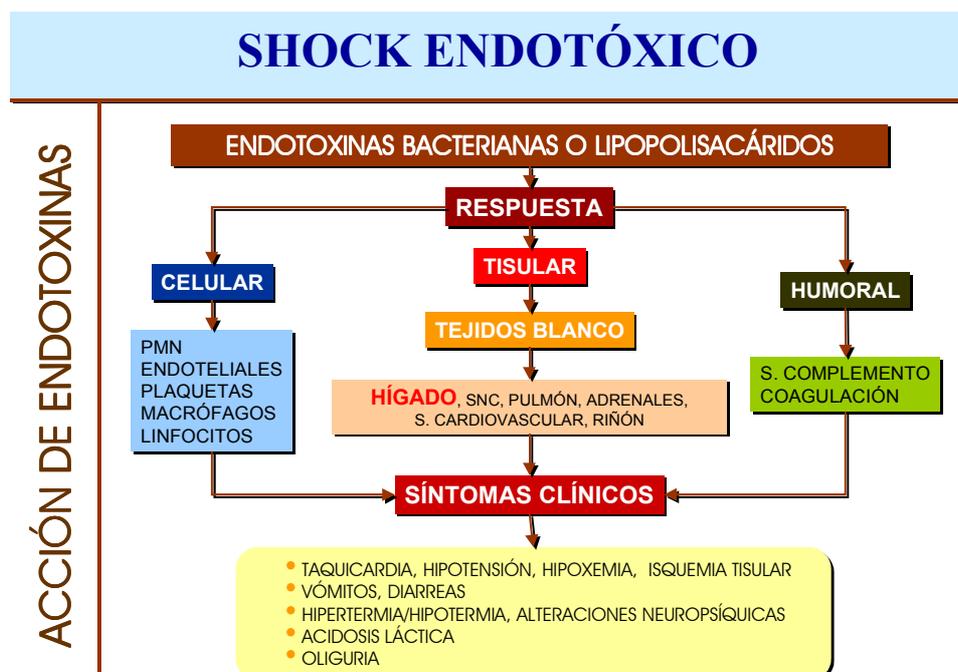


Ilustración I-2: Fisiopatología del shock endotóxico.

Sin embargo son los factores hemodinámicos los que dominan el cuadro patológico, distinguiéndose, desde este punto de vista, dos fases en la instauración del *shock*¹⁶⁻²⁰:

1. Fase inicial²¹ o *shock* hiperdinámico²².
2. Fase final²¹ o *shock* hipodinámico²².

Esta última etapa desemboca en un estado crítico con síndrome de alteración respiratoria aguda (ARDS), coagulación intravascular diseminada (DIC)^{23,24} y finalmente fracaso general del organismo.

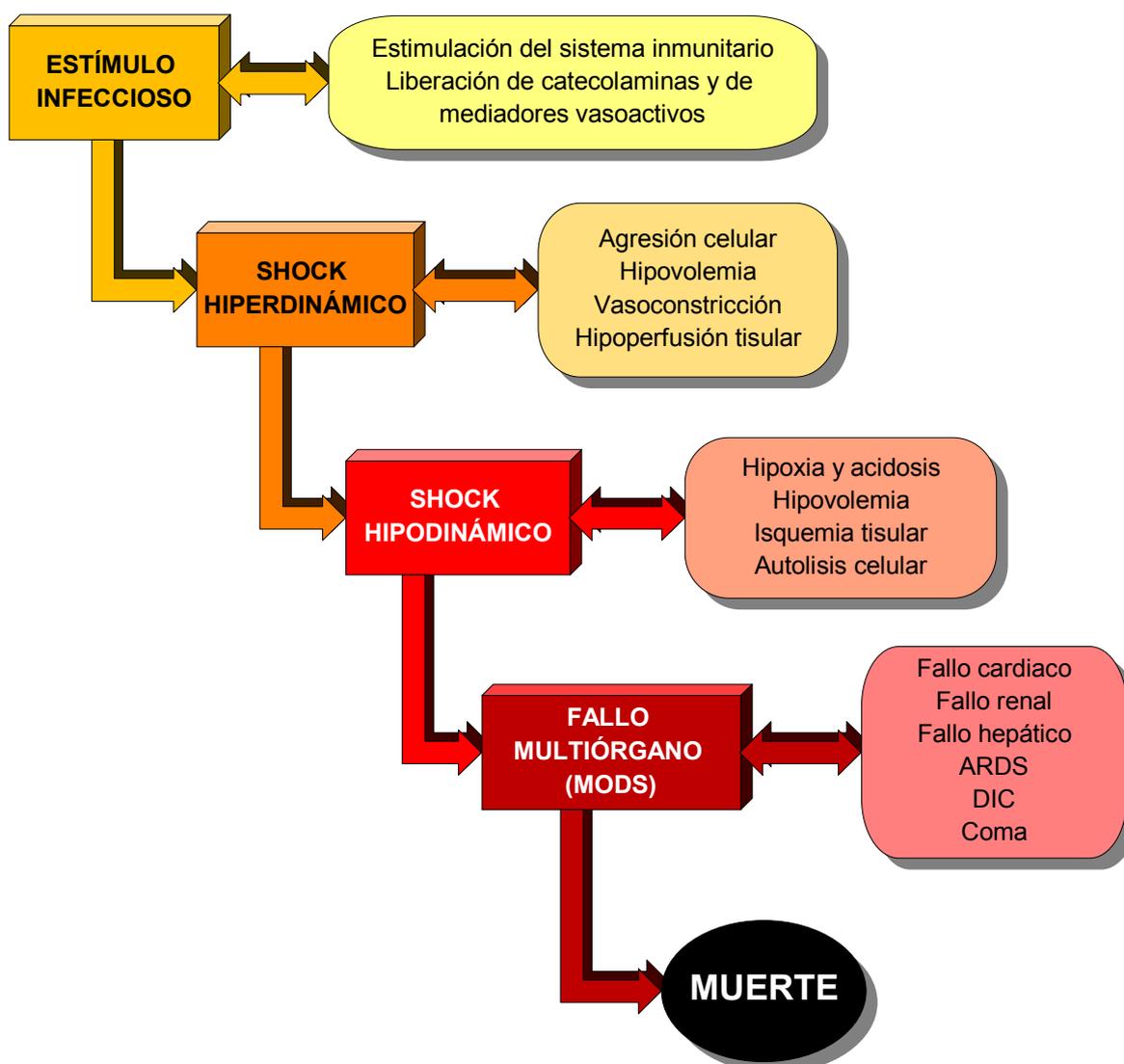


Ilustración I-3: Evolución clínica del *shock* séptico.

Existe una preocupación creciente ante la incapacidad de abordar adecuadamente la septicemia²⁵. Desde el estudio presentado por *Waisbren*²⁶ en 1951 en el que se señalaban 29

casos de bacteriemia, se llegó en 1974 a 330.000 casos originados por bacterias Gram negativas, de los que un 40% condujeron a la muerte²⁷. En 1979 la mortalidad por este tipo de *shock* se estimó entre un 10 y un 50%²⁸, ascendiendo hasta un 45-80% en 1983, siendo las infecciones agudas que producían mayor mortalidad y morbilidad en los países desarrollados²⁹. Estudios epidemiológicos realizados en EEUU reflejan una estabilización en los casos de muerte por bacteriemias desde el año 1989 en 4 de cada 100.000 habitantes, encontrándose como la decimoprimeras entre las 15 causas de muerte más frecuentes en el año 2000, por delante de la enfermedad de Alzheimer o la aterosclerosis³⁰. A pesar de los avances médicos realizados en las últimas décadas, la mortalidad del *shock* séptico sigue situándose entre 40-82%³¹⁻³⁷.

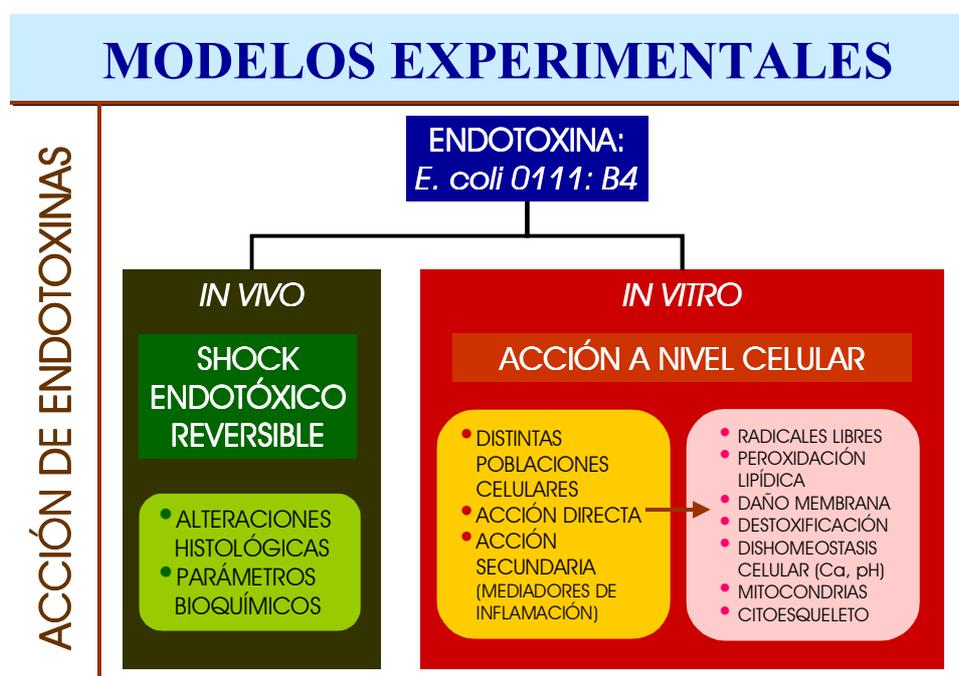


Ilustración I-4: Modelos experimentales utilizados en el estudio del *shock* endotóxico inducido por LPS en *E. coli*

Para el estudio de la acción de la endotoxina en el organismo han sido utilizados múltiples **modelos experimentales**. Principalmente podemos distinguir dos grandes grupos: estudios *in vivo* y estudios *in vitro*. Para la inducción *in vivo* del **shock endotóxico** se han utilizado perros^{38,39}, primates, cerdos⁴⁰ y ovejas⁴¹, aunque por su mayor simplicidad de manejo se recurre cada vez más a los modelos de **shock endotóxico** en ratas y ratones. Entre los modelos experimentales *in vitro* destaca la utilización de especies celulares puras o co-cultivadas: plaquetas, macrófagos peritoneales, pneumocitos, células adrenocorticales, células parenquimatosas hepáticas y células de Kupffer⁴²⁻⁵². Este tipo de estudios permite simplificar el

sistema y profundizar en las alteraciones producidas directamente por la endotoxina en cada tipo celular.

I.2. ENDOTOXINAS

Aisladas y descritas por *Boivin y Messrobeanu*, las endotoxinas son complejos macromoleculares constituidos por lipopolisacáridos (LPS) y proteínas⁵³, que se liberan al torrente circulatorio con dependencia del sistema del complemento⁵⁴, durante la lisis o los períodos de crecimiento activo de las bacterias Gram negativas. Los términos endotoxina y LPS se utilizan indistintamente ya que los LPS poseen todas las actividades biológicas de las endotoxinas⁵⁵. Por esta razón se utilizan comúnmente LPS purificados en los estudios relativos a la patología del *shock endotóxico*^{56,57}.

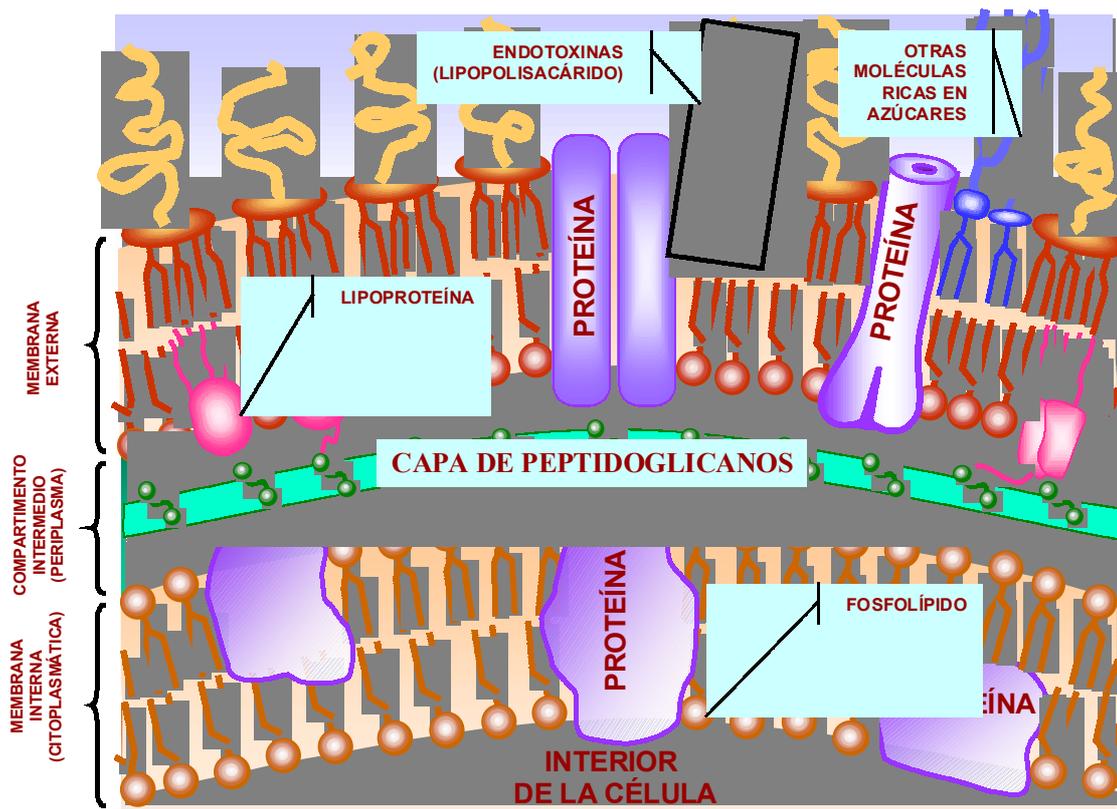


Ilustración I-5: Estructura de la pared celular de las bacterias Gram negativas. Localización de las endotoxinas.

I.2.1. LOCALIZACIÓN Y ESTRUCTURA DE LOS LIPOPOLISACÁRIDOS

Los LPS se encuentran situados en la cara externa de la membrana exterior de las bacterias Gram-negativas, junto con proteínas y fosfolípidos (relación en peso 0,3:1,1:0,3 respectivamente⁵⁸)(ver ;**Error!No se encuentra el origen de la referencia.**).

El método de aislamiento de LPS más importante es el de *Westphal* (fenol/H₂O, 45:55, V/V, a 68°C), ya que proporciona un LPS libre de contaminantes polipeptídicos⁵⁹.

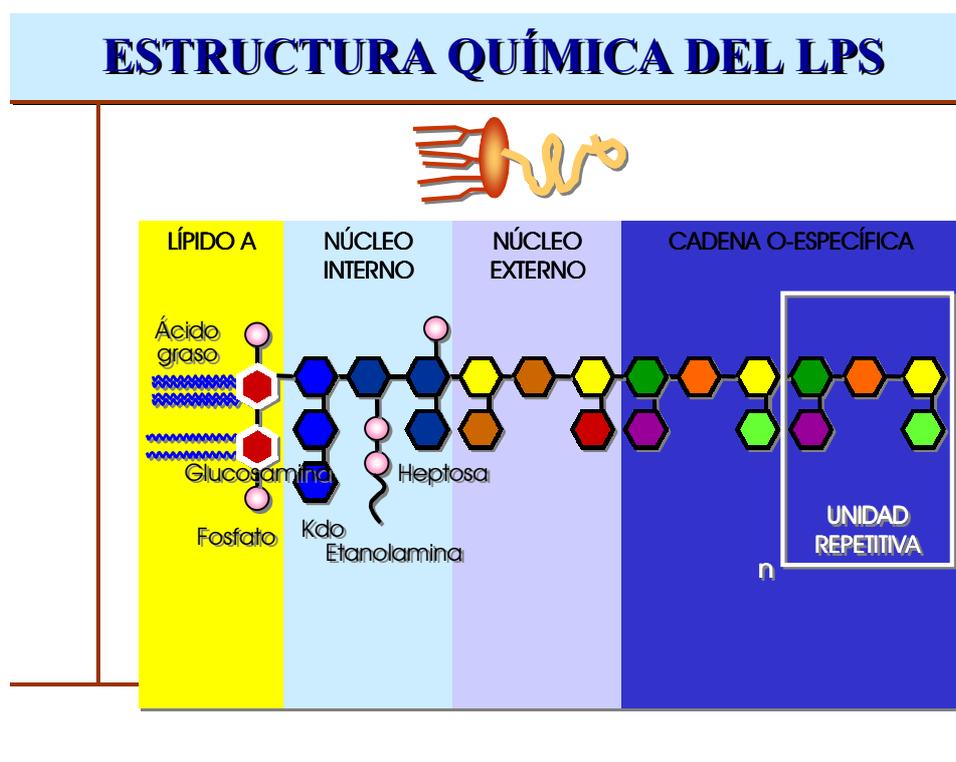


Ilustración I-6: Estructura del lipopolisacárido

Químicamente el LPS consiste en una porción oligosacáridica hidrofílica unida a una porción lipídica hidrofóbica llamada Lípido A⁶⁰. La **porción oligosacáridica** está desprovista de actividad endotóxica pero posee propiedades inmunoestimuladoras⁶¹. Consta de dos partes: cadena O-específica y núcleo basal.

- **Cadena lateral O-específica:** constituida por un número variable (2-10) de oligosacáridos formados a su vez por 3 ó 4 unidades diferentes de azúcares. La secuencia de monosacáridos es característica de cada especie bacteriana y por tanto es la portadora de la especificidad serológica de cada LPS^{60,62}.
- **Núcleo basal:** mucho más corto y homogéneo 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-desoxioctanoico (KDO) y heptosas. Este núcleo interno contiene frecuentemente residuos fosfato cargados⁶³.

El **lípidio A** exhibe una estructura y composición similar en muchas bacterias Gram-negativas. La estructura común es un disacárido de β -D-glucosaminil-(1,6)- α -D-glucosamina, fosforilado en la posición 4' del residuo glucosaminil y en la 1 de la glucosamina. Asimismo las posiciones 2 y 3 están sustituidas con grupos 3-hidroxiacilos. Tanto los fosfatos como los residuos lipídicos son importantes para la actividad biológica de la molécula.

Estudios realizados con mutantes rugosos (cuyo LPS tiene truncada la parte oligosacáridica) ponen de manifiesto el papel dominante del Lípidio A en la endotoxina. Así el LPS del mutante *S. minnesota* R595 sólo tiene KDO y Lípidio A en su molécula y posee todas las propiedades tóxicas de los LPS completos obtenidos de bacterias lisas⁶⁴⁻⁶⁷.

Junto con los efectos negativos de las endotoxinas sobre el organismo, existen otros positivos tales como su acción inmunopotenciadora y antitumoral⁶³. En la tabla Tabla I-2 se recoge un resumen de las propiedades biológicas de estas moléculas.

<i>Efectos nocivos</i>	<i>Efectos beneficiosos</i>
Pirogenicidad	Actividad mitogénica para las células B
Sinergismo con hepatotoxinas	Actividad necrótica de tumores
Leucopenia	Actividad adyuvante
Leucocitosis	Activación de macrófagos
Alteración de la coagulación	Aumento en la resistencia a infecciones
Reacción de Schwartzman local	Protección ante radiación
Activación del complemento	Desarrollo normal de los órganos linfoides
Hipotensión	Protección ante hiperoxia
Activación del factor Hagemann	
Inducción del activador de plasminógeno	
Acidosis	
Toxicidad letal	

Tabla I-2: Actividades biológicas de las endotoxinas⁶⁸⁻⁷¹

I.2.2. ESTRUCTURA SUPRAMOLECULAR DEL LIPOPOLISACÁRIDO

Por su naturaleza anfipática los LPS tienden a formar agregados en solución acuosa de pesos moleculares que oscilan entre 1×10^6 D y 20×10^6 D. Para el LPS *E. coli* 0111:B4, el peso

molecular considerado válido es IMD^{72,73}. La estructura de los agregados depende no sólo de su composición química sino del medio (pH, cationes metálicos, temperatura...). Se han propuesto un gran número de estructuras tridimensionales que incluyen estados micelares y laminares⁷⁴⁻⁷⁸.

El LPS aislado por el método de agua-fenol⁷⁹ tiene una estructura muy similar al LPS aislado del sobrenadante de cultivos bacterianos. En microscopía electrónica con tinción negativa el LPS aparece estructurado en bicapas lipídicas, uni o multilamelares, que forman hebras o estructuras esféricas^{80,81}. Los estudios de criofractura revelan que los agregados de LPS son principalmente esféricos o elípticos de tamaño homogéneo. Estas estructuras presentan una alta afinidad por las membranas biológicas insertándose en ellas de forma espontánea y rápida^{82,83}.

La inducción de numerosas actividades biológicas, tales como inmunogenicidad y antigenicidad⁸⁴, activación de la lisis del *Limulus*, inducción de la liberación de IL-6⁸³, inducción de la liberación del leucotrieno C4⁴⁶, la mitogénesis o la actividad adyuvante⁸⁵, están en estrecha relación con sus propiedades físicas, principalmente con la fluidez de la parte hidrocarbonada y de la estructura terciaria de los agregados de LPS o lípido A^{46,86,87}. Existe una relación inversa entre la temperatura de transición de fase del LPS y su capacidad de provocar respuestas biológicas ya que las estructuras lamelares presentes, altamente ordenadas, se desestructuran en conformaciones supramoleculares con mayor endotoxicidad^{76,88}. De esta manera, el lípido A libre y los distintos lipopolisacáridos mutantes y salvajes, presentan diferencias en distintos tests biológicos. Los mutantes rugosos (oligosacárido truncado), con las temperaturas de transición más bajas, es decir, máxima fluidez a 37°C, inducen las más altas actividades biológicas. La cepa salvaje y el lípido A libre, con temperaturas de transición más altas, menor fluidez a 37°C, tienen actividades significativamente menores⁸⁹. Por otra parte la sonicación de una suspensión acuosa de LPS reduce el tamaño de los agregados y aumenta la pirogenicidad de las preparaciones de endotoxina⁹⁰.

I.3. ESTRUCTURA Y FUNCIONES HEPÁTICAS

El hígado es una glándula exo y endocrina, recubierta por una delgada capa de tejido conectivo (cápsula de Glisson) y formado por un parénquima lobular. Dicho parénquima está constituido por células parenquimatosas (Pc) que representan el 65% de la población celular total, dispuestos en placas anastomosadas unas con otras que rodean los sinusoides hepáticos. En el seno de la zona parenquimatosa se distribuyen los espacios porta y las venas

centrolobulillares, que engloban conducto biliar, rama de la arteria hepática y rama de la vena porta. La disposición espacial de los espacios porta y venas centrolobulillares limitan territorios parenquimatosos denominados lobulillos hepáticos⁹¹ que son las unidades funcionales del hígado (Ilustración I-7).

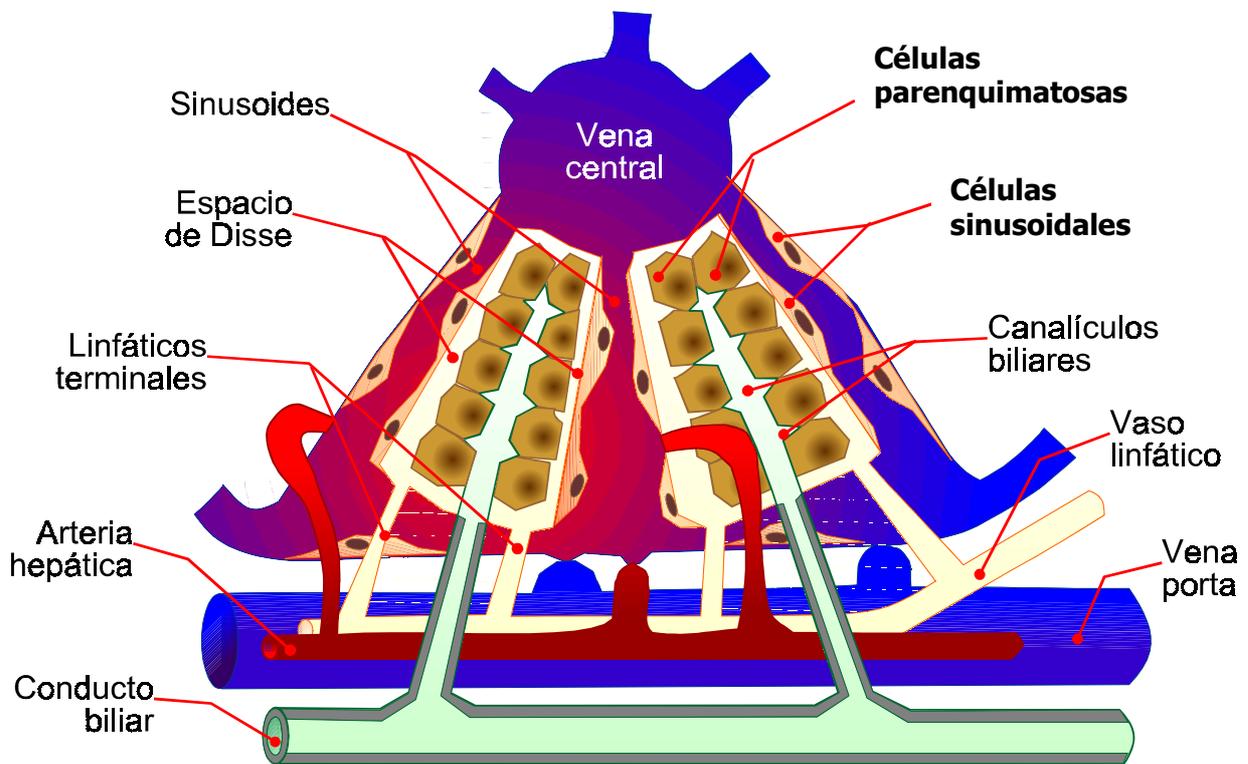


Ilustración I-7: Esquema de un lobulillo hepático

Las células sinusoidales o no parenquimatosas (Sc, NPC) son de cuatro tipos:

- Células de Kupffer (Kc), que constituyen el 25% de las Sc del hígado de rata. Actualmente se las considera la mayor población de macrófagos tisulares residentes. Están situados en el conducto sanguíneo sinusoidal, con mayor número en la zona periportal que en el área centrolobulillar. Su función es depurar la sangre procedente del intestino (Ilustración I-8).
- Células endoteliales (Ec), que constituyen una barrera células parenquimatosas-sangre. En el hígado estas células poseen *fenestrae* o poros ($\phi = 150\text{nm}$), cuya función es la filtración de la sangre. El diámetro de las *fenestrae* es afectado por ciertas hormonas⁹², influyendo de este modo en el intercambio entre sangre y Pc (Ilustración I-8).

- Células acumuladoras de grasa, también llamadas células Ito, lipocitos, pericitos o células perisinusoidales. Contienen numerosas gotas lipídicas con elevado contenido en Vitamina A.
- Células Pit, pequeñas, semejantes a lipocitos, se ha demostrado que son células tipo linfocito "natural killer"⁹³.

Entre las numerosas **funciones hepáticas** algunas parecen desarrollarse de forma completa en las células del parénquima, como 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, como la síntesis y secreción de sales biliares, dependen de la compleja organización estructural del lobulillo.

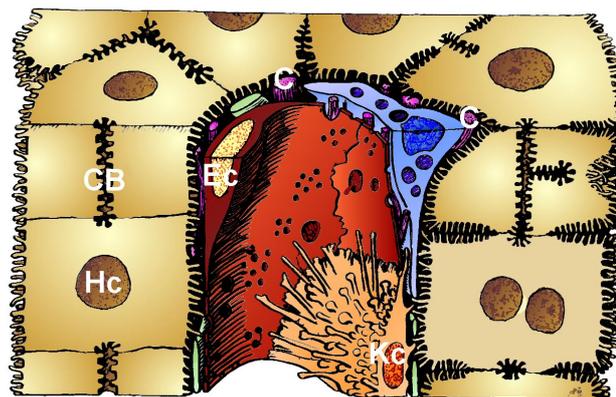


Ilustración I-8: Detalle de un sinusoide hepático. Las abreviaturas utilizadas corresponden a: Hc, células parenquimatosas; CB, canaliculos biliares; Kc, células de Kupffer; Ec, células endoteliales; C, colágeno.

El hígado tiene un papel fundamental en la regulación del metabolismo lipídico y de las **lipoproteínas**. Las lipoproteínas se clasifican en función de su densidad. Los quilomicrones (CM) son los menos densos y transportan los triglicéridos de la dieta. En el torrente sanguíneo sufren la acción de la lipoproteína lipasa liberándose ácidos grasos que son captados por los tejidos. Las partículas remanentes (quilomicrones remanentes) son captadas por el hígado a través de los receptores apo-E/apo-B, internadas y catabolizadas. Las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) son sintetizadas por el hígado y transportan triglicéridos endógenos a los tejidos periféricos. En este proceso existe un intercambio de colesterol, ésteres de colesterol, fosfolípidos, y apolipoproteínas que son transferidas a las lipoproteínas de alta densidad (HDL), transformándose las VLDL en lipoproteínas de densidad intermedia (IDL) y finalmente en lipoproteínas de baja densidad (LDL). Las HDL son sintetizadas primariamente por el hígado a partir de fosfolípidos, colesterol, apo-E y apo-A. Nacen con forma discoidal pero en la circulación adquieren colesterol, apo-C y más apo-A de otras lipoproteínas y de los tejidos periféricos tomando forma esférica. El colesterol libre es esterificado por la lecitina-colesterol

aciltransferasa (LCAT), que es activada por el cofactor apo-AI. Esta reacción disminuye la densidad de las partículas convirtiéndolas de HDL₃ a HDL₂. Antes de ser retiradas de la circulación por el hígado, las HDL transfieren la mayor parte del colesterol esterificado al resto de las lipoproteínas. Así el colesterol también llega al hígado de forma indirecta en remanentes de quilomicrones y LDL, donde es excretado en la bilis. Por tanto las HDL tienen un papel clave en el metabolismo lipídico siendo responsables de la captación del colesterol tisular y de su eliminación de la circulación periférica (Tabla I-3).

Clasificación de las lipoproteínas		
Densidad		Diámetro (Å)
<0,96	CM	750-10.000
0,960-1,006	VLDL	300-800
1,006-1,063	LDL	200-220
1,063-1,210	HDL	75-100

Tabla I-3: Clasificación de las lipoproteínas

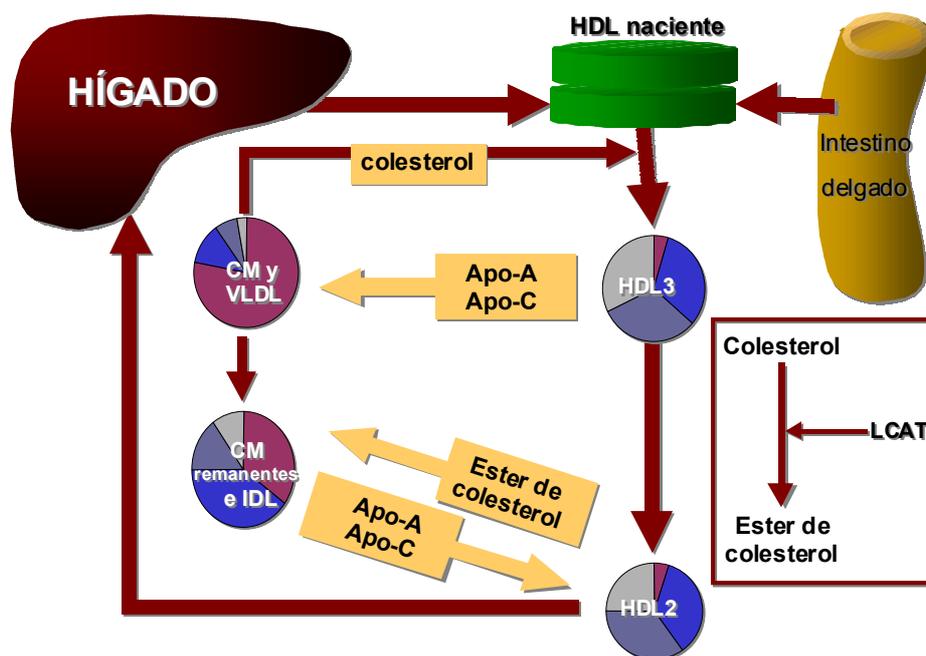


Ilustración I-9: Metabolismo esquemático de las HDL⁹⁴. Rojo: triglicéridos. Añil: colesterol. Azul: fosfolípidos. Gris: proteínas

I.3.1. HEPATOTOXICIDAD DE LA ENDOTOXINA

El paso de bacterias y LPS a través de la mucosa gastrointestinal se denomina traslocación. La traslocación de la endotoxina en pequeñas cantidades tiene relevancia

fisiológica. Agresiones tales como hemorragias, quemaduras, malnutrición, traumatismos u oclusión intestinal provocan la alteración de la mucosa intestinal permitiendo la traslocación de mayores cantidades de bacterias y endotoxinas a la circulación portal⁹⁵. El hígado constituye el mayor órgano del sistema retículo-endotelial (RES) y se encarga de la eliminación de estos patógenos impidiendo su paso a la circulación sistémica. Estudios experimentales demuestran que la endotoxina es eliminada de la circulación sistémica principalmente por el hígado (80%) y en pequeñas cantidades por el bazo, y otros órganos⁹⁶⁻⁹⁸. Usando [¹²⁵I]-LPS, se ha observado que la eliminación del LPS es bifásica⁹⁹:

- Fase rápida (15min): el LPS es eliminado directamente por el hígado.
- Fase lenta (varias horas): el LPS es eliminado asociado a lipoproteínas de alta densidad (HDL), cuyo metabolismo está regulado por el hígado^{100,101}.

I.3.1.1. ALTERACIONES HEPÁTICAS DURANTE EL SHOCK ENDOTÓXICO

Durante los procesos de **shock endotóxico** el hígado sufre severas **alteraciones morfológicas** (Tabla I-5) atribuidas principalmente a la hipoxia tisular generalizada¹⁰², aunque estudios *in vitro* han demostrado que también existe una acción directa del LPS¹⁰³ sobre las células hepáticas (ver Tabla I-4).

<i>Parámetros alterados</i>
Microviscosidad de la membrana ¹⁰⁴
Recepción y transducción de señales hormonales ^{105,105,106}
Transporte iónico y de calcio ¹⁰⁷⁻¹¹¹
Membrana interna de las mitocondrias ¹¹¹⁻¹¹³
Desorganización en las crestas mitocondriales ¹¹¹⁻¹¹³
Inhibición de la ATPasa mitocondrial ¹¹¹⁻¹¹³
Interrupción del transporte de ATP y ADP a través de la membrana ¹¹¹⁻¹¹³

Tabla I-4: Alteraciones celulares inducidas por la endotoxina.

La acción de las endotoxinas sobre el metabolismo hepático de **hidratos de carbono** se refleja en una hiperglucemia temprana y transitoria seguida de una acusada hipoglucemia. La hiperglucemia inicial se debe a la estimulación de hormonas hiperglucemiantes como glucagón y adrenalina¹¹⁴. Posteriormente, cuando se acaban las reservas de glucógeno, aparece una marcada hipoglucemia, característica de la segunda fase del *shock*.

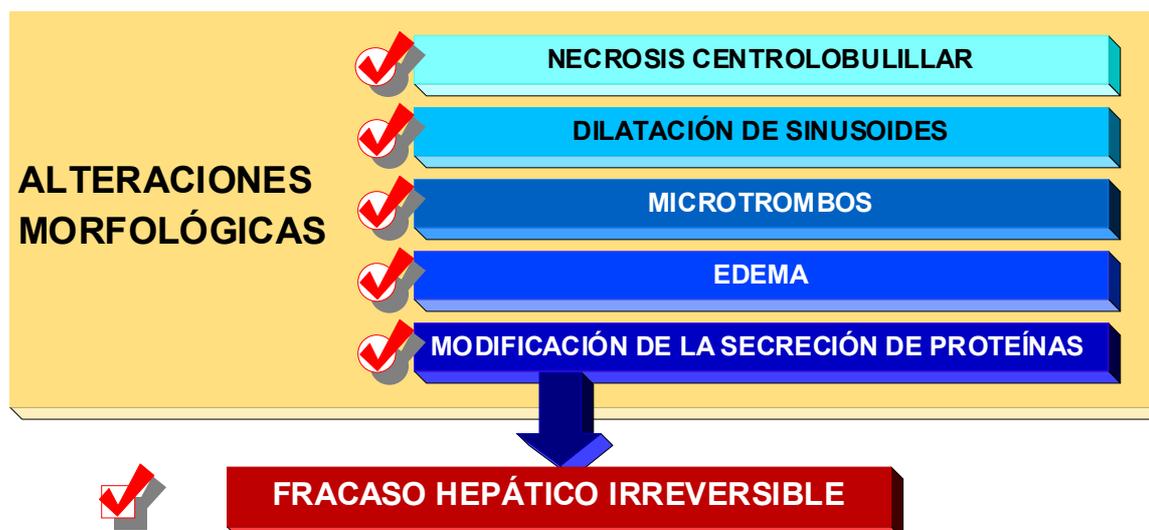


Tabla I-5: Alteraciones morfológicas durante el shock.

En cuanto al **metabolismo proteico** el hígado responde ante un trauma, infección o inflamación, aumentando la síntesis de algunas proteínas plasmáticas, denominadas proteínas de fase aguda (proteína C reactiva, α_1 -glicoproteína ácida, α_2 -antitripsina, α -fetoproteína). Todas son producidas por este órgano y tienen un alto contenido en hidratos de carbono. Al mismo tiempo se reducen los niveles de albúmina y transferrina séricas. La albúmina es la proteína plasmática más abundante y su disminución puede considerarse un parámetro sérico para el seguimiento de los estados de *shock in vivo*^{115,116}. 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 células parenquimatosas de rata en cultivo disminuyen la secreción y síntesis de albúmina^{117,118}.

La principal característica de las **alteraciones lipídicas** durante el **shock endotóxico** se observa en plasma con una marcada hipertriacilgliceridemia y una elevada concentración de ácidos grasos libres en la fase inicial hiperdinámica del *shock*^{119,120}. Este aumento en ácidos grasos libres se debe a una mayor lipólisis por parte del tejido adiposo¹²¹. Después de esta primera fase, la concentración de ácidos grasos séricos disminuye¹²², probablemente debido a una disminución de la lipólisis y a un aumento de la reesterificación. Esto explica la baja concentración de cuerpos cetónicos en esta segunda fase del *shock*.

Las membranas del retículo endoplásmico de las células parenquimatosas contienen dos cadenas interrelacionadas que utilizan NADH y NADPH para reducir diferentes sustratos a través de los citocromos b_5 y P_{450} respectivamente¹²³. Estas cadenas transportadoras de

electrones intervienen en los mecanismos de remodelación de membrana y en la modificación oxidativa de gran número de sustancias endógenas y exógenas, mecanismo fundamental de los **procesos de destoxificación**. En estudios *in vivo* del *shock* reversible se ha observado un incremento en los niveles de citocromo b₅, coincidiendo con la fase aguda del *shock*. Sin embargo el citocromo P₄₅₀ disminuye progresivamente hasta 72 horas después de la instauración del *shock*¹¹⁶. El incremento en los niveles de citocromo b₅ podría facilitar el aumento de las reacciones dependientes de NADH tales como la desaturación de ácidos grasos implicada en los mecanismos de reparación de membrana.

I.3.1.2. RESPUESTA HEPÁTICA A LA ENDOTOXEMIA. MEDIADORES ENDÓGENOS

La presencia de bacterias en la sangre desencadena la activación del complemento, tanto en su vía clásica como alternativa, provocando la lisis bacteriana y la liberación masiva de lipopolisacáridos. Las células fagocíticas (monocitos, macrófagos y células polimorfonucleares o PMN) reconocen la molécula de LPS a través de diversos receptores (ver Tabla I-6). Hasta el momento tan solo la unión al receptor CD14 parece desencadenar la respuesta inflamatoria celular por lo que no queda muy clara la función del resto de receptores.

<i>Receptor</i>	<i>Localización</i>
CD11/CD18 ¹²⁴	Células mononucleares PMN
CD14 ¹²⁵	Células mononucleares PMN
95kDa ¹²⁶	Macrófagos
220kDa(scavenger) ¹²⁷	Macrófagos
73kDa ^{128,129}	Linfocitos
	Macrófagos
	PMN
	Células endoteliales Plaquetas
70kDa ¹³⁰	Macrófagos
	Linfocitos
55, 65kDa ¹³¹	Línea celular macrofágica (J774)
38kDa ¹³²	Linfocitos
	Macrófagos

Tabla I-6: Receptores de LPS

En la importante función destoxicadora ejercida por el hígado durante el *shock* **endotóxico** participa el Sistema Retículo-Endotelial (RES), fundamentalmente las células de Kupffer^{133,134}. Se ha comprobado que el LPS se asocia en primera instancia a las células

macrofágicas de Kupffer y posteriormente a las células parenquimatosas¹³⁵. En este sentido la integridad del RES es crítica para la sensibilidad del individuo 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 sujeto está más protegido frente a la endotoxina^{136,137}. Mediante técnicas de inmunocitoquímica, con oro coloidal, se ha comprobado que el mecanismo de captación de la endotoxina parece estar relacionado con una unión no específica a membrana plasmática seguida de una fagocitosis activa en células de Kupffer^{43,138}.

Las células parenquimatosas también participan en la eliminación del LPS¹³⁵. Estudios de saturación y desplazamiento con [¹⁴C]-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^{103,134,139}. Todos estos estudios sugieren un mecanismo de captación e internación en el que las endotoxinas podrían interactuar con el citoesqueleto y distintos orgánulos subcelulares induciendo una respuesta celular específica. Todo parece sugerir que el **procesamiento hepático** del LPS requiere la intervención de varios tipos celulares: las Kc que los desglicosilan y las Pc que seguidamente lo desacilan. Sin embargo 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^{140,141}.

La proximidad física entre células de Kupffer y células parenquimatosas hace que se comuniquen tanto en condiciones normales como en estados de **shock endotóxico**. Las células de Kupffer, como cualquier macrófago, liberan tras ser expuestas a la endotoxina, una serie de mediadores de inflamación (α -TNF, IL-1, IL-6, IL-10, γ -IFN, PGs, NO, etc...) que regulan algunas funciones de las células parenquimatosas^{117,142,143}. La interacción local de células no parenquimatosas con las Pc puede estar mediada por citoquinas y/o expresión de moléculas de adhesión. Existen evidencias de que los macrófagos hepáticos pueden modular la síntesis de proteínas y el suministro de glucosa por las células parenquimatosas¹⁴⁴. La IL-6 liberada en la cascada inflamatoria induce la síntesis de proteínas de fase aguda en las células parenquimatosas¹⁴⁵, que contribuyen a neutralizar al agente agresor. Entre las proteínas de fase aguda se encuentra la proteína de unión al lipopolisacárido (LBP)^{146,147} que forma complejos con el LPS y el receptor CD14, aumentando varios órdenes de magnitud la activación de las células portadoras de CD14^{125,148}.

Entre las citoquinas liberadas por los macrófagos las más relevantes en el *shock* endotóxico son el TNF- α (factor de necrosis tumoral alfa), la IL-1 (interleuquina 1) y la IL-6 (interleuquina 6). Se han resumido algunas de sus acciones en la Tabla I-7. Los efectos del TNF en animales de experimentación son indistinguibles de los inducidos por infusión directa de LPS^{149,150} y existe una correlación positiva entre los niveles séricos de TNF y la mortalidad del síndrome séptico¹⁵¹⁻¹⁵³. Al igual que TNF, la IL-1 ha sido implicada como un mediador importante en el *shock* séptico. Aunque sola induce leucopenia, taquicardia e hipotensión, cuando actúa sinérgicamente con TNF produce daño tisular y muerte en modelos experimentales^{154,155}. La síntesis de la IL-6 está estimulada por el TNF y la IL-1, sus niveles se han correlacionado positivamente con la mortalidad en sepsis¹⁵⁶.

<i>TNF-α</i>
Leucocitosis y activación, marginación y migración transendotelial de neutrófilos ¹⁵⁷
Maduración y activación de monocitos y macrófagos ¹⁵⁸
Movilización de energía de las reservas corporales ^{159,160}
Lipogénesis hepática y síntesis de proteínas de fase aguda ¹⁶¹⁻¹⁶³
Síntesis hipotalámica de prostaglandinas y acción como pirógeno endógeno ¹⁶⁴
Coagulación intravascular difusa (base de su acción antitumoral) ¹⁶⁵
Cicatrización ¹⁶⁶
IL-1
Estimulación de linfocitos T para la síntesis de IL-2 ¹⁶⁷
Producción de linfocitos T citotóxicos ¹⁶⁴
Mielopoyesis ¹⁶⁸
Marginación y migración de leucocitos activados a lugares de inflamación aguda ^{169,170}
Acción como pirógeno endógeno ¹⁷¹
Liberación de diversas hormonas (ACTH, somatostatina, corticosteroides, glucagón) ¹⁷²
Sinergismo con el TNF amplificando la cascada de mediadores inflamatorios después del daño ¹⁷³
DIC ¹⁷⁴
Activación de la síntesis de proteínas de fase aguda hepáticas e inhibición la lipoproteína lipasa ¹⁷⁵
IL-6
Acción complementaria con TNF e IL-1 aumentando la función inmune, al estimular la diferenciación de linfocitos e inducir la producción de anticuerpos por células B ¹⁷⁶
Activación la síntesis y liberación de proteínas hepáticas de fase aguda ¹⁷⁷

Tabla I-7: Acciones de las monoquinas¹⁷⁸.

La síntesis aumentada de NO se ha observado durante la sepsis, tanto en animales de experimentación, como en pacientes con septicemia. El óxido nítrico es un mediador con numerosas funciones, incluyendo la regulación del tono vascular, la citostasis y microbiostasis

mediada por macrófagos¹⁷⁹ e importantes implicaciones en el metabolismo hepático (ver Tabla I-8)

<i>Acciones del óxido nítrico</i>
Disminución de la síntesis total de proteínas del células parenquimatosas in vitro ¹⁸⁷
Aumento de la síntesis hepática de proteínas in vivo ¹⁸⁸
Disminución de la glucogenolisis ¹⁸⁹
Disminución de la gluconeogénesis ¹⁹⁰
Disminución de la actividad gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa ¹⁹¹
Incremento del GMPc intracelular/GMPc extracelular ¹⁹²
Disminución de la actividad del citocromo P ₄₅₀ ¹⁹³
Aumento de la actividad de la ADP-ribosiltransferasa ¹⁹⁴
Disminución de la respiración mitocondrial ^{179,195,196}
Disminución de la replicación en malaria ¹⁹⁷
Citostasis de las células tumorales ¹⁷⁹
Efecto hepatoprotector durante endotoxemia ^{198,199}
Inhibición de la proliferación de células T ⁹⁴
Inhibición de la replicación viral en macrófagos ⁹⁴
Mediador de la lisis celular ⁹⁴

Tabla I-8: Efectos mediados por el NO en el hígado

Los macrófagos de roedores se encuentran entre los primeros tipos celulares en los que se demostró la capacidad de producir NO por óxido nítrico sintasas inducibles (iNOS) en respuesta a la endotoxina¹⁸⁰. Las células de Kupffer de rata pueden sintetizar grandes cantidades de NO tras la estimulación¹⁸¹, demostrándose que tan sólo el LPS afecta la formación de NO, siendo ineficaces la IL-1 β , el TNF- α , el IFN- γ , el TGF- β o la IL-10^{182,183}. Así mismo las células parenquimatosas son capaces de producir NO tras la estimulación con medios condicionados de células de Kupffer¹⁸⁴. La interleuquina principalmente implicada en este efecto es la IL-1 β ¹⁸², si bien el TNF y otras citoquinas actúan de forma sinérgica cuando la acompañan¹⁸⁵. La estimulación de la iNOS es significativa a partir de las 8h y llega tras 12-16h al máximo con niveles elevadísimos, de 50-60 veces los basales¹⁸². La producción de NO en hígados endotoxémicos proviene principalmente de las células parenquimatosas, ya que tanto en condiciones basales como activadas, producen mayores cantidades de NO que cualquier otro tipo celular¹⁸⁶. De igual manera el NO de co-cultivos entre Sc y Pc proviene mayoritariamente de las células parenquimatosas¹⁸².

La producción de proteínas de fase aguda por las células parenquimatosas está regulada por IL-6, generada principalmente por Kc, Ec e Itoc²⁰⁰. Varios estudios demuestran la capacidad de la IL-6 de inhibir la formación de NO estimulada por IL-1 β en hígado^{182,201}. Bankey y col. proponen la hipótesis de que la IL-6 tiene un papel de retroalimentación negativa sobre los efectos mediados por IL-1 β y TNF- α , protegiendo así el hígado de los efectos negativos de la sobreproducción de NO²⁰¹. Estudios recientes demuestran que tras una primera fase hiperinflamatoria en la sepsis, con sobreproducción de citoquinas proinflamatorias, se produce una respuesta antiinflamatoria, debida a la retroalimentación arriba mencionada, que puede llevar a un estado hipoinflamatorio asociado con inmunodeficiencia caracterizada por desactivación monocítica (inmunoparálisis)²⁰².

I.4. EQUILIBRIO REDOX EN LOS SERES VIVOS

Durante el *shock endotóxico* se incrementa la formación de radicales libres de oxígeno en la mayoría de las células del organismo, principalmente en macrófagos y granulocitos. Aunque la liberación de estos compuestos es un mecanismo de defensa antimicrobiana demostrado en monocitos, neutrófilos, eosinófilos y macrófagos²⁰³, estos metabolitos pueden iniciar procesos de peroxidación lipídica induciendo modificaciones irreversibles sobre la estructura y función de las membranas celulares.

I.4.1. RADICALES LIBRES Y PEROXIDACIÓN LIPÍDICA

Se puede definir “radical libre” cualquier molécula que es capaz de existir independientemente y que contiene uno o más electrones desapareados en sus orbitales más externos. Los radicales pueden reaccionar con otras moléculas a través de numerosas vías, si dos radicales se encuentran pueden combinar sus electrones no apareados y unirse covalentemente.



Ecuación I-1: Reacciones radicalares

Un radical puede donar su electrón no apareado o aceptar un electrón de otra molécula, tornándose ésta en un nuevo radical libre. Una característica de los radicales libres es que dan lugar a reacciones en cadena.

I.4.1.1. ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO

La misma molécula de oxígeno en estado basal puede considerarse un radical libre al tener dos electrones desapareados de espines paralelos. Esto le confiere un fuerte carácter oxidante pero le obliga a aceptar los electrones de uno en uno²⁰⁴, dando lugar a una serie de especies reactivas: el radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el radical hidroxilo (OH^{\cdot}) o el oxígeno en estado singlete (O_2^S), productos del metabolismo normal^{205,206}.

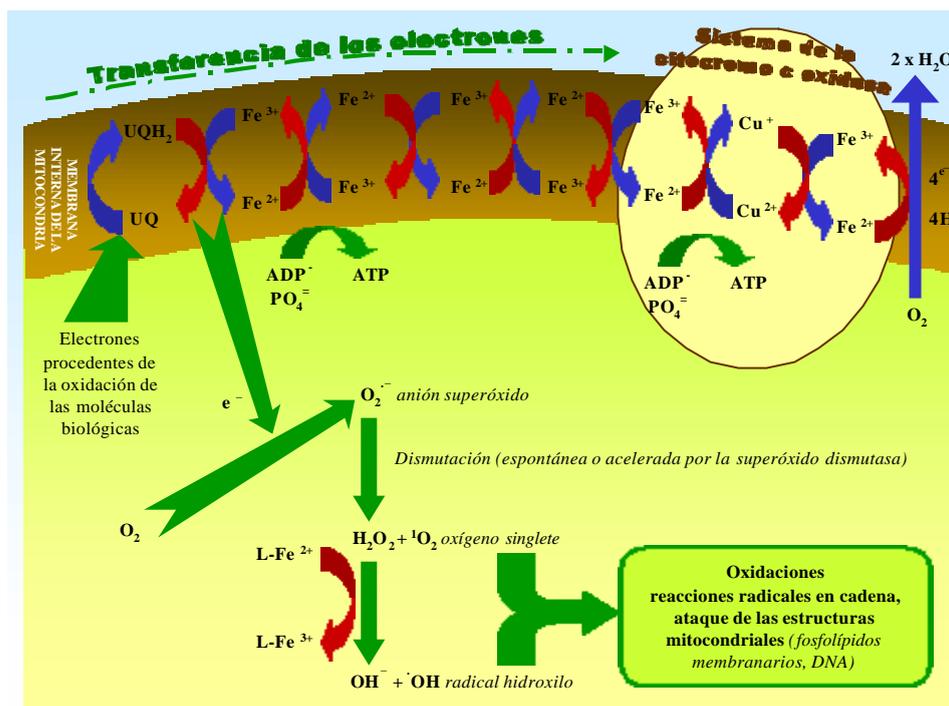
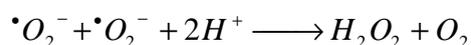


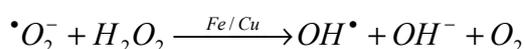
Ilustración I- 10: Especies activas incompletamente reducidas por adición secuencial de electrones en la cadena respiratoria

El **radical superóxido** se forma por adición de un electrón extra a una molécula de oxígeno. En estas vías metabólicas están implicadas enzimas como la xantina oxidasa, la aldehído oxidasa, la triptófano dioxigenasa, las flavín deshidrogenasas y las peroxidasa²⁰⁷. También puede generarse por la autooxidación de varias moléculas biológicamente importantes, como son el gliceraldehído, los compuestos tiólicos como la cisteína, las catecolaminas, las formas reducidas de la riboflavina y sus derivados FMN y FAD²⁰⁸, las hemoglobinas, las mioglobinas, los citocromos, etc. En solución acuosa el radical superóxido es capaz de reaccionar consigo mismo, en una reacción de dismutación:



Ecuación I- 2: Reacción de dismutación del radical superóxido

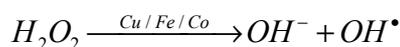
La reacción directa de los radicales $\cdot\text{O}_2^-$ es muy lenta a pH fisiológico, debido probablemente a la repulsión electrostática. Por este motivo, el radical superóxido formado en los sistemas biológicos tiene una vida media significativa, lo cual le permite difundir desde el lugar de su formación hasta otras estructuras celulares. Como carece de reactividad suficiente para atacar directamente a las macromoléculas, se ha llegado a proponer para él un papel de mensajero²⁰⁹. Sin embargo la enzima superóxido dismutasa, presente en multitud de organismos, elimina el radical superóxido catalizando la reacción anterior. Es esta transformación la que potencia su toxicidad ya que el radical superóxido reacciona con el peróxido de hidrógeno en presencia de hierro o cobre dando lugar al muy reactivo radical hidroxilo en la llamada reacción de Haber-Weiss:



Ecuación I-3: Reacción de Haber-Weiss

Cualquier sistema poseedor de superóxido dismutasa que genere $\cdot\text{O}_2^-$ producirá **peróxido de hidrógeno**. Existen también enzimas que llevan a cabo la reducción divalente del oxígeno sin mediación del $\cdot\text{O}_2^-$, como la urato oxidasa, la acil-coenzima A oxidasa, la NADH oxidasa, la glutatión oxidasa²¹⁰ y el sistema xantina/xantina oxidasa²¹¹, entre otras.

El H_2O_2 puro puede inactivar enzimas directamente, como la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa, oxidando grupos tiólicos, llevando a la célula a una deficiencia de ATP por inhibición de la glicolisis. En presencia de trazas metálicas (Cu, Fe, Co) se produce la reacción de Fenton²¹², dando lugar al radical hidroxilo a partir de H_2O_2 :



Ecuación I-4: Reacción de Fenton

Quizás sea la elevada reactividad de este radical el origen de muchos de los efectos atribuidos al peróxido de hidrógeno. La gran capacidad de esta molécula de difundir y atravesar membranas celulares, gracias a ser una molécula pequeña, sin carga y relativamente estable²¹¹, junto con la disponibilidad de trazas metálicas una vez dentro de la célula, potencia los efectos deletéreos del H_2O_2 mediados por la producción de $\text{OH}\cdot$.

El **radical hidroxilo**, $\text{OH}\cdot$, es el radical libre más reactivo que se conoce y es capaz de dañar a la mayoría de las moléculas que forman parte de las células²⁰⁴. Es tan reactivo que solamente existe como tal durante pocos microsegundos y se combina rápidamente con

moléculas vecinas, comenzando una serie de reacciones en cadena que pueden atacar al DNA provocando mutaciones. El daño biológico causado por OH^\bullet mejor caracterizado es la peroxidación lipídica²¹³.

El **oxígeno singlete**, O_2^s , posee una configuración electrónica de alta energía. Por ello la vida media de esta especie es corta, sobre todo en solución acuosa, pues pierde rápidamente su energía. Sin embargo en medios hidrofóbicos, como membranas celulares, este tiempo se prolonga, pudiendo reaccionar con ácidos grasos poliinsaturados formando peróxidos lipídicos.

I.4.1.2. EL ÓXIDO NÍTRICO

En los últimos años se le ha dedicado gran atención al óxido nítrico, NO, que se presenta en distintos estados redox: radical NO^\bullet , catión nitrosonio NO^+ y anión nitroxilo NO^- (formado a partir del radical NO por acción de la SOD²¹⁴). Como se ha mencionado anteriormente el NO tiene múltiples funciones, consideradas positivas o negativas dependiendo de la situación. Esta dicotomía del NO es debida, en parte, al espectro de especies redox con diferentes propiedades en las que se presenta, y su capacidad para reaccionar con el superóxido de oxígeno para rendir peroxinitritos ONOO^- . Los peroxinitritos son eficientes oxidantes de los tioles y su producción se ha implicado en la patofisiología del *shock* endotóxico²¹⁵.

Los mecanismos de acción descritos para el óxido nítrico son varios. La primera diana fisiológica descrita para el NO es la guanilato ciclasa soluble. Este radical se une a ella y la estimula controlando la función celular via GMPc (canales, proteínas quinasas o fosfodiesterasas dependientes de GMPc). También se une a la citocromo c oxidasa, inhibiendo reversiblemente la respiración de forma competitiva con el oxígeno, desenergizando la mitocondria y aumentando la generación de radical superóxido por este orgánulo. Este último mecanismo también parece muy relevante en las acciones fisiológicas y patológicas del NO¹⁹⁵. Finalmente se ha descrito que la liberación de Ca^{2+} mitocondrial está controlada por el estado oxidativo de los tioles del medio. Se ha probado que los peroxinitritos activan la liberación de Ca^{2+} por mitocondrias hepáticas estimulando la liberación específica dependiente de ADPribosa²¹⁶. Niveles excesivos de Ca^{2+} contribuyen a una serie de eventos citotóxicos que conducen finalmente a estrés oxidativo y necrosis o apoptosis celular¹⁹⁵.

I.4.1.3. PEROXIDACIÓN LIPÍDICA

El daño causado por radicales libres mejor caracterizado es la peroxidación lipídica. Este proceso en fosfolípidos de membrana, concretamente en ácidos grasos poliinsaturados, da lugar a acumulaciones de hidroperóxidos lipídicos en las membranas que alteran su funcionamiento y estructura. Además, estos hidroperóxidos dan lugar a una serie de productos altamente citotóxicos, la mayoría aldehídos²¹⁷, que pueden causar daños a proteínas y enzimas de membrana e inactivar receptores²¹⁸.

En la membrana mitocondrial interna se encuentran las enzimas de la cadena respiratoria responsables de la activación del oxígeno para favorecer su posterior reducción (Ilustración I-11). Éstas son capaces de captar los reactivos intermedios (superóxido, peróxido de hidrógeno y radical hidroxilo) hasta que se transfieren los cuatro electrones requeridos para la formación de H_2O . Sin embargo este acoplamiento no siempre es perfecto y en condiciones hipóxicas, como las ocasionadas durante el *shock*, se liberan los intermedios causando daños irreversibles como: peroxidación lipídica, inactivación de enzimas y rotura del DNA. Como sitio principal de generación del radical superóxido en la cadena respiratoria se ha descrito la ubiquinona²¹⁹.

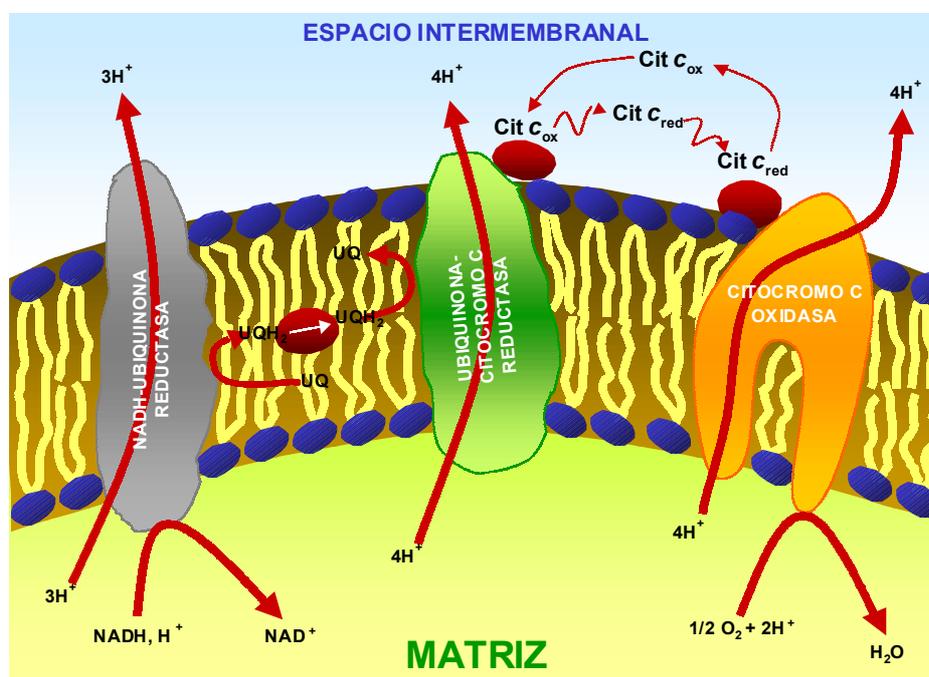


Ilustración I-11: Proteínas implicadas en la cadena respiratoria de la membrana mitocondrial

I.4.2. MECANISMOS DE DEFENSA ANTIOXIDANTE EN LOS SISTEMAS BIOLÓGICOS

La aparición de especies reactivas de oxígeno es una característica de la vida aerobia. La existencia y desarrollo de células en un ambiente oxidante no sería posible sin poderosos mecanismos de defensa frente a dichas especies.

I.4.2.1. MECANISMOS NO ENZIMÁTICOS

El tripeptido glutatión (L- γ -glutamil-L-cisteinil-glicina) es el compuesto tiólico de bajo peso molecular más abundante en las células y de mayor distribución en los sistemas biológicos. Los niveles intracelulares de GSH en células de mamíferos se halla en el intervalo de 0,5 a 10mM²²⁰.

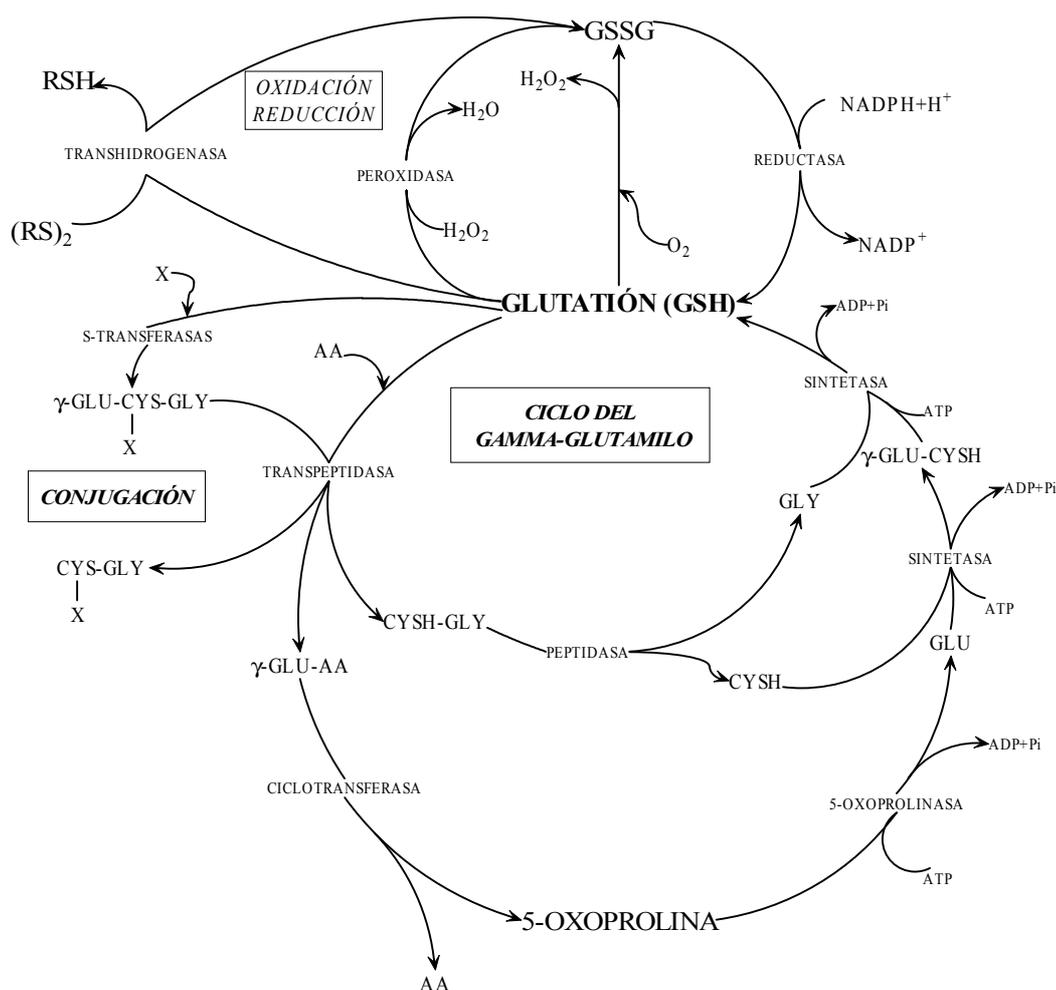


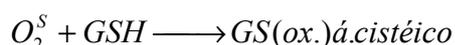
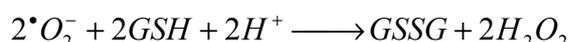
Ilustración I-12: Esquema general del metabolismo del glutatión

Su actividad antioxidante se debe a la capacidad reductora del grupo tiol de su cisteína. Puede actuar como reductor en reacciones enzimáticas catalizadas por la glutatión peroxidasa (GPx) o no enzimáticas. Constituye la fuente de poder reductor más importante en la célula²²¹. El grupo tiólico del glutatión reducido está muy expuesto por lo que es oxidado rápidamente por el O₂, evitando la oxidación de grupos tiólicos de proteínas:



Ecuación I-5: Oxidación del glutatión

También actúa como reductor de puentes disulfuro formados por oxidación en proteínas. Puede eliminar radicales superóxido, hidroxilo, oxígeno en estado singlete y reducir cualquier molécula orgánica oxidada:

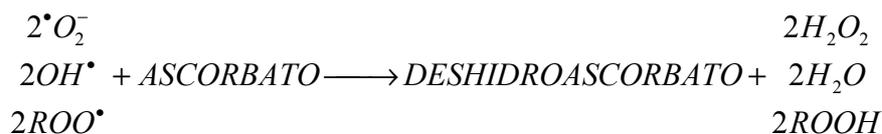


Ecuación I-6: Reacciones redox en las que toma parte el glutatión

También contribuye a la eliminación de peróxido de hidrógeno y peróxidos lipídicos, catalizada por la glutatión peroxidasa. La reducción del glutatión oxidado (GSSG) es mediada por una enzima ampliamente distribuida en los tejidos, la GSSG reductasa (GR) dependiente de NADPH (Ilustración I-12).

El GSH actúa como cofactor de numerosas enzimas y tiene un papel relevante en el metabolismo de xenobióticos generando ácidos mercaptúricos por acción de las glutatión-S-transferasas. Estas enzimas son particularmente abundantes en hígado donde los conjugados de GSH son excretados con la bilis, utilizando los mismos mecanismos de transporte que expulsa el GSSG durante el estrés oxidativo. La acumulación de GSSG por estrés oxidativo puede inactivar una serie de enzimas (adenilato ciclasa, fosfofructoquinasa, fosforilasa fosfatasa...) probablemente por formación de puentes disulfuro con ellas²²²⁻²²⁷.

El **ácido ascórbico o Vitamina C** reacciona rápidamente con el radical superóxido y el peróxido de hidrógeno e incluso más rápidamente con el radical hidroxilo:



Ecuación I-7: Reacciones en las que toma parte el ascorbato

La reducción del deshidroascorbato puede darse por reducción directa con GSH, o enzimáticamente mediante la NADH deshidroascorbato reductasa o la GSH deshidroascorbato reductasa. Por otro lado el ácido ascórbico participa en la restauración de vitamina E reducida²²¹.

En 1981 se observó que el **ácido úrico** es un potente eliminador del oxígeno singlete, del radical $OH\cdot$, de radicales $ROO\cdot$, dando lugar a H_2O , H_2O_2 y $ROOH$, respectivamente²²⁸. Asimismo se ha demostrado la capacidad del ácido úrico de inhibir la peroxidación lipídica²²⁹.

La **vitamina E** incluye a 8 nutrientes liposolubles llamados **tocoferoles**²³⁰. Parece ser el principal antioxidante en las membranas celulares animales. Su capacidad antioxidante suele atribuirse al carácter reductor del grupo hidroxilo de su anillo cromanol. Su alta solubilidad en lípidos le permite acceder directamente a los grupos peroxilo, frenar la reacción en cadena y evitar la fragmentación de los hidroperóxidos lipídicos²³¹. Así pues la mayor función biológica del α -tocoferol como antioxidante reside en su poder secuestrante de radicales libres:

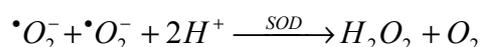


Ecuación I-8: Reacción de generación de radical tocoferilo

Los radicales tocoferilo generados pueden ser reducidos de nuevo por varios agentes, entre ellos el ácido ascórbico²³² aunque para ello deben hallarse próximos a la interfase membrana-citosol.

I.4.2.2. MECANISMOS ENZIMÁTICOS

La actividad **superóxido dismutasa** (EC 1.15.1.1) (SOD) fue descrita por primera vez por *McCord* y *Fridovich* en 1969²³³. Estos autores demostraron que la hemocupreína de eritrocitos era capaz de eliminar el radical superóxido, catalizando su dismutación:

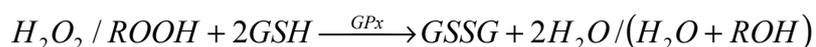


Ecuación I-9: Reacción catalizada por la superóxido dismutasa

Se han encontrado tres tipos de SOD. Todas ellas catalizan la misma reacción con un mecanismo idéntico, pero se diferencian en el metal presente en su centro activo.

- Cu/Zn-SOD: Se encuentra en el citoplasma de todas las células eucariotas. Posee un peso molecular de 32kD con dos subunidades de 153 aminoácidos, cada una de las cuales posee un sitio activo con un átomo de cobre, con actividad catalítica, y otro de zinc, que estabiliza la estructura. Es una enzima muy estable lo que facilita su aislamiento pero es fuertemente inhibida por cianuro, lo que la diferencia del resto de las SOD.
- Mn-SOD: Proteína aislada primeramente en *E. coli* cuyo peso molecular es de 40kD. En organismos bacterianos suele tener 2 subunidades. También se ha aislado en organismos superiores pero tan sólo en la matriz mitocondrial^{234,235}. En estos organismos posee 4 subunidades, es mucho más lábil que la Cu/Zn-SOD y no es inhibida por cianuro.
- Fe-SOD: Similar a la Mn-SOD, se encuentra casi exclusivamente en procariontes y algas.

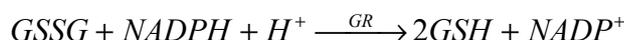
La **glutación peroxidasa** (EC.1.11.1.9) (GPx) está constituida por 4 subunidades de 182 aminoácidos y contiene un átomo de Se en el centro activo de cada subunidad. La proteína nativa tiene un peso molecular de 84kD. Fue *Mills* en 1957 quien descubrió la enzima en los tejidos animales²³⁶. Su sustrato es específicamente glutación (GSH) aunque puede utilizar peróxidos orgánicos además de H₂O₂:



Ecuación I-10: Reacción general catalizada por la GPx.

El Se se encuentra en el centro activo como seleno-cisteína, es decir ocupando el lugar del S en el grupo tiólico de la cisteína. Las dietas animales requieren trazas de Se aunque en mayores cantidades es tóxico. Varios síntomas de la deficiencia de Se se han asociado a la deficiencia de glutación peroxidasa.

La relación GSSG/GSH en células normales se mantiene baja, por lo tanto ha de haber un mecanismo que vuelva a reducir el GSSG a GSH. De esto se encarga la **glutación reductasa** (EC 1.6.4.2) (GR) que cataliza la siguiente reacción:



Ecuación I-11: Reacción catalizada por la glutación reductasa

La GR también puede catalizar la reducción de ciertos disulfuros mixtos, tales como los que se forman entre GSH y el coenzima A. Estructuralmente la glutatión reductasa contiene dos subunidades proteicas, cada una con un nucleótido de flavina FAD en su centro activo. El NADPH reduce el FAD, que entonces pasa sus electrones al puente disulfuro entre dos cisteínas de la proteína. Los dos grupos tiólicos así formados interaccionan entonces con el GSSG y lo reducen a 2GSH, volviéndose a formar el puente disulfuro de la proteína.

La enzima **catalasa** (E.C.1.11.1.6) cataliza la reacción de descomposición del H_2O_2 para dar H_2O y O_2 . Es de gran importancia en el metabolismo de las especies reactivas del oxígeno y puede ser considerada como eliminadora de radicales libres, aunque el H_2O_2 no sea un radical²³⁷. La mayoría de las células poseen actividad catalasa, en animales se encuentra especialmente concentrada en eritrocitos y en hígado.



Ecuación I-12: Reacción catalizada por la catalasa

La cinética de la catalasa no obedece a un patrón normal, es una enzima no saturable por sustrato y existe una rápida inactivación a concentraciones de H_2O_2 por encima de $0,1M$ ²³⁸. La catalasa purificada está formada por 4 subunidades proteicas, cada una de las cuales posee un grupo hemo (Fe^{3+} -protoporfirina) unido a un sitio activo, y tiene un peso molecular que oscila entre 210KD y 280KD. Cada subunidad suele contener también una molécula de NADPH unida, que ayuda a estabilizar la enzima²³⁹. La actividad catalasa en tejidos animales está localizada en los peroxisomas.

El papel protector de la catalasa frente al ataque oxidativo se pone de manifiesto en situaciones como la hiperoxia, en la que se produce una mayor cantidad de H_2O_2 ²⁴⁰ y que suele asociarse con inducciones adaptativas de la actividad catalasa^{241,242}. Estos incrementos consiguen aumentar la tolerancia de los organismos a la hiperoxia.

El hígado contiene grandes concentraciones de catalasa y glutatión peroxidasa. Mientras la catalasa está prácticamente en su totalidad en los peroxisomas, la GPx se encuentra principalmente en el citosol y en la matriz mitocondrial, siendo similar la distribución del GSH. De forma que el peróxido de hidrógeno producido, por ejemplo, por la urato oxidasa en los peroxisomas es eliminado principalmente por la catalasa, mientras que el peróxido de hidrógeno generado en las mitocondrias, el retículo endoplasmático o por las enzimas citosólicas como la superóxido dismutasa es eliminado por la GPx. La capacidad del sistema glutatión para actuar en

otros tejidos depende de la actividad de la peroxidasa, la glutatión reductasa y las enzimas de la ruta de las pentosas fosfato.

I.5. ESTRATEGIAS TERAPÉUTICAS CONTRA EL *SHOCK*

El tratamiento de la sepsis consiste habitualmente en la administración de fluidos y vasopresores para restaurar la presión sanguínea, oxigenoterapia y administración de antibióticos^{243,244}. Estas medidas tan sólo aplacan la severidad de los síntomas evitando la instauración del *shock*, sin embargo son insuficientes ya que las tasas de mortalidad son muy altas. Por otro lado la utilización de ciertos antibióticos puede aumentar los niveles de LPS en la circulación al alterar la integridad de la pared bacteriana promoviendo su liberación²⁴⁵.

La utilización de corticosteroides para disminuir la respuesta inflamatoria provoca la aparición de superinfecciones y no disminuye la mortalidad*. La utilización de drogas que suprimen la respuesta inmune parece ineficaz por lo que la estrategia que se considera más prometedora es el desarrollo de métodos más específicos de interferencia de la respuesta inmune a la endotoxina^{246,247}. La inmunización pasiva contra el LPS con anticuerpos ha dado resultados desalentadores, lo que, junto a su alto coste, ha descartado su utilización²⁴⁶. Se está estudiando la utilización de antagonistas del LPS tales como la Polimixina B, el Lípido X o el Lípido IV. Son prometedores los estudios con Lípido A de *Rhodobacter sphaeroides* y *Porphyromonas gingivalis* ya que parecen inhibir la respuesta inflamatoria de LPS patógenos sin eliminar su capacidad inmunoestimuladora. Además se están poniendo a punto nuevas estrategias tales como el uso de antioxidantes y la inmunoterapia. En la Tabla I-9 se han resumido las aproximaciones más interesantes.

<i>Estrategia</i>	<i>Observaciones</i>
<i>Neutralización LPS</i>	
Inmunoglobulinas ²⁴⁸	
Antisuero α-E. coli J5 humano ^{249,250}	Ensayos clínicos fase III. Mejora del pronóstico apenas significativa. Sólo han sido satisfactorios los últimos ensayos con inmunoglobulinas no específicas.
E5 (anticuerpos monoclonales anti α-Lípido A) ^{251,252}	
HA-1A (Centoxina) (anticuerpos monoclonales anti α-Lípido A) ²⁵¹	
Polimixina B ²⁵³	Muy eficaz neutralizando LPS pero muy tóxica.

* Recientes investigaciones con dosis más bajas de glucocorticoides parecen dar resultados más positivos⁴⁴⁸

<i>Estrategia</i>	<i>Observaciones</i>
Neutralización LPS	
LBP ²⁵⁴⁻²⁵⁶	Ensayos clínicos fase I. Mejora la supervivencia. Sin embargo algunos autores proponen su neutralización como método terapéutico.
rBPI ²⁵⁷ , quimera BPI/LBP ²⁵⁸	Ensayos clínicos fase I. Reduce ligeramente la liberación de LPS y reduce la mortalidad.

Antagonistas del LPS	
Lípido X ^{253,259}	In vitro inhiben la liberación de citoquinas proinflamatorias.
Lípido IV ^{253,260}	
Lípido A de <i>Rhodobacter sphaeroides</i> (RSLA) ²⁶⁰	
Lípido A de <i>Porphyromonas gingivalis</i> (PGLA) ²⁶¹	

Restauración de la hemostasis	
DuP753 (antagonista de la angiotensina II) ²⁶²	Ensayos clínicos fase I. Disminuye el daño hepático.
Vasopresores (noradrenalina, dopamina, adrenalina, fenilefrina, vasopresina) ²⁶³	Se usan para el tratamiento de la hipotensión en el shock. Se recomienda abandonar su uso en la práctica clínica debido a sus potenciales severos efectos adversos.
Inhibidores de las iNOS ^{198,199,264}	Se describe como particularmente desfavorable la inhibición de la síntesis de NO, ya que provoca un aumento de DIC.
Conjugado piridoxalado de hemoglobina-polioxi-etileno (PHP) ²⁶⁵	Ensayos clínicos fase III. Derivado modificado de hemoglobina humana, elimina NO eficazmente y tiene importantes actividades antioxidantes. Se ha probado su eficacia en el control de la hipotensión en el SIRS asociado al shock.
Antitrombina III, Proteína C, Inhibidor de la ruta del factor tisular (rhTFPI) ²⁶⁶⁻²⁷⁰	Ensayos clínicos fase III. Ligero aumento de la supervivencia.

Neutralización de mediadores endógenos	
SC-19220 (antagonista de la PGE2) ²⁷¹	Evaluación preclínica en modelos animales. Favorece la monocitopenia.
Terapia anti TNF (anticuerpos o receptores solubles) ^{248,272-275 202 276}	Resultados contradictorios.
Terapia anti-PAF ²⁰²	Resultados negativos.
Terapia anti IL-1 (anticuerpos, antagonistas) ^{202,274,275}	Resultados contradictorios.

Mediadores endógenos	
rG-CSF ^{276,277}	Ensayos clínicos Fase IV. Esta droga está aprobada para la prevención de infecciones durante terapia antineoplásica de tumores no mieloides.
IL-10 ^{274,278}	Ensayos clínicos fase II. Inhibe la inflamación y la

<i>Mediadores endógenos</i>	
IL-11 ^{267,279}	<p>respuesta inmune mediada por células <i>in vitro</i>. Pocos efectos adversos.</p> <p>Ensayos clínicos fase I. Disminuye la producción de citoquinas pero no exacerba la infección sistémica, protege la mucosa gástrica.</p>
<i>Antioxidantes</i>	
Antioxidantes ^{265,280-282}	Se sugiere que pueden tener gran impacto en terapia clínica.
Glutación ²⁸³	Ensayo clínico fase III, reduce el nivel de lipoperoxidos en suero en un modelo de <i>bypass</i> cardiopulmonar.
N-acetil cisteína (NAC) (precursor del glutación) ²⁸⁴⁻²⁸⁶	Ensayo clínico fase I. Disminuye la liberación de TNF, la inflamación neutrofílica y el daño pulmonar.
Vitaminas C y E ^{287,288}	En animales unos niveles adecuados de vitaminas mejora la supervivencia. Su administración exógena no previene la inflamación pero mejora parcialmente ciertos parámetros séricos (AST, ALT...).
<i>Otras estrategias</i>	
Inhibidores de la apoptosis ^{289,290}	Ensayo clínico fase I. Inhiben la apoptosis de células linfoides. Aumenta la supervivencia.
Deshidroepiandrosterona (DHEA) ²⁹¹	Ensayo clínico fase I. Hormona esteroidea con actividad inmunoestimuladora. Reduce los niveles de TNF- α , mejora la función de las células T y la supervivencia.
MCI-145 (modulador de calcio) ²⁹²	Ensayo clínico fase I. Mejora la función cardíaca.
Inmunonutrición ²⁹³⁻²⁹⁶	Ciertos suplementos nutricionales parecen reducir las complicaciones sépticas. Especialmente antioxidantes como las vitaminas C y E.
Propofol (sedante no barbitúrico) ²⁹⁷	Evaluación preclínica en modelos animales. Inhibe la respuesta inflamatoria y evita el desarrollo de acidosis metabólica.

Tabla I-9: Estrategias terapéuticas contra el shock endotóxico

Desde la década de los sesenta se sabe que el plasma o el suero normal pueden neutralizar los efectos biológicos de la endotoxina^{298,299}. Se ha estudiado en diferentes modelos experimentales la capacidad de los componentes del plasma para inhibir la respuesta inflamatoria, encontrándose a las lipoproteínas responsables de estos efectos (Tabla I-10). Se ha relacionado esta capacidad con el contenido en triglicéridos, fosfolípidos y colesterol, si bien las apolipoproteínas AI y B son capaces de inactivar directamente dicha respuesta tanto *in vivo* como *in vitro*³⁰⁰⁻³⁰². El Lípido A puede interactuar con fosfolípidos, no sólo con interacciones hidrofóbicas sino probablemente también iónicas dada la capacidad zwitteriónica de éstos últimos. La asociación de las lipoproteínas con la endotoxina es muy estable y la inhibición de

sus actividades biológicas es debida probablemente a la ocultación del Lípido A, parte tóxica, entre los lípidos de la partícula. El LPS forma complejos con las HDL *in vivo* en plasma de ratas y su eliminación del plasma sigue la misma cinética que la de las HDL¹⁰⁰.

<i>Actividades biológicas de la endotoxina</i>	<i>Inactivación por</i>
Activación del lisado del Limulus	VLDL, LDL, HDL, quilomicrones, apoAI, apoB ^{300,303}
Pirogenicidad	Lipoproteínas, HDL, apo AI ^{301,304-306}
Liberación de citoquinas por los macrófagos (IL-1, TNF-α, IL-6)	Lipoproteínas, LDL, HDL, quilomicrones ^{305,307-309}
Citotoxicidad	LDL, HDL ^{47,310}
Neutropenia	Lipoproteínas, HDL ^{304,306}
Trombocitopenia	HDL ³⁰⁴
Activación del complemento	Lipoproteínas, HDL ^{304,306}
Mortalidad experimental	VLDL, LDL, HDL, quilomicrones ^{304,306,311}

Tabla I-10: Actividades biológicas de la endotoxina inhibidas por lipoproteínas

Estudios clínicos revelan que los pacientes en UCI tienen niveles extremadamente bajos de lipoproteínas³¹². Sin embargo son necesarios niveles fisiológicos de lípidos séricos para disminuir la toxicidad del LPS³¹³, considerándose la hiperlipidemia detectada durante el *shock* endotóxico experimental una respuesta de defensa inespecífica³¹⁴. En ensayos clínicos Fase I la administración de rHDL disminuye los niveles plasmáticos de LPS, mejora la función renal y la hemostasis, disminuye el recuento leucocitario y la liberación de citoquinas pro-inflamatorias pero presenta cierta toxicidad hepática y neurológica³¹⁵⁻³¹⁸. Durante los últimos años los grandes avances en el conocimiento del papel de la LBP y del receptor CD14 como potentes activadores séricos de la respuesta inflamatoria han ralentizado el estudio de la participación de las lipoproteínas en este proceso. Sin embargo los fracasos clínicos en las terapias³¹⁹ y resultados recientes localizando el 99% de la LBP asociada a la apolipoproteína AI³²⁰ aconsejan dedicar nuevos esfuerzos para desvelar el mecanismo de acción de las lipoproteínas como posibles agentes protectores.

II. OBJETIVOS

El hígado es el órgano principal para la eliminación de las endotoxinas bacterianas con la participación de las células de Kupffer y las células parenquimatosas. Este proceso va acompañado de la liberación de radicales libres de oxígeno generados principalmente por las células fagocíticas. Aunque la liberación de estos compuestos supone un mecanismo de defensa antimicrobiana, estos metabolitos inician procesos de peroxidación lipídica que suelen inducir alteraciones irreversibles en las membranas de las células hepáticas. Para prevenir estas alteraciones los seres vivos han desarrollado mecanismos de neutralización de radicales libres entre los que ocupan un lugar destacado el tripéptido glutatión y las enzimas glutatión peroxidasa, glutatión reductasa, superóxido dismutasa y catalasa. Las células parenquimatosas hepáticas poseen niveles especialmente elevados de estas enzimas y de glutatión, lo que las convierte en puntos clave en la respuesta frente a los radicales libres. Un equilibrio inadecuado entre especies oxidantes y mecanismos antioxidantes, junto con la acción directa de las endotoxinas sobre los distintos tipos celulares, pueden representar los mecanismos primarios del *shock endotóxico*.

El principal objetivo de la presente tesis doctoral ha sido el estudio de la respuesta hepática al estrés oxidativo desencadenado por la endotoxina de *E.coli* 0111:B4 (LPS). Para ello se han utilizado los siguientes modelos experimentales:

- a) Inducción de un estado de ***shock endotóxico reversible*** en ratas mediante la administración de LPS para evaluar los efectos producidos *in vivo* sobre el hígado y el plasma.
- b) Tratamiento *in vitro* con LPS y complejos HDL-LPS de células parenquimatosas hepáticas y células sinusoidales (Kupffer y endoteliales) en suspensión y cultivo para evaluar la acción directa de la endotoxina sobre los principales tipos celulares hepáticos y el posible papel protector de las HDL.
- c) Tratamiento *in vitro* de células parenquimatosas hepáticas en cultivo con citoquinas (IL-1 β , TNF- α) y sobrenadantes de células sinusoidales estimuladas con LPS así como el co-cultivo de células parenquimatosas con células sinusoidales en presencia y ausencia de LPS para evaluar los efectos de distintos mediadores de la acción endotóxica.

Estos modelos *in vivo* e *in vitro*, han sido diseñados para abordar los siguientes aspectos:

- i) Estudio del sistema glutatión hepático y plasmático durante el ***shock* endotóxico reversible**.
- ii) Estudio de los sistemas enzimáticos antioxidantes hepáticos superóxido dismutasa mitocondrial y catalasa durante el ***shock* endotóxico reversible**.
- iii) Caracterización del estado oxidativo de células hepáticas en cultivo. Evaluación comparativa de la acción directa de LPS, TNF e IL-1 sobre sistemas antioxidantes de estas células.
- iv) Estudio del efecto de mediadores de células sinusoidales activadas con LPS sobre el sistema glutatión de células parenquimatosas.
- v) Estudio de los efectos de la comunicación entre células sinusoidales y parenquimatosas sobre el metabolismo del glutatión mediante co-cultivos celulares en membranas porosas en presencia y ausencia de LPS.
- vi) Conocimiento de las características de unión simultánea del LPS a células endoteliales y a células de Kupffer mediante citometría de flujo tras la puesta a punto de ensayos de doble marcaje.
- vii) Caracterización de complejos LPS-HDL estables para el estudio del efecto de estas estructuras en la actividad biológica del LPS. Efecto de la interacción LPS-HDL en la unión del LPS a células parenquimatosas y sinusoidales y en el estado oxidativo celular.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

III.1. ENDOTOXINA

La endotoxina utilizada en todos los ensayos es el lipopolisacárido de la cepa de *Escherichia coli* serotipo 0111:B4, obtenida según el método de Westphal⁵⁹ (Sigma Chemicals CO, St. Louis).

Para el estudio de la interacción de la endotoxina con los distintos tipos celulares hepáticos, mediante citometría de flujo se utiliza el mismo lipopolisacárido, marcado con isotiocianato de fluoresceína (7,8 FITC mg / mg LPS).

Durante la sepsis, los niveles plasmáticos de LPS se encuentran en el rango ng/ml^{321,322} que son concentraciones menores de las que se han utilizado para los estudios *in vitro* descritos en el presente trabajo (hasta 300µg/ml). Sin embargo, las concentraciones de LPS en los focos de infección pueden ser varios órdenes de magnitud mayores que los encontrados en el suero de afectados, especialmente después del tratamiento con antibióticos. El hígado elimina directamente las bacterias o endotoxinas translocadas del intestino a la circulación portal, reteniéndolas y evitando que entren en la circulación sistémica. Por otro lado no debe olvidarse que la endotoxina es parcialmente metabolizada por las células de Kupffer y liberada a los sinusoides hepáticos sin ser destoxificada, siendo finalmente excretada con la bilis.

III.2. MATERIAL BIOLÓGICO

Para el estudio de la acción de la endotoxina *in vivo* así como para la obtención de los distintos tipos celulares hepáticos, se utilizan ratas macho Wistar de un peso comprendido entre 150 y 200 gramos. La manipulación de los animales se lleva a cabo siguiendo la normativa dictada en el Real Decreto 223/1988 del 14 de marzo sobre protección de animales utilizados en la experimentación y con otros fines científicos.

Para la obtención de las lipoproteínas se utiliza sangre humana donada por voluntarios sanos o bien amablemente cedida por el Bloed Bank Leiden.

III.3. MODELOS EXPERIMENTALES

III.3.1. INDUCCIÓN DEL *SHOCK* ENDOTÓXICO REVERSIBLE

El *shock* endotóxico reversible se induce en ratas macho Wistar de 150-200g por inyección intravenosa (en la vena dorsal o ventral de la cola) de una solución de LPS en suero fisiológico. La dosis inyectada es de 1,6mg LPS/0,2ml/100g peso. Previamente el animal es ligeramente anestesiado con éter dietílico. Paralelamente se realiza la misma operación con animales control a los que se inyecta suero fisiológico (NaCl 0,9%). Posteriormente se mantiene a los animales con agua y alimento *ad libitum* hasta que son sacrificados.

Los puntos del estudio, elegidos de acuerdo con estudios previos¹¹⁶, fueron: 5h fase aguda, 24h fase de recuperación temprana y 48h fase de recuperación tardía. A los distintos tiempos los animales son adormecidos ligeramente con éter dietílico y sacrificados por dislocación cervical, practicando seguidamente una laparotomía para la obtención del suero y la extracción del hígado.

Tras practicar la laparotomía se abre la caja torácica dejando accesible el corazón, para extraer la sangre por punción cardiaca del ventrículo izquierdo con jeringuillas de 5ml estériles provistas de aguja grande para evitar la hemólisis. El volumen obtenido (aproximadamente 4ml) se deposita en tubos preparados con heparina (Li-heparina Sarstedt) que se someten a agitación suave. Los tubos se centrifugan en una centrífuga de mesa (10-15min), tras lo que se recoge el plasma con pipetas estériles y se mantienen las muestras a -80°C hasta su análisis.

Con posterioridad a la extracción de la sangre se extrae el hígado y se inyecta suero fisiológico (NaCl 0,9%), hasta que quede completamente lavado de sangre. De esta forma se evita la contaminación de hemoglobina en las muestras que afectaría a las posteriores determinaciones espectrofotométricas. Las muestras se mantienen a -80°C hasta su análisis.

III.3.2. AISLAMIENTO DE DISTINTOS TIPOS CELULARES HEPÁTICOS

III.3.2.1. AISLAMIENTO DE CÉLULAS PARENQUIMATOSAS

Las células parenquimatosas (Pc) se obtienen por perfusión con colagenasa tipo I (EC 3.4.24.3.) de *Clostridium histolyticum* (Boehringer Mannheim, D) al 0,03%(10UI) según el método de Berry y Friend³²³ modificado por Seglen³²⁴⁻³²⁶.

Durante el aislamiento se utilizan secuencialmente tres tipos de disoluciones Krebs-Ringer-bicarbonato (KRB I, KRB II y KRB III), cuya composición y preparación se indica en la Tabla III-1.

Todos los tampones se gasean con carbógeno (95% O₂, 5% CO₂), antes y a lo largo de la perfusión; ya que el pH óptimo es de 7,5 y no debe descender de 7,3. Los KRB I y II son mantenidos a 37°C, el KRB III a 4°C. Estas disoluciones han de prepararse inmediatamente antes de ser utilizadas.

<i>SALES</i>	<i>KRB I (mM)</i>	<i>KRB II (mM)</i>	<i>KRB III (mM)</i>
NaCl	118	118	118
NaHCO ₃	24,9	24,9	24,9
KCl	4,73	4,73	4,73
KH ₂ PO ₄	1,18	1,18	1,18
MgSO ₄ •7H ₂ O	-	-	1,18
CaCl ₂ •2H ₂ O	-	2,53	2,53

<i>OTROS</i>	<i>KRB I</i>	<i>KRB II</i>	<i>KRB III</i>
Hepes	20mM	20mM	20mM
Penicilina	0,160UI/ml	0,160UI/ml	0,160UI/ml
Estreptomina	16µg/ml	16µg/ml	16µg/ml
Colagenasa	-	10UI	-
EDTA	45mg	-	-

Tabla III-1: Composición de los KRB

Las ratas se ayunan y se mantienen con agua *ad libitum* 18h antes de la perfusión. Los animales son anestesiados ligeramente con éter para evitar el estrés, lo que provocaría una vasoconstricción periférica hepática e impediría el transcurso normal de la perfusión. Más tarde se les administra pentotal sódico (Abbot Laboratories S.A., Madrid) por vía intraperitoneal (10mg/100g de peso/100µl suero fisiológico).

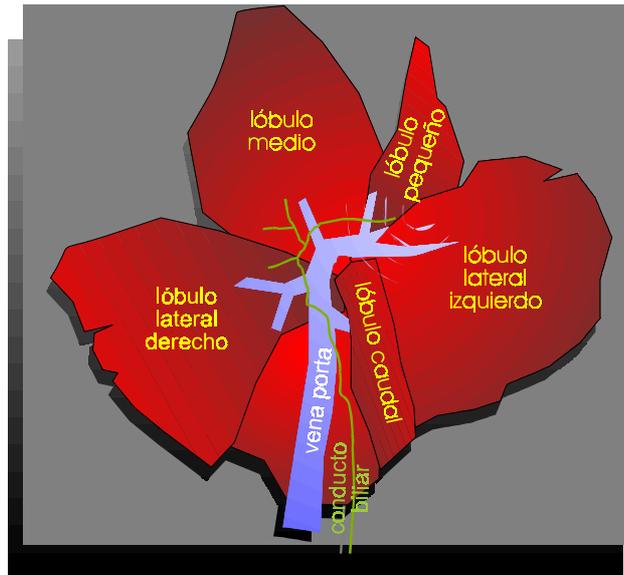


Figura III-1: Representación esquemática de la posición del hígado durante la perfusión.

Una vez anestesiada la rata, se abre la cavidad intraperitoneal hasta el diafragma, teniendo cuidado de no dañar el hígado. Se apartan las capas de piel y músculo y se retira la masa visceral para hacer posible la visión clara de hígado, vena porta y demás vasos sanguíneos (Figura III-1). Se preparan dos ligaduras: una anterior a la entrada de la vena mesentérica superior, y otra posterior a la entrada de la vena esplénica. Entre estos dos puntos se introduce una cánula conectada a un circuito de perfusión accionado por una bomba peristáltica (Millipore Inst.) de flujo regulable, a flujo mínimo. Inmediatamente se ajustan las ligaduras anterior y posterior y se secciona la vena cava inferior, para evitar cualquier sobrepresión interna que pudiera dañar a las células parenquimatosas. A continuación se aumenta el flujo lentamente hasta 26 ml/min. Durante la perfusión se pinza la vena cava superior, de manera intermitente, con el fin de aumentar la circulación del líquido a través del hígado.

En primer lugar se perfunde el hígado con KRB I (130ml), sin calcio ni magnesio y con 45mg de EDTA. Este agente quelante de calcio evita la coagulación y hace que el tejido sea más susceptible a la digestión enzimática³²⁶. Seguidamente se perfunde con el KRB II (130ml), al que se le añaden 10UI de colagenasa. Este segundo tampón contiene calcio, que activa la colagenasa y estimula la dispersión enzimática, y está libre de magnesio que inhibe a la enzima³²⁴.

Una vez finalizada la perfusión, se extrae el hígado y se coloca sobre una placa Petri que contiene KRB III, tampón con calcio y magnesio, a una temperatura de 4°C. En esta placa se trocea el hígado, después de separar la cápsula de Glisson que lo envuelve, liberándose así las células al tampón. La mezcla se pasa a un contenedor estéril con KRB III donde se gasea con

carbógeno durante 5min. A partir de aquí se seguirá el aislamiento en condiciones estériles en cámaras de flujo laminar (Telstar Micro V y Telstar CAM 1400 I). Después de filtrar por gasa doble para eliminar el tejido no disgregado, se centrifuga durante 20s, a 4°C y 165g en centrífuga SORVALL RT6000. De esta manera se eliminan las células no viables, hematíes y células no parenquimatosas. El sedimento se lava 2 ó 3 veces en el medio de cultivo, William's E (Seromed) o en el tampón adecuado si se van a utilizar las células en suspensión. Todo el material utilizado en estos últimos pasos es estéril y preferentemente de plástico para no dañar las células.

La viabilidad celular se determina mediante la prueba de exclusión del azul Tripán. A 50µl de la suspensión de células se le añaden 750µl de KRB III y 250µl de una solución de azul Tripán 0,4% en NaCl (0,9%). Se mezclan y se realiza el recuento en una cámara Neubauer (0,0025mm²/0,10mm). El azul Tripán penetra en todas las células pero sólo aquellas que son viables logran expulsarlo. La viabilidad en todos los ensayos está comprendida entre el 80 y 90%, obteniéndose $100 \times 10^6 \pm 20 \times 10^6$ células/hígado.

III.3.2.2. AISLAMIENTO DE CÉLULAS SINUSOIDALES

Las células no parenquimatosas (células sinusoidales, Sc, NPc) están constituidas por cuatro tipos diferentes: células de Kupffer (Kc, macrófagos), células endoteliales (Ec), células acumuladoras de grasa (fat-storing) y células Pit. Las semejanzas en tamaño y forma entre Kc y Ec determinan la necesidad de utilizar un procedimiento complejo de aislamiento y purificación celular.

El aislamiento se lleva a cabo mediante la perfusión de hígado de rata con colagenasa (tipo H, EC 3.4.24.3, Boehringer Mannheim, G.) al 0,04% y pronasa (proteasa E, EC 3.4.24.4, Merck, Dramstadt, G.) al 0,04%, según el método de van Bossuyt y Wisse modificado³²⁷.

El pretratamiento de las ratas (anestesia) antes de iniciar la operación es idéntico al realizado en el caso de las células parenquimatosas (apartado III.3.2.1). 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, entre la entrada de la vena mesentérica superior y el hígado. Por debajo de este punto se introduce en la vena una aguja conectada al circuito de perfusión accionado por una bomba peristáltica de flujo regulable (Millipore, Bedford, MA, EE.UU.). Se tensa la ligadura e inmediatamente se hace un corte en la

vena cava inferior. Lentamente se incrementa el flujo, que era mínimo durante la canulación, hasta alcanzar 20ml/min. Secuencialmente se utilizan dos soluciones, Gey's-Balanced-Salt-Solutions (GBSS) a pH 7,4.

<i>SALES</i>	<i>GBSS I (mM)</i>	<i>GBSS II (mM)</i>
KCl	5,00	5,00
NaH ₂ PO ₄ •2H ₂ O	2,00	2,00
KH ₂ PO ₄	0,20	0,20
NaHCO ₃	3,00	3,00
MgCl ₂ •6H ₂ O	1,00	1,00
CaCl ₂ •2H ₂ O	-	1,60
MgSO ₄ •7H ₂ O	0,3	0,3
NaCl	138	138

<i>OTROS</i>	<i>GBSS I</i>	<i>GBSS II</i>
Glucosa	0,1% (p/v)	0,1% (p/v)
EDTA	75mg	-
Volumen	250ml	300ml

Tabla III-2: Composición de las soluciones *Gey's-Balanced-Salt-Solutions*.

Ambas disoluciones son esterilizadas mediante filtración (Sterivex-GV, 0,22µm, Millipore) y se les añade penicilina (0,160UI/ml) y estreptomina (16µg/ml).

En primer lugar se hace pasar el líquido de lavado, GBSS I (200ml). Está libre de calcio y lleva en disolución 75mg de EDTA. Seguidamente se perfunde con GBSS-II (250ml), con calcio (1,5mM) y las enzimas colagenasa H (0,04%), que digiere la matriz de colágeno, y pronasa E (0,04%), que destruye selectivamente las Pc. La perfusión se mantiene durante 25-30 minutos en circuito abierto, hasta la completa digestión de la matriz extracelular.

Una vez terminada la perfusión el hígado 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 con agitación para favorecer la destrucción de las células parenquimatosas. Posteriormente se añade una pequeña cantidad (0,0002%) de DNasa (Merck, Darmstadt, Alemania) a la suspensión celular y se incuba en el mismo baño durante 10min. De esta forma se evita la formación de

geles de DNA que atraparían a las células en su interior disminuyendo el rendimiento del método.

La suspensión se filtra a través de gasa de nailon (106µm) (Small Parts Inc, Florida, EE.UU.) para eliminar los fragmentos de tejido no disgregado y posibles agregados de Pc. El filtrado se reparte en 4 tubos (Falcon, Becton Dickinson, NJ, EE.UU.) completando hasta 50ml con GBSS II, se somete a una centrifugación a 165g durante 20s en una centrífuga SORVALL RT6000 para sedimentar las células parenquimatosas, con rotor angular, y se recoge el sobrenadante donde permanecen las células sinusoidales. Seguidamente el sobrenadante recogido se centrifuga a 208g durante 10min (centrífuga SORVALL RT6000, rotor flotante), resuspendiéndose el sedimento en GBSS II.

A continuación se lleva a cabo una centrifugación en gradiente de nycodenz (Nycomed AS, Oslo, N.) al 17,5%. Para ello el sedimento anterior se resuspende en un volumen de 15ml de GBSS II y se mezcla con 21 ml de nycodenz al 30% (6,3g) en GBSS II sin cloruro sódico. El volumen resultante se reparte en 4 tubos, cubriendo cada uno con 1ml de GBSS II, sin distorsionar la fase anterior, y se centrifugan a 1400g durante 15min. Los glóbulos rojos y restos celulares sedimentan, mientras que las NPc (Kupffer y endoteliales principalmente) quedan flotando en la parte superior del gradiente. La banda superior se recoge y se lava dos veces con GBSS II. El sedimento se resuspende en medio Ham's F-10 si se va a realizar el cultivo de las células sinusoidales, o en el tampón adecuado si se van a utilizar las células en suspensión. Es importante que el material usado durante todo el proceso sea estéril y preferentemente de plástico, dada la facilidad de los macrófagos o células de Kupffer para adherirse al vidrio.

La viabilidad celular se determina mediante la prueba de exclusión del azul Tripán tal como se ha recogido en el apartado III.3.2.1. La viabilidad en todos los ensayos está comprendida entre el 80 y 90%, siendo el rendimiento de $100 \times 10^6 \pm 20 \times 10^6$ células/hígado.

III.3.2.3. PURIFICACIÓN DE CÉLULAS DE KUPFFER Y ENDOTELIALES: ELUTRIACIÓN

Para la obtención de poblaciones puras de células de Kupffer y endoteliales, el último sedimento obtenido tras el aislamiento se resuspende en 2ml de GBSS II complementado con albúmina (3g/ml, GBSS-BSA) y se lleva a cabo la purificación mediante elutriación.

Durante el proceso de elutriación las células son sometidas a dos fuerzas opuestas en la cámara de separación: el campo centrífugo generado por el giro del rotor, y el arrastre del fluido

que circula en el sentido opuesto. Cada célula tiende a migrar a una zona donde su velocidad de sedimentación está compensada por la velocidad del fluido que atraviesa la cámara de separación. Dado que la geometría de la cámara produce un gradiente de flujo de un extremo al otro, células con una amplia gama de velocidades de sedimentación pueden ser mantenidas en suspensión. Incrementando la velocidad de flujo del fluido gradualmente, o disminuyendo la velocidad del rotor, puede conseguirse que poblaciones de tamaño bastante homogéneo eluyan a diferentes tiempos de la cámara y puedan ser recogidas separadamente. Cada población contendrá células más grandes y/o más densas que la fracción anterior³²⁸⁻³³⁰.

Las células sinusoidales suspendidas en GBSS-BSA se someten a elutriación en un rotor tipo JE-6B equipado con una cámara de separación estándar. La centrífuga utilizada es una Beckman J2-21 termostaticada a 4°C. Las células se depositan en el reservorio del circuito de perfusión. La velocidad del rotor se ajusta a 2500rpm (750g) y la cámara se perfunde con GBSS-BSA a un flujo de 10ml/min. Los primeros 100ml que atraviesan el rotor se desechan. Se ajusta después el flujo a 22,5ml/min, y en los siguientes 250ml se obtienen las células endoteliales. Seguidamente se cambia el flujo a 42,4ml/min y se recogen las células de Kupffer en 200ml³³¹.

Los volúmenes obtenidos se centrifugan a 200g, durante 10min a 4°C, para sedimentar ambos tipos celulares y los sedimentos se resuspenden en volúmenes conocidos para proceder a su recuento.

III.3.2.4. CARACTERIZACIÓN DE LAS CÉLULAS DE KUPFFER Y ENDOTELIALES MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO

Para la caracterización de las células de Kupffer se utilizan los anticuerpos monoclonales específicos para macrófagos de rata ED1 y ED2 marcados con ficoeritrina (Serotec).

Las células sinusoidales se sedimentan por centrifugación a 208g durante 10min, se resuspenden en GBSSII (10^7 células/ 200 μ l) con 1% de suero fetal bovino, y se incuban durante 30min en oscuridad con el anticuerpo monoclonal ED1 o ED2 (PE, 10 μ l anticuerpo/ 10^6 células). A continuación las células se diluyen 100 veces con tampón, se sedimentan por centrifugación y se resuspenden en Medio Mínimo Esencial de Dulbecco (DMEM) con 25mM de HEPES (10^6 células / ml). Tras marcar la población de células de Kupffer se determina el porcentaje de esta población celular en la suspensión por citometría de flujo, excitando la fluorescencia de la PE unida al anticuerpo a 488nm y midiendo la fluorescencia emitida a 575nm en un citómetro de flujo FACStar Plus Becton Dickinson (Centro de Citometría de Flujo de la Universidad

Complutense de Madrid). Como análisis complementario, antes y después del inmunomarcaje de las células de Kupffer, los parámetros FSC (forward angle light scatter) y SSC (side angle light scatter) de las células de Kupffer y endoteliales se examinan por citometría de flujo como medida del tamaño y de la complejidad celular respectivamente.

<i>SALES</i>	<i>CONCENTRACIÓN (mM)</i>
NaCl	137
KCl	3
Na ₂ HPO ₄	8
KH ₂ PO ₄	1

Tabla III-3: Composición del PBS

Para comprobar la eficacia del inmunomarcaje de las células de Kupffer con los anticuerpos, se obtienen fracciones puras de este tipo celular por elutriación a 4°C en una centrífuga Beckmann modelo J2-21 con un rotor JE-6B equipado con una cámara de separación estándar tal como se explica en el apartado III.3.2.3. Al evaluar separadamente por citometría de flujo la unión de los anticuerpos a cada tipo celular se observa que todas las células de Kupffer se marcan positivamente, mientras que las endoteliales no se marcan en ningún caso. Esto demuestra la alta especificidad de ambos anticuerpos (ED1 y ED2) por los macrófagos.

La viabilidad celular se evalúa añadiendo yoduro de propidio (0,005% en PBS) que tiñe el DNA de las células no viables. Las longitudes de onda de excitación y emisión son en este caso 488 y 600 nm respectivamente. Los porcentajes de las diferentes poblaciones se calculan en todos los casos mediante el programa LYSYS II de Becton Dickinson.

III.3.3. CULTIVOS PRIMARIOS

III.3.3.1. CULTIVO PRIMARIO DE CÉLULAS PARENQUIMATOSAS

El medio de cultivo completo consiste en:

- Medio William's E con 2,2g/l de NaHCO₃ y sin glutamina (Sigma Chemicals CO, St. Louis).
- Suero bovino fetal descomplementado (60min a 56°C) al 10% ó 20% (Biowhitaker, Francia).
- Antibióticos (penicilina 500UI/ml, estreptomycin 100µg/ml, Seromed, Biochrom).

Los cultivos se realizan sobre distintos soportes como se indica en la Tabla III-4, de acuerdo con la finalidad de los ensayos y se mantienen en una estufa Heraeus B5061 a 37°C en una atmósfera húmeda de CO₂(5%). A las 3 ó 4 horas de cultivo las células viables han formado ya una monocapa adherida al soporte por lo que se procede a lavarlas suavemente con tampón PBS (pH 7,4) para eliminar las no viables, sustituyendo el medio con 20% de suero por medio con 10%. A continuación se mantienen los cultivos en la estufa para ser utilizados a las 24h de la siembra.

<i>SOPORTE</i>	<i>Nº DE CÉLULAS</i>	<i>VOLUMEN DE MEDIO</i>
Botellín (25cm ²)	6×10 ⁶	4ml
Pocillo (9,5cm ²). Placa de 6 pocillos	2×10 ⁶	2ml
Pocillo (1,9cm ²). Placa de 4 ó 24 pocillos	3×10 ⁵	1ml

Tabla III-4: Soportes utilizados en el cultivo de células parenquimatosas

III.3.3.2. CULTIVOS MIXTOS DE CÉLULAS SINUSOIDALES

El cultivo se realiza en botellines de plástico estériles Corning (25cm², 50ml). El medio completo de cultivo consiste en:

- Medio Ham's F-10 (Seromed, Biochrom).
- Suero bovino fetal descomplementado (60min a 56°C) al 10%/20% (Biowhitaker, Francia).
- Glutamina 1 mM (Seromed, Biochrom).
- Antibióticos (penicilina 500UI/ml, estreptomycinina 100µg/ml, Seromed, Biochrom).

El volumen final en cada botellín es 4ml, con 12×10⁶ células en suspensión. Los botellines se mantienen en la estufa a 37°C en una atmósfera húmeda de CO₂(5%). A las 24 horas del cultivo la monocapa se lava con PBS (Tabla III-3) y se añade medio completo fresco. Las células se mantienen varios días en cultivo, por lo que el cambio de medio ha de repetirse al menos cada 48 horas. Los cultivos son utilizados cuando llegan a confluencia.

III.3.4. ESTUDIOS MORFOLÓGICOS

III.3.4.1. MICROSCOPIA ÓPTICA

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.

III.3.4.2. MICROSCOPIA CONFOCAL

Los ensayos se llevan a cabo en DMEM con 25mM HEPES (Seromed) y sin suero a 25°C tras lavar las células dos veces con PBS. Las distintas concentraciones de LPS (10µg/ml, 100µg/ml) se obtienen con diluciones seriadas de una solución de LPS 1mg/ml, la solución de LPS es previamente agitada, sonicada (5min, baño Ultrasons de Selecta) y esterilizada con microfiltros Millipore (Sterivex GV, 0.22µm). sonicada y filtrada.

Para los estudios de contenido en radicales libres se utiliza la sonda fluorescente diacetildiclorofluoresceína (DCFH-DA) (Sigma Chemicals CO, St. Louis), este compuesto es incorporado por las células cuyas esterasas lo convierten en 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (DCFH) que al ser oxidado rinde 2',7'-diclorofluoresceína, un producto fluorescente. Se prepara a una concentración de 5mg/ml disuelto en acetona y se añade al medio de cultivo en una dilución 1:100. Hasta el momento del análisis las células se mantienen en oscuridad a temperatura ambiente.

El colorante rojo Nilo (Sigma Chemicals CO, St. Louis) se utiliza para la tinción de fases lipídicas. Se disuelve en acetona 1mg/ml y posteriormente se diluye 1:1 en el tampón de incubación, en este caso PBS. Las células se incuban con el colorante de 15 a 30 minutos a temperatura ambiente, se lavan con PBS y se observan en el microscopio confocal.

En los experimentos de marcaje de células de Kupffer se utilizan placas de cultivo de 4 pocillos (volumen 1ml) sembradas con 5×10^5 células/pocillo, y se incuban durante 30min en oscuridad con el anticuerpo monoclonal ED1 o ED2 marcado con ficoeritrina (PE) (30µl anticuerpo/ 300µl PBS con 1% de suero fetal bovino). Posteriormente las células se lavan con PBS y se observan en el microscopio confocal.

III.3.5. TRATAMIENTO DE CULTIVOS CELULARES CON ENDOTOXINA Y CITOQUINAS

Las monocapas celulares se lavan dos veces con PBS. Seguidamente se añade medio fresco y se dejan en reposo en la estufa de cultivo durante al menos 3h. Tras ese tiempo se añade rápidamente un pequeño volumen (15/150µl) de una solución concentrada de cada agente, para alcanzar las diferentes concentraciones de LPS (10µg/ml, 100µg/ml), IL-1β (25,50 IU/ml) o TNF-α (5,10ng/ml). La solución concentrada de LPS es previamente agitada, sonicada (5min, baño Ultrasons de Selecta) y esterilizada con microfiltros Millipore (Sterivex GV, 0,22µm). El suero fetal, los antibióticos o cualquier otro aditivo, son eliminados durante el tratamiento con LPS para evitar interferencias. Las células así tratadas permanecen en estufa a 37°C un tiempo variable según el experimento.

Si las células van a ser utilizadas para valoraciones de los sistemas antioxidantes, después de la incubación se lavan con PBS, se gasean con N₂ y se congelan a -80°C rápidamente. La atmósfera reductora de N₂ evita posibles variaciones en el estado de oxidación de las células durante el periodo de congelación.

En cada experimento se utilizan botellines control en los que se realiza el mismo tratamiento añadiendo un volumen equivalente de medio carente de aditivo.

III.3.6. TRATAMIENTO DE CULTIVOS DE CÉLULAS PARENQUIMATOSAS CON SOBRENADANTES DE CÉLULAS SINUSOIDALES

Las células sinusoidales en cultivo (Sc) se lavan dos veces con PBS y seguidamente se añade medio fresco con diferentes concentraciones de LPS (10µg/ml, 100µg/ml). El medio con LPS es previamente agitado, sonicado (5min, baño Ultrasons de Selecta) y esterilizado con microfiltros Millipore (Sterivex GV, 0,22µm). El suero fetal, los antibióticos o cualquier otro aditivo, son eliminados durante el tratamiento con LPS para evitar interferencias. Las células así tratadas permanecen en estufa a 37°C, 15 ó 120min, según el experimento. Terminado este primer tiempo de incubación el sobrenadante de las Sc es trasvasado a cultivos de células parenquimatosas previamente lavadas dos veces con PBS. Las células parenquimatosas son mantenidas en la estufa a 37°C, 30, 60 ó 120min, según el experimento.

Si las células van a ser utilizadas para valoraciones de los sistemas antioxidantes, después de la incubación se lavan con PBS, se gasean con N₂ y se congelan a -80°C rápidamente.

III.3.7. CO-CULTIVOS DE CÉLULAS PARENQUIMATOSAS Y CÉLULAS SINUSOIDALES

Para los estudios de comunicación celular se utilizan soportes permeables de policarbonato *Costar Transwell* con un poro de membrana de diámetro de 0,4µm.

Las células sinusoidales para co-cultivo se aíslan y siembran en pocillos de 9,5cm² en las mismas condiciones detalladas en el apartado III.3.3.2. Cuando los cultivos llegan a confluencia se aíslan células parenquimatosas y se cultivan separadamente durante 24h sobre las membranas permeables de policarbonato insertadas en pocillos de 9,5cm² con 4 ml medio William's E con suero (20% las primeras horas, 10% el resto del cultivo). Posteriormente se realizan dos tipos de experimentos de comunicación celular:

III.3.7.1. COMUNICACIÓN CELULAR EN PRESENCIA DE LPS

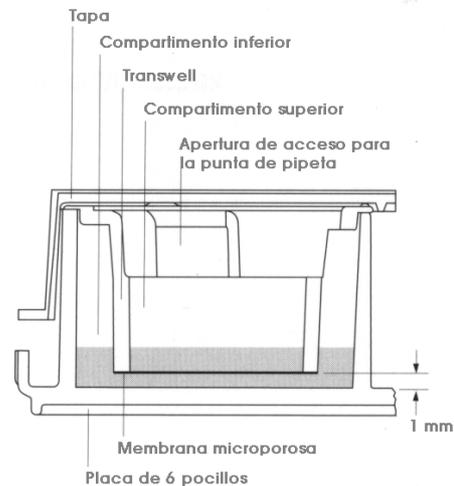
Las células sinusoidales se lavan con PBS dos veces y se añaden 2,5ml medio fresco Ham's F-10 con la dosis elegida de LPS (0, 10µg/ml, 100µg/ml). Seguidamente se lavan las membranas permeables con las células parenquimatosas con PBS y se insertan en los pocillos sobre las células sinusoidales previamente preparados. Para terminar se añaden sobre la membrana 1,5ml del medio Ham's F-10 con la dosis correspondiente de LPS y se incuban 30, 60 ó 120min en estufa a 37°C en atmósfera con 5%CO₂.

III.3.7.2. COMUNICACIÓN CELULAR TRAS LA EXPOSICIÓN DE LAS CÉLULAS SINUSOIDALES A LPS

Las células sinusoidales se lavan dos veces con PBS y se añaden 2,5ml de medio fresco Ham's F-10 con la dosis elegida de LPS (0, 10µg/ml, 100µg/ml). Las células con este tratamiento se incuban a 37°C en atmósfera con 5%CO₂ y humedad controlada (estufa Heraeus B5061). Tras el tiempo elegido (15min o 120min) se retira el medio, se lava la monocapa con PBS, y se reponen 2,5ml de medio Ham's F-10 esta vez libre de cualquier agente. Paralelamente se lavan con PBS las membranas con células parenquimatosas, se sitúan sobre las monocapas de Sc pretratadas y se añaden 1,5ml de medio Ham's F-10 fresco. Estos co-cultivos se incuban en las condiciones antes mencionadas durante 30, 60 ó 120min.

SOPORTE	Nº DE CÉLULAS	VOLUMEN DE MEDIO
Placa de 6 pocillos (9,5cm ²)	A confluencia (Sembradas 6×10 ⁵)	2,5ml
Membranas de co-cultivo (4,5cm ²)	1,5×10 ⁶	1,5ml sobre la membrana

Tabla III-5: Soportes utilizados en el co-cultivo de Pc y Sc

Ilustración III-1: Esquema de un pocillo *transwell* con membrana microporosa para co-cultivo

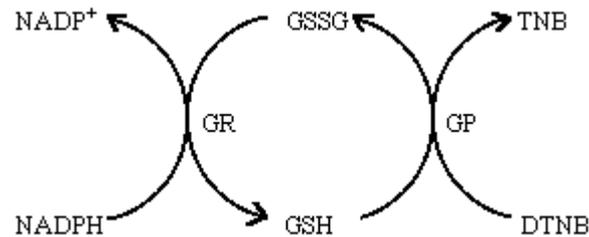
III.4. VALORACIÓN DE SISTEMAS ANTIOXIDANTES

III.4.1. GLUTATIÓN

Las muestras de hígado procedentes de los estudios realizados *in vivo* se homogeneizan con tampón fosfato 50mM (KH₂PO₄ 12mM + K₂HPO₄ 38mM), pH 7,4, frío (50mg tejido/ml) en un Brinkman Polytron. Para la valoración de glutatión procedente de células parenquimatosas cultivadas, las monocapas se despegan del soporte y se homogeneizan con 600µl de tampón en homogeneizadores cónicos de vidrio Pobel. En ambos casos se retiran 100µl del homogeneizado para valorar proteínas y se añade 1µl de ácido tricloroacético (TCA) 0,55N HCl 0,4N por cada 10µl de muestra. Después de centrifugar durante 5min (Microfuga B Beckmann) a 4°C, se separan dos alícuotas del sobrenadante. La primera de ellas se trata con 2-vinilpiridina (4µl:100µl de sobrenadante) durante una hora, para medir el glutatión oxidado (GSSG). La 2-vinilpiridina reacciona con el grupo tiol del glutatión reducido modificándolo, y además inhibe la glutatión reductasa presente (GR)³³². En la otra alícuota se mide inmediatamente el contenido de glutatión total.

Tanto el glutatión total como el oxidado se valoran en equivalentes de glutatión reducido por el método de *Tietze*³³³. Este es un método basado en el reciclado enzimático del glutatión que

es secuencialmente oxidado por el reactivo de Ellman (ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico, DTNB) y reducido por NADPH en presencia de glutatión reductasa, altamente específica para el glutatión. En la reacción interviene también la glutatión peroxidasa (GPx) presente en la muestra.



Ecuación III-1: Ciclo Redox del glutatión

En la cubeta se añaden los siguientes reactivos:

- 70µl de muestra,
- 70µl de DTNB 6mM en tampón fosfato 50mM, pH7,4, EDTA 6,3mM,
- 500µl de NADPH 0,3mM en tampón fosfato 50mM, pH7,4, EDTA 6,3mM,
- 70µl de GR 12U/ml en tampón fosfato 50mM, pH7,4, EDTA 6,3mM.

La reacción se puede seguir a 412nm, longitud de onda a la que absorbe el TNB reducido. Las concentraciones de GSH se calculan tras interpolar los valores de Abs/min en una curva patrón, obtenida por el mismo método utilizando concentraciones conocidas de GSH comercial (Sigma Chemical CO, St. Louis) comprendidas en un intervalo de 1,25-100mM. Finalmente, el glutatión reducido se determina mediante la diferencia entre el glutatión total y el oxidado. La concentración de proteínas se determina por el método de Lowry³³⁴.

III.4.2. GLUTATIÓN REDUCTASA

Para la valoración de la glutatión reductasa procedente de células parenquimatosas cultivadas, las monocapas se despegan del soporte y se homogeneizan con 600µl de tampón fosfato 50mM, 6,3mM EDTA, pH 7,4 frío en homogeneizadores cónicos de vidrio Pobel. Después de retirar 100µl del homogeneizado para valorar proteínas, esta enzima se valora por el método de Massey y Williams³³⁵. La actividad de la enzima se puede medir siguiendo a 340nm la disminución de NADPH en la reacción de reducción del disulfuro de glutatión (GSSG) (ver Ecuación III-1).

En la cubeta se añaden los siguientes reactivos:

- 35µl de NADPH 6mM en tampón fosfato 50mM, pH7,4, EDTA 6,3mM,
- 35µl de GSSG 80mM en tampón fosfato 50mM, pH7,4, EDTA 6,3mM,
- 50µl de muestra,
- 580µl Tampón fosfato 50mM, pH 7,4, EDTA 6,3mM.

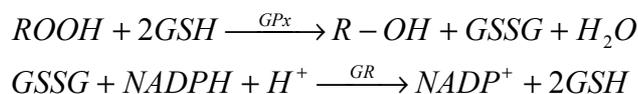
Se utiliza la siguiente fórmula para calcular la actividad, basada en la ley de Lambert Beer:

$$\text{ACTIVIDAD} = \frac{\text{nmoles NADPH/min}}{\text{mg PROTEINA}} \times F = \frac{\text{Absorbancia} \times \text{ml} / \epsilon_{\text{NADPH}}^{340\text{nm}} \times 1\text{cm}}{\text{mg PROTEINA}} \times F = \frac{\text{Absorbancia} / \text{min}}{\epsilon_{\text{NADPH}}^{340\text{nm}} \times 1\text{cm} \times \text{mg PROTEINA/ml}} \times F$$

Ecuación III-2: Cálculo de la actividad de la Glutatión Reductasa. Siendo F el factor de dilución de la muestra y $\epsilon_{\text{NADPH}}^{340\text{nm}} = 6,22 \times 10^3 \text{ nM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ la constante de extinción molar del NADPH a 340nm

III.4.3. GLUTATIÓN PEROXIDASA

Para la valoración de la glutatión peroxidasa procedente de células parenquimatosas cultivadas, las monocapas se despegan del soporte y se homogeneizan con 600µl de KH_2PO_4 0,1M, EDTA 1mM (pH 7,0) frío en homogeneizadores cónicos de vidrio Pobel. Después de retirar 100µl del homogeneizado para valorar proteínas, la enzima se valora por el método de Flohe y Gunzler³³⁶. Esta enzima tiene una cinética complicada, por lo que no se pueden definir unas condiciones de saturación para todos los sustratos ni unas unidades absolutas.



Ecuación III-3: Reacciones implicadas en la valoración de la Glutatión Peroxidasa

En el hígado hay una actividad S-transferasa que solaparía. Por ello el ensayo se modifica utilizando H_2O_2 en vez del t-butil hidroperóxido y añadiendo 1 ml de azida para inhibir la actividad catalasa.

El procedimiento se indica a continuación:

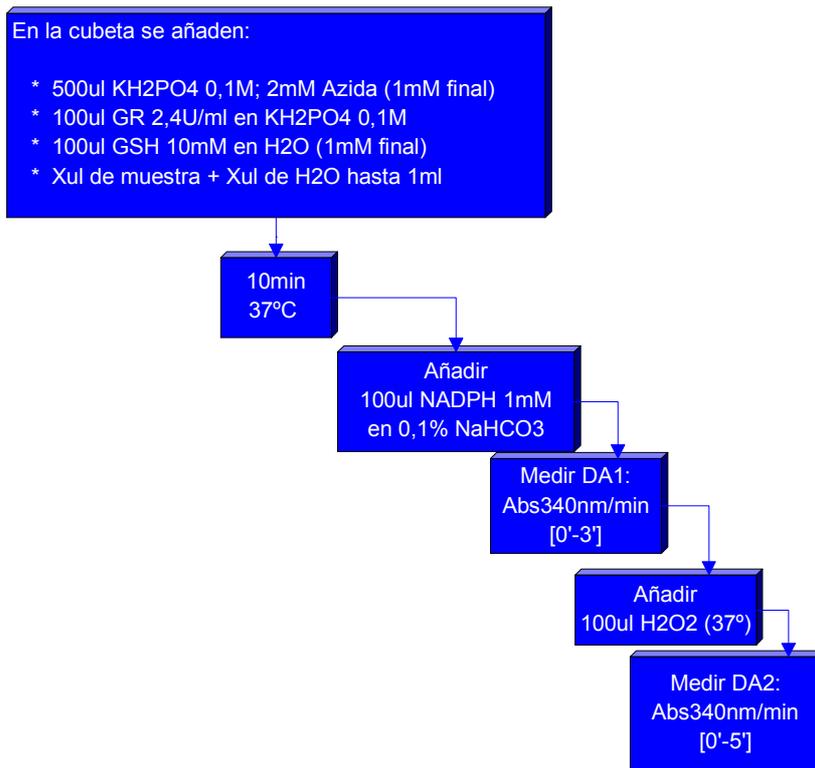


Figura III-2: Protocolo de valoración de la Glutación Peroxidasa

Como se observa en el esquema indicado el tampón fosfato es suplementado con 2mM de azida (quedará 1mM final en la cubeta), a 500µl de este tampón se le añaden 100µl de glutación reductasa 2,4 UI/ml, 100µl de glutación reducido 10mM en agua y la cantidad de muestra apropiada. Se completa hasta 1ml con agua destilada.

La descomposición de NADPH catalizada por la glutación reductasa se sigue a 340nm. Tras la adición de NADPH se mide la ΔAbs_1 durante 3min, en este punto se añade H_2O_2 y se mide la ΔAbs_2 . La actividad de la GPx se obtiene de $\Delta Abs = \Delta Abs_2 - \Delta Abs_1$. En cada ensayo se realiza un blanco con tampón en lugar de muestra cuya ΔAbs_c se sustrae de la ΔAbs .

$$GPx \left(\frac{\text{nmol NADPH oxidado}}{\text{min} \times \text{mg Proteína}} \right) = \frac{\Delta Abs / \text{min}}{6,2 \times 10^{-3} \times \text{mg Proteína} / \text{ml}}$$

Ecuación III-4: Cálculo de la actividad Glutación Peroxidasa

III.4.4. SUPERÓXIDO DISMUTASA

III.4.4.1. AISLAMIENTO DE LA FRACCIÓN MITOCONDRIAL

La homogeneización de las muestras se realiza con un Brinckman Polytron a razón de 1g de tejido en 10ml de tampón fosfato 10mM sacarosa 0,25M (pH 7,4), retirándose una alícuota para valorar proteínas. Se centrifuga a 2000g durante 10min en una ultracentrífuga Sorvall Superspeed RC2-B (rotor R-40) a una temperatura de 4°C. El sobrenadante obtenido se vuelve a centrifugar en las mismas condiciones a 3000g durante 20min. A continuación los sedimentos se dializan durante 12h frente a tampón fosfato para eliminar moléculas tales como GSH, NADPH, NADH y ácido ascórbico que pueden interferir en la medida.

La actividad de la superóxido dismutasa se valora según el método de la inhibición de la autooxidación del pirogalol (ácido gálico) modificado³³⁷. El pirogalol en medio alcalino se autooxida produciendo radical superóxido, el cual a su vez participa también en su oxidación. Por lo tanto la eliminación por la SOD de estos radicales libres inhibe la autooxidación del pirogalol. La magnitud de la inhibición determina la actividad de la enzima en la muestra.

Al término de la diálisis de cada muestra se mide el efecto sobre la autooxidación del pirogalol a 420nm en cubetas de cuarzo en las que se añade:

- 40µl de muestra.
- 0,75ml de tampón TRIS 50mM, pH 8,2 y ácido dietileno-triamino-pentaacético (DTPA) 1mM.
- 10µl pirogalol (24mM en HCl 10mM).

Para cada muestra se mide la autooxidación control del pirogalol, sustituyendo la muestra por el mismo volumen de tampón TRIS-DTPA. A partir de las variaciones de absorbancia por minuto obtenemos el tanto por ciento de inhibición de autooxidación:

$$\%INHIBICION = \frac{(abs/minCONTROL - abs/minMUESTRA)}{abs/minCONTROL} \times 100$$

Figura III-3: Cálculo del porcentaje de inhibición de autooxidación del pirogalol por la presencia de SOD

Una unidad de actividad de la SOD se define como aquella cantidad de enzima capaz de inhibir un 50% la tasa de autooxidación del pirogalol.

$$\text{Actividad/mg Proteína} = \frac{\% \text{Inhibición}}{50\%} \times \frac{1000}{V_m} \times \frac{1}{\text{mg Proteína/ml}}$$

Figura III-4: Cálculo de la actividad de la SOD referida al contenido de proteínas de la muestra. Siendo V_m el volumen de la muestra

III.4.5. CATALASA

Las muestras de hígados de ratas control o tratadas con LPS se homogeneizan en 1ml de tampón fosfato con Brinckman Polytron. Seguidamente este homogeneizado se centrifuga (Microfuga B, Beckmann, 4°C), para eliminar restos celulares que pudieran interferir con la medida espectrofotométrica. Por cada mililitro de tampón se añade 0,1ml de Triton X-100 (Sigma Chemicals CO, St. Louis) al 10%. La catalasa se inactiva rápidamente por lo que su actividad ha de ser valorada de inmediato tras la descongelación.

La medida de su actividad se realiza según el método de *Beers y Sizer*³³⁸ descrito por *Lück*³³⁹. En este método la actividad se calcula a partir de la disminución de la absorbancia por minuto, a 240nm, que se produce durante la descomposición de peróxido de oxígeno catalizada por esta enzima.



Ecuación III-5: Reacción de descomposición del peróxido de hidrógeno catalizada por la catalasa

Los ensayos se realizan en un espectrofotómetro Beckmann, modelo DU 70, con cubetas de cuarzo con 1cm de paso óptico, que contienen 670µl de una solución 14mM de peróxido de hidrógeno en tampón fosfato 50mM (pH 7,4) y 30µl de muestra.

La expresión utilizada para el cálculo de la actividad es:

$$\text{Actividad}(\mu\text{moles } H_2O_2/\text{min}) = \frac{\text{Abs/min} \times V_t(\text{ml}) \times F \times 1,1}{V_m(\mu\text{l}) 46,3 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}}$$

Ecuación III-6: Cálculo de la actividad de la catalasa. Siendo $V_t(\text{ml})$ el volumen total de la cubeta expresado en mililitros, F el factor de dilución de la muestra, 1,1 factor de dilución introducido por la adición de Triton X-100 10% a la muestra, $V_m(\mu\text{l})$: volumen de la muestra expresado en microlitros, $\epsilon_{H_2O_2}^{240nm} = 46,3 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

III.5. ESTUDIO DE LA UNIÓN DE LA ENDOTOXINA A CÉLULAS DE KUPFFER Y ENDOTELIALES HEPÁTICAS MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO

Para estos estudios se realizan ensayos de doble marcaje con suspensiones de células sinusoidales que contienen células de Kupffer y endoteliales. El doble marcaje consiste en utilizar un anticuerpo monoclonal unido a ficoeritrina (ED1-PE) para identificar las células de Kupffer y el lipopolisacárido de *E.coli* 0111:B4 marcado con isotiocianato de fluoresceína (FITC).

Tras marcar las células de Kupffer como se describe en el apartado III.3.2.4, la curva temporal de unión del LPS a las células sinusoidales se obtiene incubándolas diferentes tiempos con 100µg/ml de LPS de *E. coli* 0111:B4 marcado con fluoresceína (FITC-LPS). El estudio se realiza en ausencia o presencia de LPS sin marcar (1mg/ml) para evaluar la unión total y la no específica respectivamente. La unión específica se calcula por diferencia entre la unión total y la no-específica. Los ensayos se realizan en DMEM con 25mM HEPES y sin suero. Dado que la interacción del LPS con las células sinusoidales hepáticas es muy rápida y para evitar el riesgo de internación del anticuerpo, los estudios de unión se llevaron a cabo a 25°C con el fin de obtener las condiciones óptimas para la evaluación de las propiedades cinéticas de cada tipo celular.

Los ensayos de saturación se llevan a cabo incubando células sinusoidales 30min con dosis crecientes de LPS-FITC en ausencia o presencia de LPS no marcado para estudiar la unión total y la no-específica respectivamente. La unión específica se calculó por diferencia entre ambas.

Para evaluar la incorporación del LPS-FITC a las células de Kupffer marcadas con ED1-PE y a las células endoteliales, la fluorescencia del FITC-LPS es excitada con un láser de 2W a 488nm, midiendo la emisión a 530nm en un citómetro FACStar Plus Becton Dickinson (Centro de Citometría de Flujo de la Universidad Complutense de Madrid). Simultáneamente la fluorescencia de PE unida a las ED1-Kc se excita con un láser de 2W a 488nm, midiendo la emisión a 575nm para identificar la población de células de Kupffer durante los ensayos de unión. El análisis de los datos se lleva a cabo con el programa LYSYS II de Becton Dickinson. Este doble marcaje permite diferenciar entre la unión del LPS a las células endoteliales y a las de Kupffer cuando ambas poblaciones coexisten en la misma suspensión, compitiendo ambos tipos celulares por la endotoxina.

Las células no viables se marcan con yoduro de propidio (IP, 0,005% en PBS) y se eliminan siempre de los estudios de citometría de flujo. La fluorescencia del IP se excita a 488nm y se detecta a 600nm. Antes de los estudios de unión, células con IP (sin ED1-PE) y células con ED1-PE (sin IP) se analizan separadamente y se usan como controles. Las emisiones fluorescentes del IP (600nm) y PE (575nm) son compensadas por el citómetro de flujo. No se detectan cambios en la viabilidad celular durante los ensayos de unión. Se analizan al menos 10^4 células por cada muestra.

Para los estudios del efecto de la formación de complejos LPS-HDL en la unión del LPS a los diferentes tipos celulares, se realizaron incubaciones previas de las distintas preparaciones a 37° durante 2h. Las concentraciones óptimas de los componentes para la incubación se establecen en HDL(800µg/ml):LPS(400µg/ml):LPDS(1%). Tras la incubación las preparaciones se mantienen en hielo hasta su utilización. La concentración final de LPS en las suspensiones celulares es 100µg/ml para hacer comparables los estudios. Con el objeto de contar con controles se realizan incubaciones de preparaciones en las que se sustituye cada uno de los componentes por un volumen equivalente de PBS. Las concentraciones finales en las suspensiones celulares analizadas por citometría de flujo son las detalladas en la Tabla III-6.

<i>Preparaciones</i>	<i>HDL</i>	<i>LPDS</i>	<i>LPS-FITC</i>
LPS-FITC/PBS	-	-	100µg/ml
LPS-FITC/HDL	200µg/ml	-	100µg/ml
LPS-FITC/LPDS	-	0,25%	100µg/ml
LPS-FITC/HDL+LPDS	200µg/ml	0,25%	100µg/ml

Tabla III-6: Concentraciones finales en las suspensiones celulares analizadas por citometría de flujo para analizar el efecto de los complejos LPS-HDL en la unión del LPS a diferentes tipos celulares

III.6. INTERACCIÓN LPS-LIPOPROTEÍNAS

III.6.1. AISLAMIENTO DE LIPOPROTEÍNAS POR ULTRACENTRIFUGACIÓN EN GRADIENTE DE DENSIDAD

Para la obtención de lipoproteínas de suero se utiliza el método de *Redgrave*³⁴⁰. La sangre humana (50ml) se deja coagular durante al menos 1h a temperatura ambiente. Posteriormente se sedimentan las fibras y coágulos en una centrífuga de mesa, suavemente para no provocar hemólisis. El suero se recoge en una probeta de 25ml y los sedimentos se reúnen en 2 tubos para una segunda centrifugación suave. Se vuelve a recoger el suero sobrenadante y se completa, si es

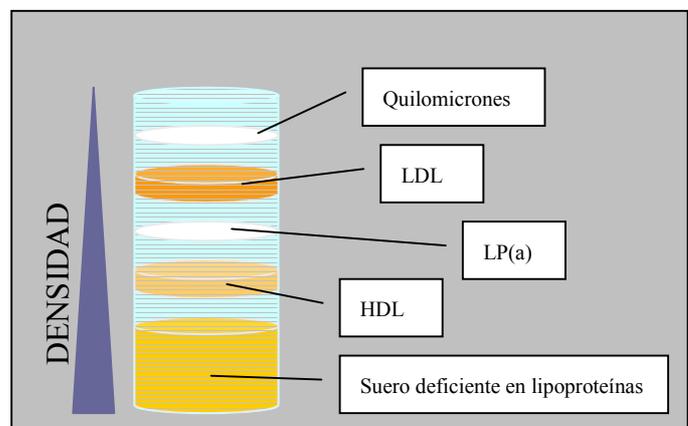
necesario, hasta 25ml con una solución de KBr de densidad 1,063g/ml. El quelante de calcio EDTA previene la oxidación de las lipoproteínas así como la contaminación por microorganismos. A estos 25ml de suero se le añaden 8,13g KBr y 250 μ l de una solución 0,01M de EDTA para alcanzar una concentración final 1mM. El volumen obtenido se reparte en el fondo de 6 tubos de ultracentrífuga, de un volumen aproximado de 12ml. A continuación se procede cuidadosamente a depositar las fracciones de diferente densidad según el siguiente patrón:

- 2,8ml de una solución de KBr $d=1,063\text{g/ml}$,
- 2,8ml de una solución de KBr $d=1,019\text{g/ml}$,
- 2,6ml de una solución de KBr $d=1,006\text{g/ml}$ hasta completar el tubo.

Las diferentes soluciones se preparan a partir de una disolución madre de densidad conocida. Todas las soluciones contienen 0,2M NaCl, 0,3mM EDTA, con pH 7,4.

Las muestras se someten a 40.000rpm (rotor SW40 Ti) en una ultracentrífuga Beckmann de 18h a 24h. Tiempos más cortos repercutirían en una peor separación de las lipoproteínas. Al término de la centrifugación la deceleración ha de ser suave para evitar distorsionar el gradiente.

La banda de menor densidad, en la superficie del gradiente, es de color blanquecino y corresponde a los quilomicrones. Muy próxima se obtiene la banda de las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL). Las lipoproteínas de baja densidad (LDL) presentan un color anaranjado. Un poco más abajo se encuentran las lipoproteínas de alta densidad (HDL), con un color amarillento suave, muy cerca de la banda del fondo del tubo, de mayor densidad, que contiene el suero pobre en lipoproteínas. Cada fracción se retira cuidadosamente, desde la superficie, evitando distorsionar el gradiente en todo momento. Se comprueba la densidad de todas las fracciones utilizando un densitómetro digital DMA 40 de Mettler (Graz, Austria).



Durante las 16 horas siguientes

cada fracción se dializa frente a 2l de PBS (ver Tabla III-3) 1mM EDTA pH 7,4, a 4°C y con agitación para eliminar el KBr. El suero pobre en lipoproteínas (LPDS) se dializa a parte, ya que es la fracción más concentrada. Tras 4h se cambia el tampón y se deja la diálisis al menos 12h

más. Las lipoproteínas se pueden mantener en este tampón PBS 1mM EDTA pH 7,4, 4°C, durante aproximadamente 4 semanas.

III.6.1.1. ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN DEL LPS CON LAS LIPOPROTEÍNAS PRESENTES EN EL SUERO DEFICIENTE EN LIPOPROTEÍNAS

Para aislar este tipo de lipoproteínas se prepara un gradiente con tan sólo dos fracciones de densidad de KBr (densidades 1,063 y 1,21g/ml), lo que permite obtener una mejor separación de la fracción de LPDS. Los gradientes resultantes tras la ultracentrifugación son fraccionados en 24 alícuotas. En dichas fracciones se valora tanto el contenido en colesterol como en proteínas.

Ateniéndose a las cantidades relativas de colesterol y proteínas se separan tres grandes fracciones de suero deficiente en lipoproteínas numeradas como F1, F2 y F3 para el estudio de su interacción con el LPS. Estas fracciones son incubadas durante 120min con LPS en las proporciones descritas en la Tabla III-7.

<i>CALLE</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>	<i>7</i>	<i>8</i>
I¹²⁵-LPS sonicado	1µl	-	1µl	-	1µl	-	1µl	-
LPDS-F1	-	10µl	10µl	-	-	-	-	-
LPDS-F2	-	-	-	10µl	10µl	-	-	-
LPDS-F3	-	-	-	-	-	10µl	10µl	-
PBS (Ca²⁺/Mg²⁺)	15µl	5µl	4µl	5µl	4µl	5µl	4µl	-
HDL	-	-	-	-	-	-	-	4µl
PBS	-	-	-	-	-	-	-	12µl

Tabla III-7: Proporciones utilizadas para estudiar el efecto de lipoproteínas presentes en el suero deficiente en lipoproteínas en los agregados de LPS y en su interacción con HDL

III.6.1.2. VALORACIÓN DE COLESTEROL

Los gradientes de KBr con las muestras elegidas se fraccionan en 24 tubos en cada uno de los cuales se valora el contenido en colesterol con un kit comercial (Boehringer Mannheim, Alemania). Como estándar se utiliza Precipath[®] con 3,78mg/ml, diluido 1/10.

III.6.2. ELECTROFORESIS EN GELES DE AGAROSA

Para comprobar que las lipoproteínas conservan su estructura nativa se determina la movilidad electroforética en un gel de agarosa al 0,75% (peso/vol) a pH 8,8, utilizando un tampón Tris-Hipúrico (Tabla III-8).

<i>SUSTANCIA</i>	<i>CANTIDAD (g/l)</i>	<i>mM</i>
Tris-HCl	9,0	75
Ácido Hipúrico	14,3	80
EDTA (ácido)	0,24	0,65
NaOH	2,55	16x10 ³

Tabla III-8: Tampón Tris-Hipúrico pH 8,8, composición.

La agarosa al 0,75% se prepara en Tris-Hipúrico, se calienta la mezcla hasta ebullición tres veces y se deja enfriar hasta aproximadamente 50°C, entonces se vierte en el sistema de electroforesis, donde se deja polimerizar durante 1h. Antes de aplicar la muestra se mezcla con 10µl de agarosa fundida (azul de bromofenol 1%); la capacidad del pocillo de cada carril es de 25µl. Tras hacer correr el gel se marca la posición del frente. Para teñir las lipoproteínas se utiliza azul brillante de Coomassie 0,2% en metanol 50%, y ácido acético 3%. Se sumerge el gel durante 30min en esta solución y posteriormente se elimina el exceso de coloración lavando en metanol 50%, ácido acético 3%, durante 12h con un par de cambios de solución. Los geles resultantes se secan al aire. La movilidad electroforética se calcula dividiendo la distancia recorrida por las lipoproteínas (teñidas con azul de Coomassie) entre la distancia recorrida por el frente. Las autorradiografías de los geles marcados radiactivamente son obtenidas tras la exposición de películas adecuadas a -70°C durante varias horas.

III.6.2.1. EFECTO DE LA DOSIS DE HDL EN LA INTERACCIÓN HDL/LPS

Para hallar la relación HDL/LPS de interacción máxima se preparan muestras con las concentraciones que se describen en la Tabla III-9, y se incuban durante 30min a 37°C. Tras la incubación se someten a una electroforesis en gel de agarosa para determinar la movilidad electroforética de cada muestra.

<i>CALLE</i>	1	2	3	4	5	6	7	8
LPS (mg/ml)	-	12,24	12,24	12,24	12,24	12,24	12,24	12,24
HDL (µg/ml)	3.400	1.700	425	106	26,6	6,6	1,7	-

Tabla III-9: Dosis de LPS y HDL utilizadas para los estudios de dosis en geles de agarosa

III.6.2.2. EFECTO DEL SUERO EN LA MOVILIDAD DEL I^{125} -LPS Y DE LOS COMPLEJOS I^{125} -LPS-HDL

La movilidad en geles de agarosa de complejos de I^{125} -LPS-HDL se examina tras realizar una incubación durante 30min a 37°C en presencia de suero. En la Tabla III-10 se describen las proporciones utilizadas.

<i>CALLE</i>	1	2	3	4	5
HDL (3,4mg/ml)	15µl	15µl	15µl	15µl	-
I^{125} -LPS (0,7mg/ml)	-	1µl	1µl	1µl	1µl
Suero	-	-	0,8µl	0,8µl	-
PBS	-	-	-	15µl	15µl

Tabla III-10: Proporciones utilizadas en el gel de agarosa para determinar el efecto del suero en la interacción I^{125} -LPS-HDL

III.6.2.3. EFECTO DEL LPS EN LA MOVILIDAD ELECTROFORÉTICA DE LAS HDL. USO DE I^{125} -HDL

Con el fin de profundizar en el estudio del efecto del LPS en la movilidad electroforética de las HDL se realizan ensayos con I^{125} -HDL. Las proporciones utilizadas en los geles de agarosa se describen en la Tabla III-11. Para sustituir el I^{125} -LPS en los siguientes ensayos se ha escogido la utilización de BIM-LPS ya que contiene todas las modificaciones químicas presentes en el primero salvo el isótopo de yodo. La incubación se realiza a 37°C durante 30min.

<i>CALLE</i>	1	2	3	4	5	6	7	8
I^{125} -HDL (1mg/ml)	-	1µl	1µl	1µl	1µl	1µl	1µl	1µl
BIM-LPS (1mg/ml)	-	-	0,5µl	1µl	8µl	0,5µl	1µl	8µl
HDL (3,4mg/ml)	13,4µl	-	-	-	-	-	-	-
Suero (1/10)	-	-	-	-	-	1,6µl	1,6µl	1,6µl
PBS	2,6µl	15µl	14,5µl	14,0µl	7,0µl	12,9µl	12,4µl	5,4µl

Tabla III-11: Proporciones utilizadas para determinar el efecto del LPS en la movilidad de las I^{125} -HDL.

Para complementar los estudios realizados con I^{125} -HDL se estudia el efecto sobre la movilidad de las HDL con diferentes concentraciones de LPS a las que se añade una pequeña

cantidad de I^{125} -LPS. Las proporciones utilizadas se dan en la Tabla III-12. La incubación se realiza a 37°C durante 30min.

<i>CALLE</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>	<i>7</i>	<i>8</i>
I^{125} -LPS (0,7mg/ml)	-	0,65µl						
HDL (0,34mg/ml)	-	-	2µl	2µl	2µl	2µl	2µl	2µl
Suero (1/10)	-	-	-	-	-	1,6µl	1,6µl	1,6µl
LPS-BIM (1mg/ml)	-	-	-	0,5µl	7,5µl	-	0,5µl	7,5µl
I^{125} -HDL (1mg/ml)	1µl	-	-	-	-	-	-	-
PBS	15µl	15µl	13,35µl	12,85µl	5,85µl	11,75µl	11,25µl	4,25µl

Tabla III-12: Proporciones utilizadas para determinar el efecto del LPS en la movilidad de las HDL

III.6.2.4. EFECTO DE LA SONICACIÓN EN LA MOVILIDAD ELECTROFORÉTICA DEL LPS Y EN SU INTERACCIÓN CON SUERO HUMANO Y ALBÚMINA BOVINA

El I^{125} -LPS se sonica durante 40s en un baño al que se aplica una onda de 14 micrones de amplitud con un sonicador SONIPREP (MSE). Posteriormente se incuban las muestras 30min a 37°C.

<i>CALLE</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>	<i>7</i>	<i>8</i>
I^{125} -LPS (0,7mg/ml)	1µl	-	-	1µl	-	-	1µl	-
I^{125} -LPS (0,7mg/ml) sonificado	-	1µl	-	-	1µl	-	-	1µl
Suero (1/10)	-	-	1,6µl	1,6µl	1,6µl	-	-	-
BSA (0,5%)	-	-	-	-	-	1,6µl	1,6µl	1,6µl
PBS	15µl	15µl	14,4µl	13,4µl	13,4µl	14,4µl	13,4µl	13,4µl

Tabla III-13: Proporciones utilizadas para estudiar el efecto de la sonicación, el suero humano y la albúmina bovina en el patrón de movilidad electroforética del LPS

III.6.2.5. CINÉTICA DE LA INTERACCIÓN I^{125} -LPS-HDL EN PRESENCIA DE SUERO HUMANO

Para conocer la influencia del tiempo sobre la interacción LPS-HDL se realiza un estudio cinético que permita definir el tiempo óptimo de incubación.

CALLE	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Tiempo 37° C (min)	-	-	-	1	5	10	15	30	60	90	120	120
HDL (3,4mg/ml)	-	4µl	-	5µl	-	5µl						
Suero (1/10)	0,6µl	-	0,6µl	-	0,6µl							
I ¹²⁵ -LPS (0,7mg/ml)	0,5µl	-	-	2µl	2µl	0,6µl						
PBS	9,9µl	12µl	14,4µl	12,4µl	9,9µl	12,4µl						

Tabla III-14: Proporciones utilizadas para estudiar el efecto del tiempo en la interacción LPS-HDL

III.6.2.6. EFECTO DE CATIONES DIVALENTES EN LA INTERACCIÓN HDL-LPS

Se utilizan concentraciones de cationes divalentes cercanas a las del plasma normal similar a la situación *in vivo* (2,5mM Ca²⁺, 1,1mM Mg²⁺). También se ensaya la eliminación de toda traza de catión divalente con la adición del quelante EDTA.

CALLE	1	2	3	4	5	6	7	8
I ¹²⁵ -LPS (0,7mg/ml)	1µl	1µl	1µl	1µl	1µl	1µl	1µl	-
HDL (3,4mg/ml)	-	-	-	4µl	4µl	4µl	-	-
Ca ²⁺ 25mM	-	-	1,6µl	1,6µl	1,6µl	-	6,4µl	-
Mg ²⁺ 11mM	-	-	1,6µl	1,6µl	1,6µl	-	-	-
EDTA 10mM	-	1,6µl	-	-	-	-	-	-
I ¹²⁵ -HDL	-	-	-	-	-	-	-	1µl
PBS	15µl	13,4µl	11,8µl	7,8µl	8,8µl	11µl	8,6µl	15µl

Tabla III-15: Proporciones utilizadas para el estudio de la influencia de cationes divalentes en la movilidad electroforética en gel de agarosa de los agregados LPS-HDL.

Para evaluar el efecto de los cationes divalentes sobre la densidad se realiza un gradiente de densidad tipo Redgrave (en KBr) modificado, en el que el rango de densidades se reduce al intervalo 1,036-1,210g/ml. Para ello se utilizan las proporciones que se detallan a continuación. El I¹²⁵-LPS se sonica en las condiciones que se describen en el apartado III.6.2.4, para obtener una población lo más homogénea posible.

CALLE	1	2	3	4
I^{125} -LPS (0,7mg/ml, sonicado)	1,4 μ l	1,4 μ l	1,4 μ l	1,4 μ l
HDL(3,4mg/ml)	-	-	-	20 μ l
CaCl ₂ /MgCl ₂ (1,8mM/10mM)	-	-	24,4 μ l	-
EDTA (3,7mg/ml)	-	24,4 μ l	-	-
CaCl ₂ (18mM)	-	-	-	2,1 μ l
MgCl ₂ (100mM)	-	-	-	2,1 μ l
PBS	24,4 μ l	-	-	5 μ l

Tabla III-16: Proporciones utilizadas para estudiar el efecto de cationes divalentes en la densidad de los agregados de LPS y en su interacción con HDL

III.7. OBTENCIÓN DEL LIPOPOLISACÁRIDO MARCADO CON I^{125}

El método utilizado para la obtención de LPS marcado radioactivamente con I^{125} fue descrito por Ulevitch³⁴¹. Los pasos seguidos se indican a continuación:

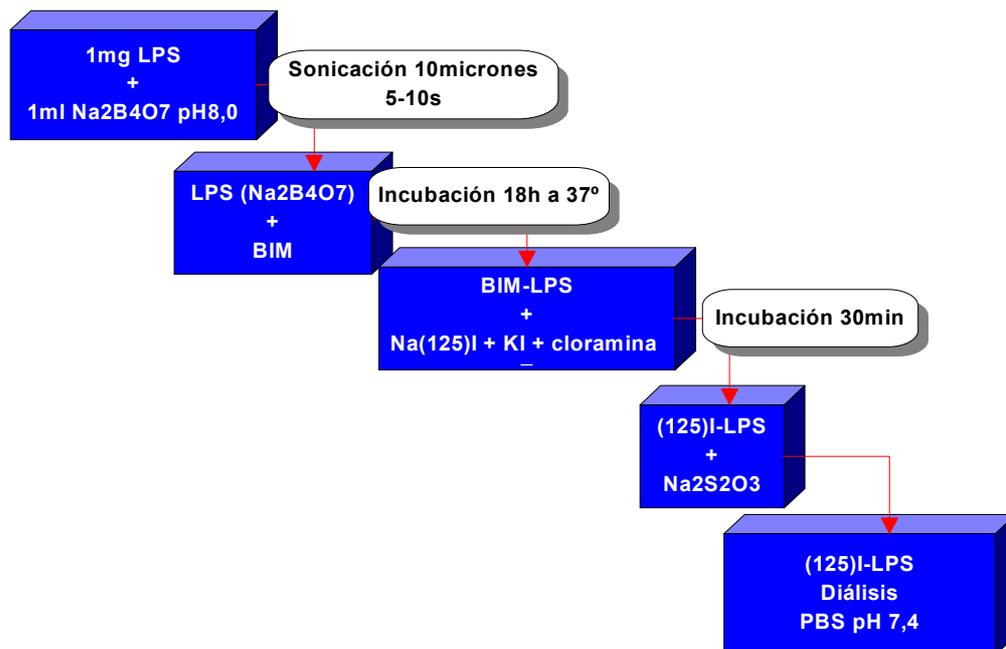


Figura III-5: Esquema de tratamiento del LPS para su marcaje con I^{125}

Se añade 1mg LPS a 1ml tampón borato ($Na_2B_4O_7$ 19,1mg/ml) pH 8,0 sonicando tres veces la muestra durante 5-10s con una amplitud 10 micrones. Se añaden 9,2mg de metil-4-hidroxibenzimidato clorhidrato (BIM) y la reacción se incuba 18h a 37°C. Entonces se añaden NaI^{125} , KI y cloramina T al BIM-LPS ya formado dejándolo incubar a temperatura ambiente durante 30min. La reacción se termina con la adición de $Na_2S_2O_3$. El exceso de I^{125} se elimina

por diálisis extensiva frente a PBS, pH 7,4. La actividad específica del I^{125} se encuentra en el intervalo 300-400dpm/ng.

III.8. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

III.8.1. PRECISIÓN DE LA MEDICIÓN

Se ha obtenido la precisión de cada procedimiento, expresada como desviación estándar, a partir de los resultados de determinaciones duplicadas, como mínimo, de un parámetro en al menos tres muestras distintas (cultivos celulares o animales) obtenidas tras un mismo tratamiento. Para obtener la desviación estándar de un total de N mediciones en g grupos, se suman los cuadrados de las desviaciones en cada grupo, se suman las sumas así obtenidas, se divide por los grados de libertad y se halla la raíz cuadrada del resultado. El número de grados de libertad es $N-g$, debido a que se pierde uno en cada grupo.

$$s = \left\{ \frac{1}{N-g} \sum_g \sum_i (X_i - \bar{X}_i)^2 \right\}^{1/2}$$

Ecuación III-7: Cálculo de la desviación estándar de un grupo de mediciones, siendo X el valor medido, \bar{x} , la media de una población, N el número de mediciones y g el número de grupos en el que se han realizado las mediciones

Dado que puede demostrarse que la media aritmética obtenida de N mediciones es $N^{1/2}$ veces más confiable que una medición aislada, se ha utilizado la siguiente ecuación para obtener la desviación estándar de un parámetro medido:

$$s_{\bar{x}} = \frac{s}{N^{1/2}}$$

Ecuación III-8: Desviación estándar de la media

III.8.2. PROBABILIDAD DE LAS DESVIACIONES Y CÁLCULO DE LA SIGNIFICATIVIDAD

Se utiliza el valor t^1 para decidir si la diferencia entre dos medias es estadísticamente significativa. Este parámetro se utiliza para comprobar si la diferencia entre medias de dos muestras idénticas, tratadas con agentes diferentes, es significativa o debida simplemente al azar. Si la precisión de dos determinaciones es esencialmente la misma, puede hallarse de manera simple la probabilidad de una diferencia dada entre los dos promedios. El valor de t se obtiene a partir de la siguiente ecuación:

$$\pm t = \frac{(\bar{X}_A - \bar{X}_B)}{s_{\bar{x}}}$$

Ecuación III-9: Cálculo del valor t para promedios de dos grupos de medidas diferentes

Donde,

$$s_{\bar{x}} = s \left(\frac{1}{N_A} + \frac{1}{N_B} \right)^{\frac{1}{2}}$$

Ecuación III-10: Cálculo de la desviación estándar estimada de la diferencia entre las medias

siendo,

$$s = \left\{ \frac{\sum (X_A - \bar{X}_A) + \sum (X_B - \bar{X}_B)}{N_A + N_B - 2} \right\}^{\frac{1}{2}}$$

Ecuación III-11: Cálculo de la desviación estándar de la diferencia de las medias

También se ha utilizado otro método, el test de *Fisher*, para decidir cuándo dos *desviaciones estándar* son significativamente diferentes. Sirve para mostrar si la precisión de dos grupos de medidas distintos es la misma dentro de límites de probabilidad especificados. Si la precisión es diferente no se podrá utilizar el cálculo de t . La razón de las dos *desviaciones estándar* en cuestión ($s_1^2 > s_2^2$) es la relación de *desviaciones estándar* F

$$F = \frac{s_1^2}{s_2^2}$$

Ecuación III-12: Cálculo de la relación de desviaciones estándar F

Si el valor experimental de F es menor que el correspondiente valor de tablas, no hay diferencia estadística entre s_1 y s_2 ; si el valor experimental es mayor, s_1 es significativamente

¹ El uso de t fue introducido por W.S. Gosset, escribiendo bajo el seudónimo “Student”, *Biometrika* **6**, 1 (1908).

mayor que s_2 . Existen tablas que dan los valores de F para uno o más niveles de significación para distintos grados de libertad, n_1 y n_2 . La tabla que se utiliza en este trabajo es para un nivel de confianza de 95%.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IV.1. CARACTERIZACIÓN DEL MODELO DE *SHOCK* ENDOTÓXICO REVERSIBLE EN RATA

El estado de *shock* endotóxico reversible en rata se ha inducido mediante la administración intravenosa de 1,6mg de LPS de *E. coli* 0111:B4/100g de peso. Al ser esta dosis inferior a la letal permite la reversibilidad del *shock*. En el *shock* endotóxico reversible se pueden distinguir diferentes fases: instauración, aguda y recuperación (Figura IV-1). Estas fases han sido establecidas considerando las alteraciones observadas en la morfología de distintos tejidos (hígado, pulmón, glándulas adrenales) así como las variaciones de distintos parámetros bioquímicos en plasma (glucosa, aspartato aminotransferasa AST y albúmina, Figura IV-2), características que permiten conocer el grado de afectación del animal y la evolución del proceso endotóxico. Tras la inducción (entre las 0 y las 4 horas) comienza la instauración del *shock*. Entre las 4 y las 6 horas, fase aguda, se observa piloerección, sed, aumento de la temperatura corporal y pérdida de peso. A partir de 24-48 horas, en las que desaparecen todos los síntomas anteriores, el animal alcanza la fase de recuperación.



Figura IV-1: Etapas del shock

Estudios previos han demostrado la existencia de alteraciones histológicas en el hígado durante la fase aguda del *shock*, como coagulación intravascular diseminada (DIC), acúmulo de lípidos y necrosis alrededor de las venas centrolobulillares, que desaparecen en la fase de recuperación³⁴². Las zonas afectadas también exhiben un incremento significativo del retículo endoplasmático rugoso, lo que justifica el aumento de síntesis de proteínas durante la fase aguda. Respecto a los niveles plasmáticos de glucosa, se observa que, tras una temprana hiperglucemia (70% sobre el control), se produce una acusada hipoglucemia en la fase aguda (50% respecto a

los valores control). La actividad aspartatato aminotransferasa (AST) alcanza valores del 300% en dicha fase para después volver a los valores normales durante la fase de recuperación, (Figura IV-2)¹¹⁶. No se observan cambios apreciables en la actividad de la fosfatasa alcalina sérica, lo que demuestra que la endotoxina no produce colestasis en este modelo.

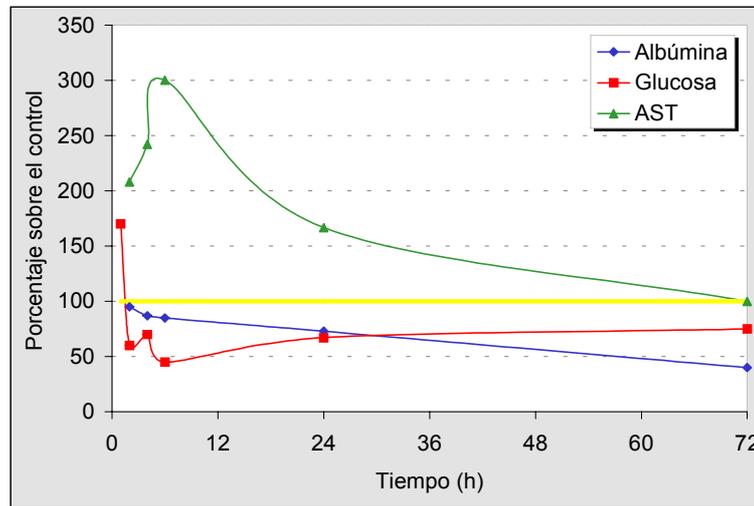


Figura IV-2: Evolución de los parámetros característicos del shock endotóxico

El peso corporal se ve también afectado durante el **shock endotóxico reversible**, siendo característica su disminución en animales intoxicados. Como se aprecia en la Figura IV-3, las ratas intoxicadas utilizadas en este estudio experimentaron una pérdida de peso tanto en la fase aguda como en la de recuperación, siendo esta pérdida más acusada (10%) a las 24 horas. A partir de este tiempo los animales empiezan a recuperar peso a medida que van remitiendo los síntomas del *shock*.

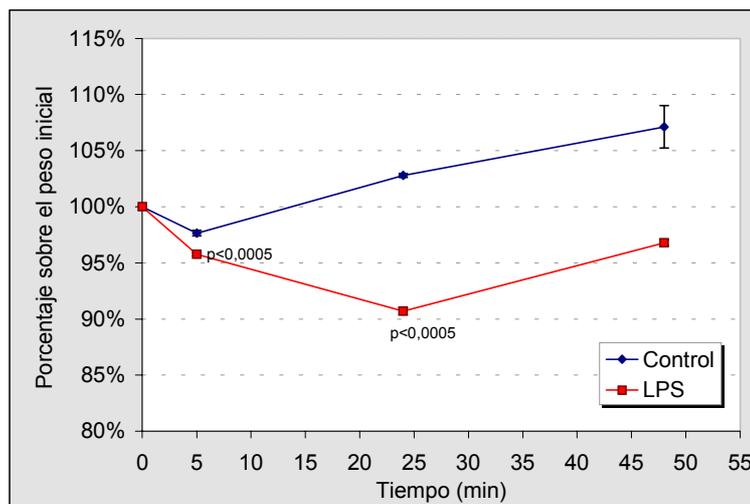


Figura IV-3: Estudio del peso corporal durante las distintas fases del shock endotóxico reversible.

La utilización de este modelo de **shock reversible** hace posible el estudio *in vivo* de la acción endotóxica, y de los mecanismos de defensa del organismo. Se evitan así las complejas alteraciones producidas por el fracaso general del organismo presentes en un estado de *shock* irreversible.

IV.2. ACCIÓN DEL LPS *IN VIVO* SOBRE SISTEMAS ANTIOXIDANTES

Numerosos estudios indican que la formación de especies reactivas de oxígeno o ROS durante el *shock* endotóxico, puede ocasionar graves alteraciones en el tejido hepático³⁴³⁻³⁴⁷. Los radicales libres pueden ser generados intracelularmente, principalmente en mitocondrias y peroxisomas, o proceder de las células fagocíticas generados como mecanismo antimicrobiano. Una de sus consecuencias más importantes es la inducción de peroxidación lipídica que altera la estructura, organización y funcionalidad de los sistemas de membrana. También son capaces de alterar la estructura y funcionalidad de las proteínas, especialmente las que contienen grupos tiólicos expuestos al entorno, y dañar gravemente las cadenas de ácidos nucleicos.

Las consecuencias de este estrés oxidativo dependen del estado de los sistemas antioxidantes intracelulares, así como de los cambios adaptativos que puedan sufrir dichos sistemas. Para profundizar en los mecanismos de respuesta del organismo ante la liberación de especies reactivas del oxígeno (ROS) desencadenada por la endotoxina se ha llevado a cabo el estudio de varios sistemas clave para la defensa antioxidante durante las distintas fases del **shock endotóxico reversible** inducido en rata tales como el sistema glutatión y las enzimas catalasa y superóxido dismutasa mitocondrial.

IV.2.1. VALORACIONES EN TEJIDO HEPÁTICO

Las ROS, tales como el anión superóxido (O_2^-), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el radical hidroxilo (OH^\bullet) y el oxígeno singlete son productos del metabolismo normal^{205,348}. La mitocondria metaboliza cerca de un 80% del O_2 y es la fuente más importante de ROS, ya que un 1-2% del oxígeno que metaboliza se convierte en O_2^- en distintos lugares de la cadena respiratoria y en la matriz mitocondrial. Las concentraciones en el estado estacionario de O_2^- y H_2O_2 mitocondriales están en el rango picomolar y nanomolar respectivamente³⁴⁹. En ciertos estados fisiopatológicos, entre los que se encuentra la sepsis³⁵⁰, hay un incremento muy notable de la generación de ROS por las mitocondrias.

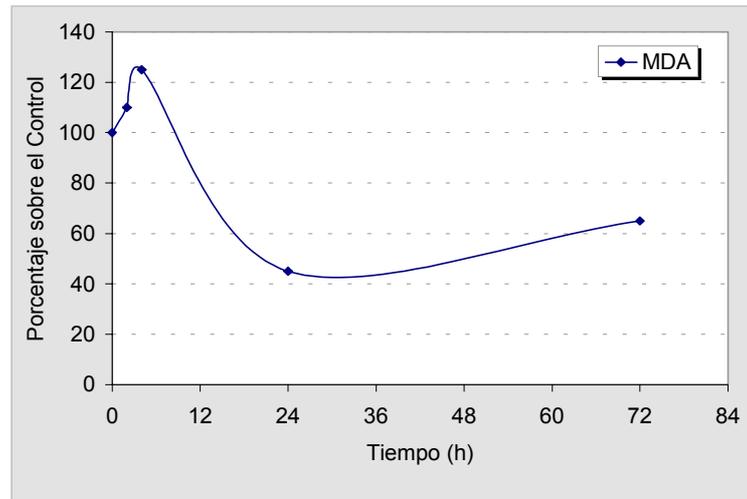


Figura IV-4: Variación de los niveles de malonil-dialdehído (MDA) en homogeneizado de hígado, durante el shock endotóxico reversible inducido por LPS

Investigaciones previas han demostrado que la endotoxina induce *in vivo* un incremento de la peroxidación lipídica, evaluada a través de los niveles de malonil-dialdehído (MDA), en el hígado durante la fase aguda del *shock*, disminuyendo después por debajo de los valores control en la fase de recuperación⁴⁵ (Figura IV-4). Paralelamente se observa un comportamiento también bifásico, pero inverso, de la actividad citosólica superóxido dismutasa (Cu-Zn-SOD) en consonancia con el papel protector antioxidante de dicha enzima (Figura IV-5).

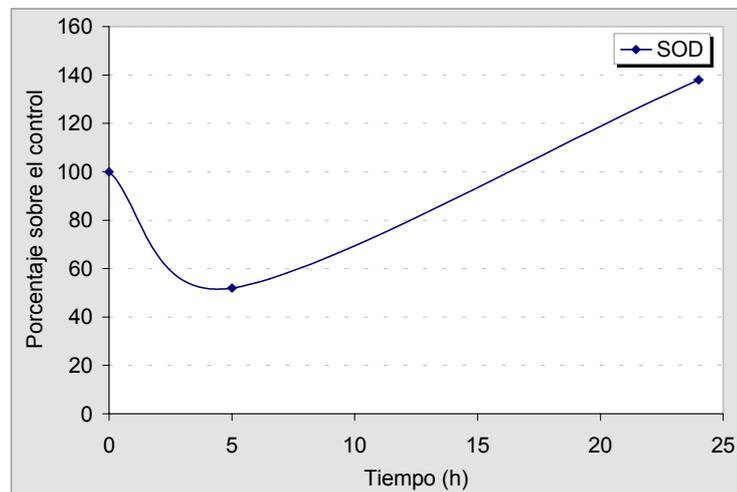


Figura IV-5: Variación de la actividad de SOD en fracción soluble hepática, durante el shock endotóxico reversible inducido por LPS

En este estudio se han evaluado en hígado de rata tres sistemas implicados en la defensa antioxidante intracelular durante el **shock endotóxico reversible**: i) El sistema glutatión, que se utiliza habitualmente para cuantificar indirectamente la superproducción de radicales libres mediante el índice GSSG/GSH o bien GSSG/tGSH, ii) la Mn-SOD, primera línea de defensa

mitocondrial para la inactivación del anión superóxido (O_2^-) y iii) la catalasa, enzima muy abundante en hígado, que termina la inactivación de las ROS.

IV.2.1.1. GLUTATIÓN

El glutatión desempeña un papel muy importante en la protección celular frente a los daños ocasionados por la exposición a ambientes oxidantes, tanto por su acción tamponadora redox, como por el hecho de ser el sustrato de importantes enzimas de defensa y de regular ciertas rutas metabólicas. Este tripéptido (γ -Glu-Cis-Gly) se encuentra mayoritariamente en su forma reducida (GSH), cuya concentración en humanos varía de 0,5 a 10mM en la mayor parte de las células y de 0,5 a 10 μ M en el plasma³⁵¹. *In vivo*, el disulfuro de glutatión (GSSG) constituye menos de un 0,5% del glutatión total, siendo la relación GSSG/GSH (o GSSG/tGSH) indicativa del estado redox celular. Dado que el hígado es el principal órgano que sintetiza y exporta glutatión, la determinación de los niveles hepáticos de este sistema antioxidante es fundamental para conocer el estrés oxidativo producido durante el estado de *shock* endotóxico reversible.

TIEMPO	GLUTATIÓN TOTAL (%)
5 HORAS	118*
24 HORAS	112*
48 HORAS	57**

Tabla IV-1: Variaciones en los niveles de glutatión total hepático durante el *shock* endotóxico reversible. Los valores están expresados en porcentajes referidos a los correspondientes controles (*p<0.05, **p<0.025)

En lo referente al glutatión total en hígado (Figura IV-6), se produce un incremento significativo por encima de los niveles control durante el **shock endotóxico** tanto a las 5 como a las 24 horas, siendo más acusado en la fase aguda (5 horas) y disminuyendo progresivamente a medida que avanza la recuperación hasta alcanzar un valor inferior al de los controles a las 48 horas. En la Tabla IV-1 aparecen reflejadas estas variaciones en tantos por ciento. Los valores de los controles oscilaron entre 7,3 y 8,5 μ moles/mg de tejido.

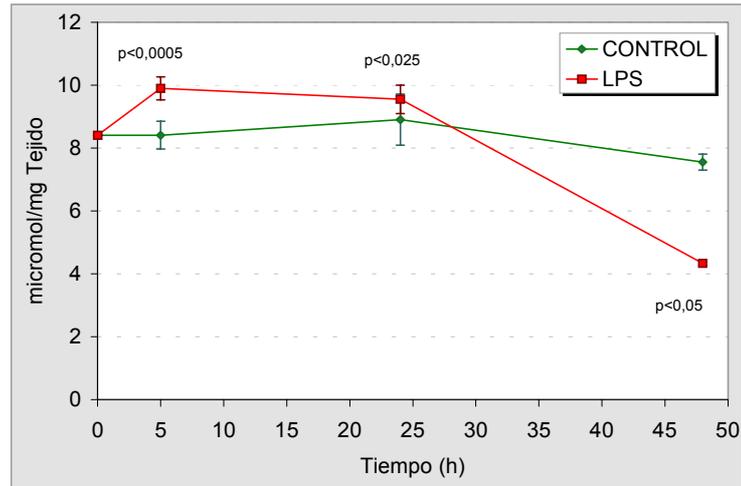


Figura IV-6: Niveles de glutatión total hepático durante las distintas fases de *shock* endotóxico reversible en rata.

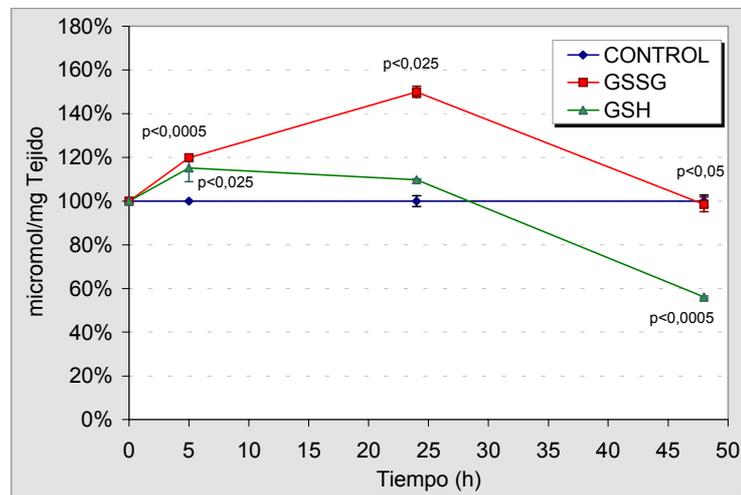


Figura IV-7: Niveles de glutatión reducido y oxidado hepático durante las distintas fases del *shock* endotóxico reversible en rata.

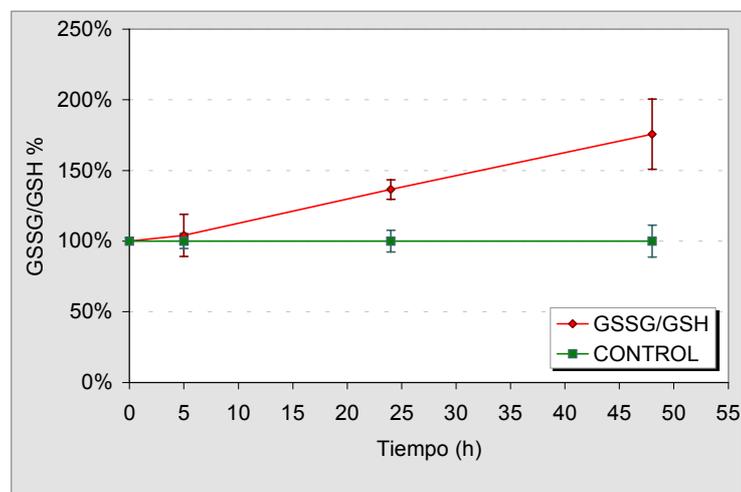


Figura IV-8: Variaciones en la relación GSSG/GSH hepática durante las distintas fases de *shock* endotóxico reversible en rata.

Las variaciones en los niveles de glutatión total pueden entenderse como respuesta al estrés oxidativo producido durante el **shock endotóxico reversible**, coincidiendo el valor máximo de este parámetro con la fase aguda del proceso. A su vez, la relación GSSG/GSH, indicativa del estrés oxidativo sufrido por las células, aumenta progresivamente a las 5h, 24h y 48h, no recuperando los valores control durante el tratamiento (Figura IV-8). La causa del aumento de este índice es el incremento de GSSG, a 5h y 24h, y la disminución de GSH a 48h (Figura IV-7).

El hecho de que exista estrés oxidativo intrahepático en el modelo utilizado en este trabajo coincide con las observaciones de otros autores durante diversos estados patológicos, incluyendo la sepsis³⁵⁰. Aparentemente existe una ligera activación de la síntesis de GSH a 5h y 24h, que no es suficiente para revertir el índice de estrés a sus valores normales a 24h. Sin embargo, es muy llamativa la disminución radical (57%) del tGSH a las 48h, debida principalmente a la disminución del GSH, ya sea por reducción de la síntesis o por su exportación al plasma o a la bilis. Estudios previos han demostrado que a partir de las 24h, tanto el daño histológico del tejido hepático, como los niveles de aspartato aminotransferasa, están prácticamente recuperados. Por lo tanto no se puede justificar la drástica disminución del GSH por un fracaso hepático. Una de las causas posibles podría ser que la vuelta del GSSG a los niveles normales inhiba, o deje de activar, la síntesis de GSH. Asimismo podría ocurrir que tras la desaparición de la presión oxidativa, la célula module los niveles de GSH con otros fines. Diversos estudios del metabolismo de la glucosa constatan que muchas de las enzimas implicadas están reguladas *in vitro* por diversos disulfuros. El aumento de AMPc, debido tanto a glucagón, ayuno, u otros activadores de la adenilato ciclasa, causa un aumento en la relación GSSG/GSH celular en hígado de rata³⁵². En este estado se ven estimuladas las enzimas que intervienen, tanto en la gluconeogénesis como en la glucogenolisis, teniendo como resultado la producción de glucosa cuya secreción también se encuentra estimulada³⁵³.

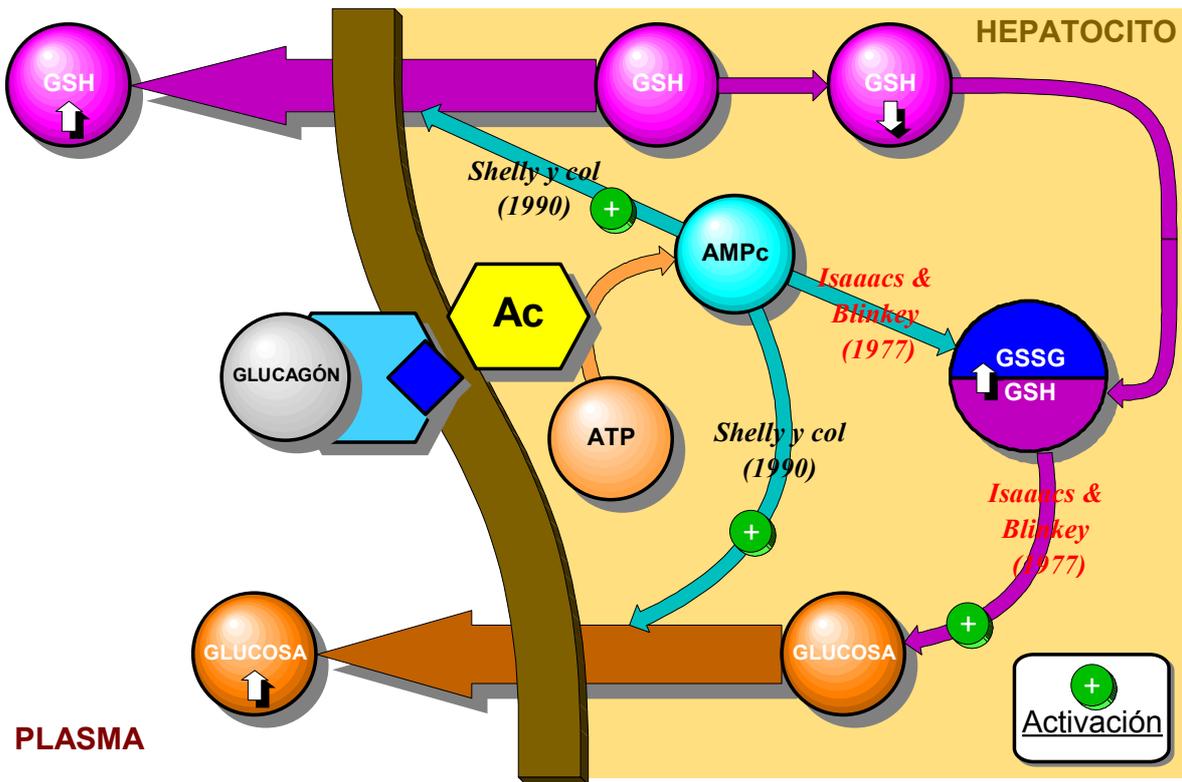
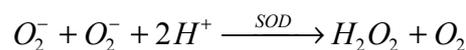


Ilustración IV-1: Esquema resumen de los estudios publicados que relacionan la homeóstasis del GSH y de la glucosa con el AMPc y el estado redox de la célula.

Durante el *shock* endotóxico, el aumento de la demanda periférica de glucosa se une a un fracaso hepático en la síntesis de ésta, debida principalmente a la inhibición de la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa, tanto directamente por el LPS como por factores hormonales³⁵⁴. A pesar de ello, endotoxicosis leves provocan una ligera hiperglucemia^{355,356}. La fosfoenolpiruvato carboxiquinasa es, por otro lado, activada por el aumento de la relación GSSG/GSH³⁵². Por lo tanto la disminución del GSH observada en el presente estudio podría provocar una activación generalizada de la síntesis de glucosa, imprescindible para la recuperación del *shock*.

IV.2.1.2. SUPERÓXIDO DISMUTASA MITOCONDRIAL (MN-SOD)



Ecuación IV-1: Dismutación del anión superóxido catalizada por la enzima superóxido dismutasa

Las mitocondrias son la principal fuente de radicales libres en la mayoría de las células tanto en estado basal como de estrés oxidativo. La cadena de electrones de la respiración, aunque eficiente, siempre produce la reducción de algunas moléculas de O₂ que pasan al estado de

radical O_2^- . Para evitar el daño potencial que este radical libre podría ejercer sobre las estructuras mitocondriales (DNA, membranas, grupos tiólicos...), los organismos han desarrollado una superóxido dismutasa en la matriz mitocondrial. Esta superóxido dismutasa tiene una masa molecular de 85.000KDa y 4 subunidades. Fue en principio descrita en hígado de pollo y en varios mamíferos por Weisinger y Fridovich en 1973²³⁵. Es similar a la que Keele y col.³⁵⁷ aislaron en bacterias, y como metal de catálisis contiene Mn.

Para evaluar el papel de este sistema en el modelo de **shock endotóxico reversible** se ha valorado la actividad SOD en mitocondrias aisladas por el método de Marklund y Marklund³³⁷, en la fase aguda (5h), fase de recuperación temprana (24h) y tardía (48h). Los resultados se han representado en la Figura IV-9 como porcentajes de la actividad en mitocondrias hepáticas aisladas de animales control.

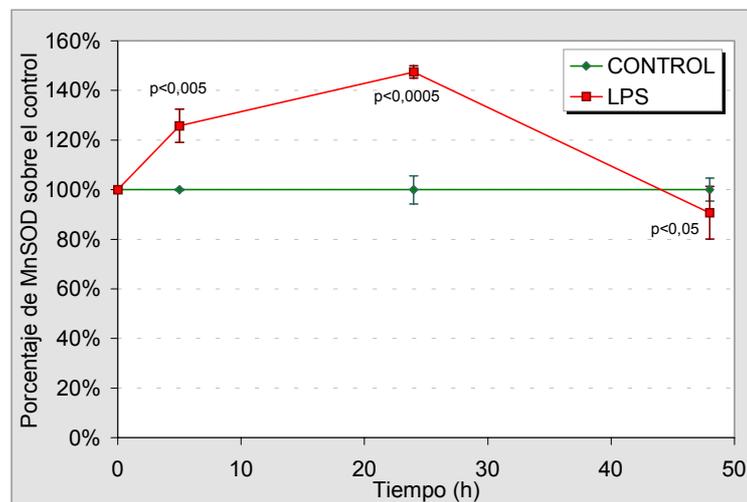


Figura IV-9: Efecto de la endotoxina de *E. coli* en la actividad Mn-SOD de hígado de rata a diferentes tiempos tras la inyección del LPS.

Como se puede observar en la Figura IV-9, hay un incremento significativo de la actividad ya en la fase aguda. Este incremento es aún mayor a las 24h, fase temprana de recuperación, para descender por debajo del estado basal a las 48h. Otros autores han descrito aumentos *in vivo* o *in vitro* de la actividad de la Mn-SOD en diversos tejidos por citoquinas como IL-1 β o TNF³⁵⁸⁻³⁶⁰, ambos mediadores del **shock endotóxico**. Shiki y col en 1987³⁶¹, encontraron que la endotoxina incrementaba la Mn-SOD en células del endotelio pulmonar bovino. De hecho el mRNA y, concomitantemente la proteína Mn-SOD, es fácilmente inducible por otros agentes distintos de las citoquinas, como las drogas autooxidantes y las radiaciones ionizantes. Aunque no se conoce exactamente el mecanismo de acción de estos agentes, ambos están relacionados con la liberación de radicales libres³⁶².

Es importante hacer notar el paralelismo entre el perfil de la actividad Mn-SOD y el indicador de la presencia de radicales libres, GSSG, obtenido en el presente trabajo (Figura IV-7). Este valor también está significativamente elevado sobre los controles a las 5h de inducción del *shock*, y incrementándose a las 24h, para volver a los niveles basales a las 48h. Este hecho demuestra que existe una pronunciada modulación de la Mn-SOD en respuesta al estado redox de la célula. Otros autores han observado esta modulación durante diversos procesos que alteran el estado oxidativo celular³⁶³, sugiriendo incluso que la Mn-SOD podría ser incluida entre las así llamadas “proteínas de estrés”.

IV.2.1.3. CATALASA



Ecuación IV-2: Reacción catalizada por la catalasa

La reacción de dismutación catalizada por la SOD produce la generación de peróxido de hidrógeno (H_2O_2), que a su vez se transforma fácilmente, por ruptura del enlace O-O o enlace peróxido, en especies oxigenadas muy oxidantes, especialmente el radical hidroxilo $\bullet OH$. Este radical es “hiperreactivo” y su formación en una célula puede tener consecuencias muy graves; reacciona al azar con infinidad de moléculas biológicas, a las que inactiva o destruye. La catalasa es la enzima que cataliza específicamente la transformación H_2O_2 en H_2O y O_2 .

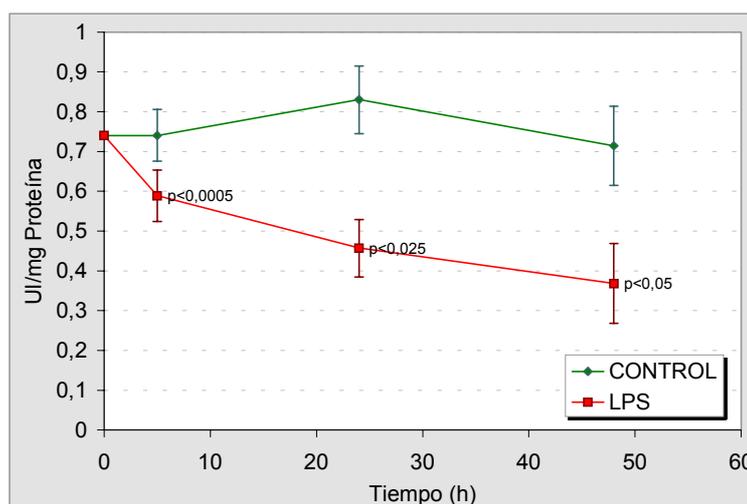


Figura IV-10: Efecto de la endotoxina de *E. coli* en la actividad catalasa de hígado de rata tras diferentes tiempos de inyección del LPS.

En el presente trabajo se observa una inhibición de la actividad catalasa en hígado de rata durante el estado de *shock* endotóxico reversible a todos los tiempos estudiados (Figura IV-10).

A las 48h no sólo no se han recuperado los valores control, sino que la inhibición es aún más marcada.

Aunque puede parecer sorprendente la inhibición de un sistema defensivo anti-radicales libres en un proceso durante el cual existe un marcado estrés oxidativo, sin embargo, esta inactivación también ha sido caracterizada en otros estados patofisiológicos que inducen este tipo de estrés, tales como ayuno³⁴⁹, procesos cancerosos³⁶⁴, y daños por isquemia-reperfusión³⁶⁵. Esta reducción de la actividad es debida en parte a la formación de complejos I y II de catalasa-H₂O₂, reversibles por la adición de etanol. Estos compuestos inactivos son generados por la interacción del O₂⁻ con la catalasa y son evitados en parte por la SOD³⁶⁶. No obstante existen discrepancias en la magnitud de la inhibición de la catalasa inducida por LPS. Incluso varios autores han descrito aumentos de su actividad o mantenimiento de los niveles basales^{367,368}. Estas discrepancias pueden ser debidas a los diferentes modelos experimentales utilizados. Ghosh y col.³⁶⁹ detectaron por inmunoblot un marcado incremento de la cantidad de proteína catalasa en un modelo de infusión continua (24h) de bajas dosis de *Salmonella typhirium*. Sin embargo, la actividad catalasa estaba disminuida significativamente y no alcanzaba niveles correlativos con los niveles de proteína por adición de etanol. Esos hechos les llevan a sugerir la existencia de una inactivación irreversible concomitante con la inactivación reversible. Hechos similares se han descrito en modelos de isquemia-reperfusión en riñones de rata, donde la reperfusión conduce a la formación de compuestos inactivos de catalasa y a la degradación de la misma³⁶⁵.

IV.2.2. VALORACIÓN DE GLUTATIÓN EN PLASMA

Los datos anteriores demuestran que durante el **shock endotóxico reversible** el hígado responde ante el estrés oxidativo aumentando los niveles de glutatión total, para compensar el gasto de GSH, que resulta oxidado por radicales libres. Este hecho podría conducir también a alteraciones de los niveles de glutatión en plasma³⁷⁰. La exportación de GSH sirve de sistema de transporte de aminoácidos y de sistema cíclico de recuperación de residuos cisteína que son reutilizados para la síntesis de GSH. El hígado es el único órgano capaz de utilizar el azufre de la metionina para biosintetizar la cisteína a partir del esqueleto carbonado de la serina. El GSH hepático constituye una reserva de cisteína³⁷¹ ya que este aminoácido libre es muy tóxico. La excreción del GSH hepático en el plasma controla el aporte de cisteína necesario a los otros órganos y por consiguiente su capacidad de síntesis extrahepática de GSH. La regulación del transporte hepático sinusoidal de GSH tiene por tanto una gran importancia fisiológica³⁷².

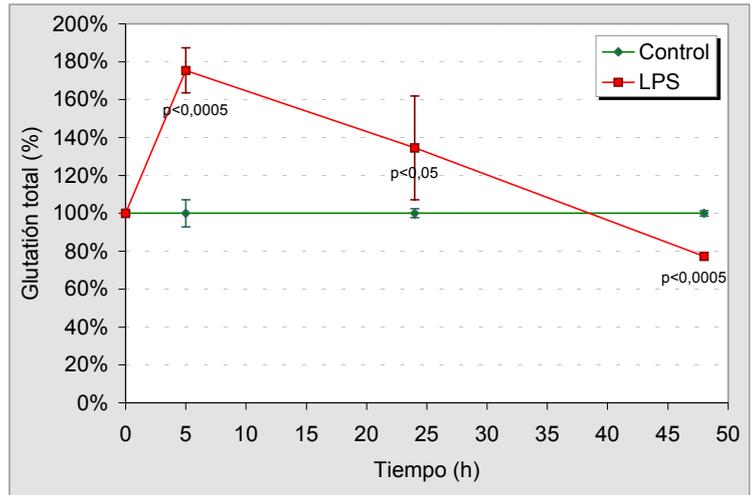


Figura IV-11: Niveles de glutatión total plasmático durante las distintas fases del shock endotóxico reversible en rata.

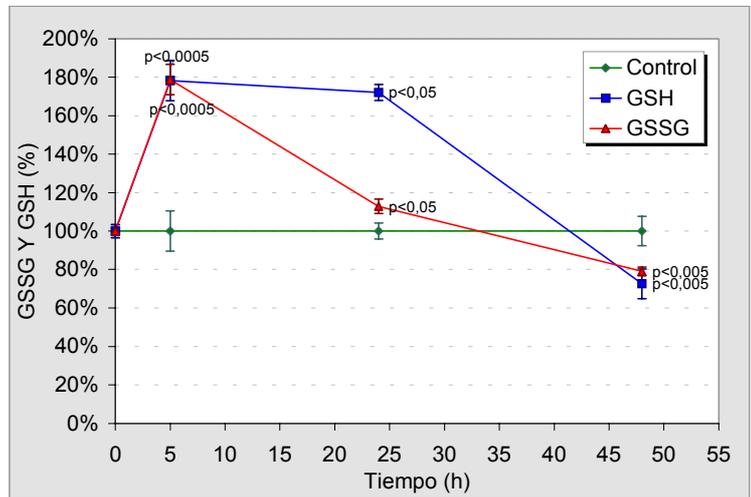


Figura IV-12: Niveles de glutatión reducido y oxidado plasmático durante las distintas fases del shock endotóxico reversible en rata.

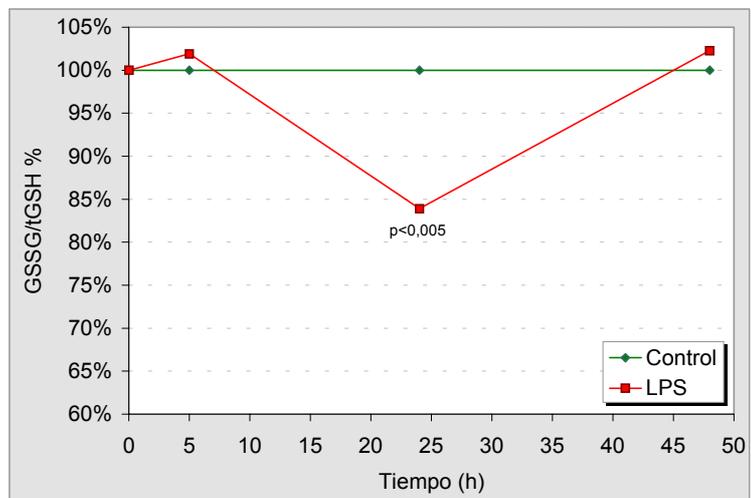


Figura IV-13: Variaciones en la relación GSSG/GSH plasmática durante las distintas fases del shock endotóxico reversible en rata.

Por otro lado hay datos que apoyan la neutralización de los radicales libres producidos por las células de Kupffer y los neutrófilos en el sistema vascular por parte del glutatión reducido que liberan las células parenquimatosas, atenuando el daño hepático, durante el estado de isquemia-reperusión³⁷³.

Por esta razón se determinaron los parámetros anteriores (Glutatión total, GSSG, GSH, GSSG/GSH) en plasma de ratas intoxicadas durante la fase aguda (5 horas) y de recuperación (24 y 48 horas). Los valores control de tGSH se situaron entre 69,5-91,4 μ M, los de GSH 23,3-33,6 μ M y los de GSSG 22,6-28,9 μ M. Como puede apreciarse en la Figura IV-11, el glutatión total aumenta en plasma de manera considerable en la fase aguda del *shock* con una tendencia a recuperar los niveles normales a las 24 horas y por debajo de éstos a las 48 horas. La relación GSSG/GSH experimenta igualmente un ligero incremento a las 5 horas (Figura IV-13). En cambio este índice disminuye por debajo de los valores control durante la fase de recuperación (24 horas), estabilizándose a las 48 horas. La causa de la disminución de la relación GSSG/GSH a las 24 horas es el acusado incremento de glutatión reducido (Figura IV-12) que se produce a partir de las 5 horas de tratamiento y que contrarresta las elevadas concentraciones de GSSG producidas en la fase aguda (Figura IV-12) que pueden alterar el estado redox del organismo dañando diversas estructuras en los distintos tejidos. La relación GSSG/GSH se restablece tras 48 horas de la intoxicación indicando la reversibilidad del estado de *shock*.

Dado que en el modelo utilizado no se observa colestasis, lo que produciría un reflujo de glutatión desde la bilis, el aumento del tGSH circulante en plasma puede ser debido a tres causas:

- Degradación de GSH disminuida debido a alteración renal, ya que los riñones metabolizan un 90% del GSH circulante.
- Actividad disminuida de la γ -glutamyltransferasa, presente en la membrana de las células parenquimatosas.
- Incremento del flujo de GSH del hígado causado por la endotoxina.

Si bien no podemos descartar las dos primeras posibilidades, existen evidencias de que el tercer mecanismo es el responsable principal del aumento de los niveles de glutatión en el plasma. En primer lugar, la liberación de radicales libres inducida por la activación endotóxica de las células fagocíticas ocurre a nivel general del organismo. La exportación de GSH durante el ***shock endotóxico reversible*** tiene por tanto un doble fin, atenuar el daño oxidativo en el sistema vascular sistémico y proporcionar cisteína a otros tejidos para que estos sintetizen su

propia reserva antioxidante. En otros procesos que implican estrés oxidativo, tales como modelos de intoxicación etílica crónica³⁷⁴ o isquemia reperfusión³⁷⁵, se ha demostrado un aumento en el flujo sinusoidal de GSH. Jaeschke³⁷⁶ utilizó un modelo *in vivo* de perfusión hepática con endotoxina, en el que a tiempos tan cortos como 15 min ya observó un aumento significativo en el tGSH plasmático, demostrando su origen netamente hepático.

Por otro lado el transporte de GSH al plasma es un proceso saturable, cuya regulación depende de la tasa de síntesis de GSH³⁷⁷, de los niveles de cistina y ditiolos extracelulares³⁷⁸ y de las hormonas dependientes de AMPc. En el modelo utilizado en el presente trabajo se produce una regulación positiva de los tres mecanismos. Existe una tasa incrementada de síntesis de GSH, Figura IV-7, con un perfil de contenido intracelular de tGSH casi idéntico al de GSH en plasma, Figura IV-6. Se observa también un aumento de ditiolos, representados en última instancia por el GSSG, lo que activaría el transporte de GSH (Figura IV-12).

Finalmente, en cuanto a la regulación hormonal, es bien sabida la hiperglucagonemia propia de los estados de *shock*. Se ha descrito que la liberación de GSH provocada por esta hormona es anterior en el tiempo a la de glucosa³⁵³. Estos hechos apoyan la hipótesis, enunciada en el capítulo IV.2.1.1, acerca de una regulación de la homeostasis de la glucosa mediada por el sistema GSH. En las figuras siguientes se detalla un esquema hipotético basado tanto en los resultados obtenidos en este trabajo como en los de otros autores.

En la fase aguda la endotoxina bacteriana provoca por un lado una demanda periférica aumentada de glucosa y por otro, un incremento de los radicales libres en el plasma debido a la activación de las células fagocíticas. Asimismo provoca un aumento de la presión oxidativa intracelular que se refleja en la elevación del GSSG intrahepático, desplazando la relación de estrés oxidativo, lo que causa la activación de la gluconeogénesis que se encuentra directamente inhibida por la endotoxina. Por otro lado la síntesis de GSH estimula la secreción de GSH al plasma, que también está modulada por la hiperplucagonemia característica del *shock*.

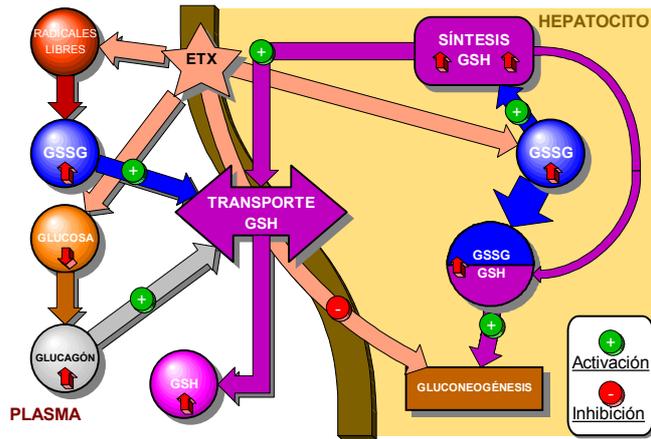


Ilustración IV-2: Hipótesis planteada para la fase aguda del shock endotóxico reversible.

A las 24h, fase de recuperación temprana, persiste un aumento de la presión oxidativa extra e intracelular. El estado redox intracelular y la hiperplucagonemia siguen estimulando la gluconeogénesis y la síntesis incrementada de GSH se refleja en un aporte aumentado al plasma que mantiene valores muy superiores a los encontrados en los animales control.

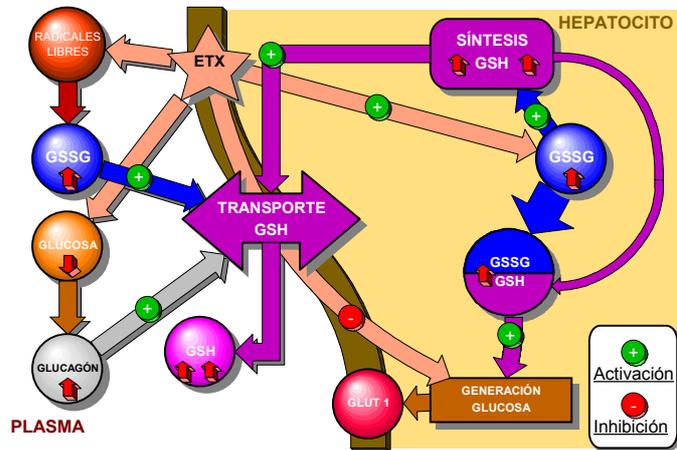


Ilustración IV-3: Hipótesis planteada para la fase de recuperación de 24h del shock endotóxico reversible

A las 48h, fase de recuperación tardía, los efectos de la endotoxina han desaparecido, según marcan los parámetros sanguíneos, salvo una hipoglucemia sistémica y por tanto niveles altos de glucagón. La presión oxidativa ha desaparecido, e incluso está por debajo de los controles, sin embargo la relación de estrés (GSSG/GSH) está extremadamente elevada, debido a una disminución drástica del contenido intracelular de GSH. Dicha disminución está directamente relacionada con el descenso en la concentración plasmática de GSH.

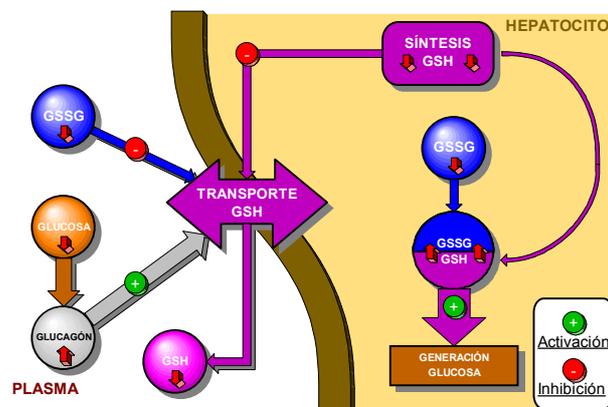


Ilustración IV-4: Hipótesis planteada para la fase de recuperación de 48h del shock endotóxico reversible

IV.3. MODELOS EXPERIMENTALES *IN VITRO*

En el **shock endotóxico**, las endotoxinas bacterianas (LPS) llegan al hígado transportadas por el torrente circulatorio y difunden a través de los sinusoides hepáticos hasta las células parenquimatosas. En experimentos *in vivo*, utilizando ratas sometidas a **shock endotóxico reversible**¹¹⁶, se han podido observar lesiones histológicas tanto en el parénquima hepático, fundamentalmente a nivel de vena centrolobulillar, como en los sinusoides, que aparecen dilatados y con un incremento en células macrofágicas³⁴². Las células de Kupffer, observadas mediante microscopía electrónica, muestran un incremento en su actividad fagocítica que puede relacionarse con su acción de eliminación de las endotoxinas circulantes^{43,138}.

Los modelos *in vivo* presentan siempre una gran complejidad siendo imposible determinar las acciones primarias de las endotoxinas en cada tipo celular. La afectación general del organismo hace que la respuesta hepática pueda estar condicionada por la acción de hormonas, sistema de complemento e hipoxia tisular inducida por la aparición de microtrombos o coagulación intravascular diseminada (DIC). El estudio de la acción primaria de las endotoxinas bacterianas sobre las distintas poblaciones hepáticas sólo es posible aislando los distintos tipos celulares y observando las alteraciones inducidas por un tratamiento directo con las endotoxinas.

IV.3.1. CÉLULAS PARENQUIMATOSAS EN CULTIVO

Un sistema de elección para el estudio de la respuesta hepática a la endotoxina lo constituyen los cultivos primarios de células parenquimatosas y sinusoidales. Las células parenquimatosas en cultivo han sido previamente utilizadas para estudiar distintos aspectos de la acción del LPS sobre el hígado^{103,118,379,380}. Dada la importancia del metabolismo hepático, los cultivos primarios de células parenquimatosas se han utilizado para estudiar prácticamente todas las funciones metabólicas del hígado.

La determinación de la pureza de las poblaciones de células parenquimatosas obtenidas se ha llevado a cabo mediante técnicas de microscopía óptica en campo claro y por citometría de flujo. En las preparaciones celulares recién aisladas se realiza rápidamente un recuento y un estudio de viabilidad celular mediante la tinción selectiva con azul Tripán.

IV.3.1.1. ESTUDIOS MORFOLÓGICOS DE CÉLULAS PARENQUIMATOSAS. MICROSCOPIA ÓPTICA Y CONFOCAL

Las características morfológicas de las células parenquimatosas en cultivo primario se han comprobado mediante microscopía óptica en contraste de fases observándose las monocapas formadas después de 24h del aislamiento celular.

Las células parenquimatosas muestran, a las 24h, la formación de una monocapa continua con una buena adhesión al soporte, adoptando una configuración poligonal característica del parénquima hepático (Figura IV-14), siendo a este tiempo de cultivo cuando muestran una viabilidad y funcionalidad óptimas. La adición de endotoxina bacteriana (LPS de *E. coli* 0111:B4) a estos cultivos ha permitido, en estudios previos, observar la respuesta celular desde el punto de vista morfológico. Las células parenquimatosas presentan una marcada retracción citoplasmática, observada por microscopía óptica y electrónica de barrido¹⁰³ frente a dosis elevadas de endotoxina (0,5-1mg/ml).

Las micrografías de la Figura IV-15 y la Figura IV-16 muestran células hepáticas cultivadas teñidas con rojo Nilo con distintos aumentos. Este compuesto se une específicamente a fases lipídicas y permite observar el buen estado y la homogeneidad de la monocapa.

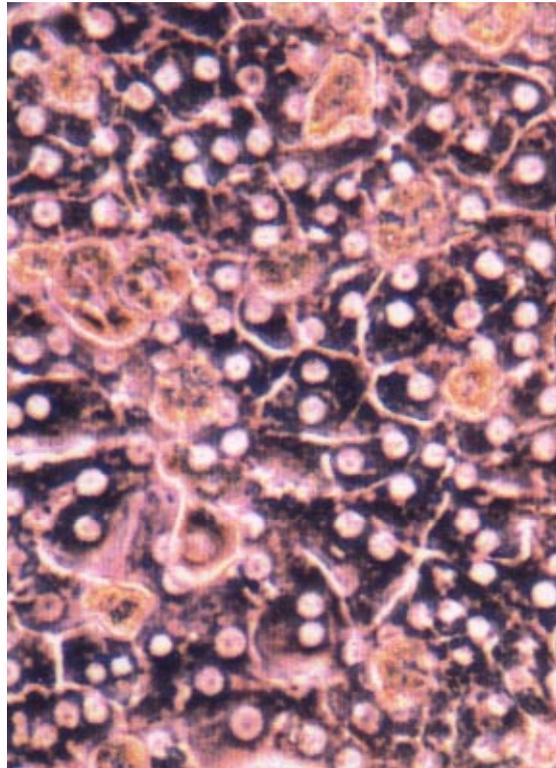


Figura IV-14: Micrografía óptica de contraste de fases de células parenquimatosas cultivadas (24h) (x960).

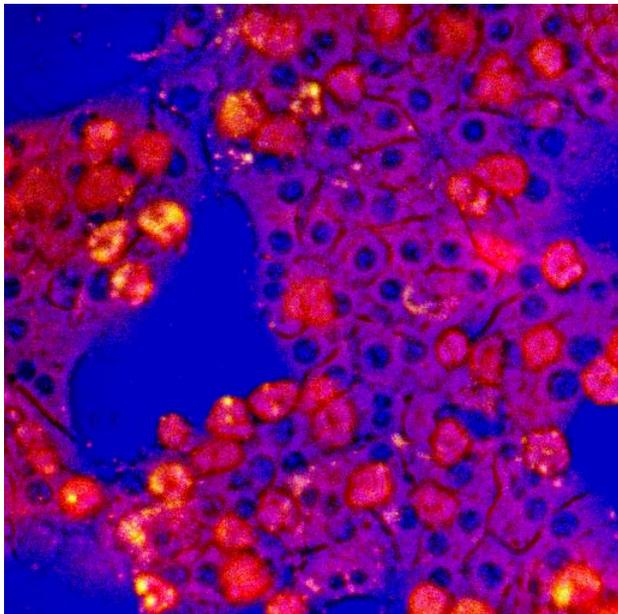


Figura IV-15: Micrografía óptica de contraste de fase de células parenquimatosas cultivadas teñidas con rojo Nilo (x480)

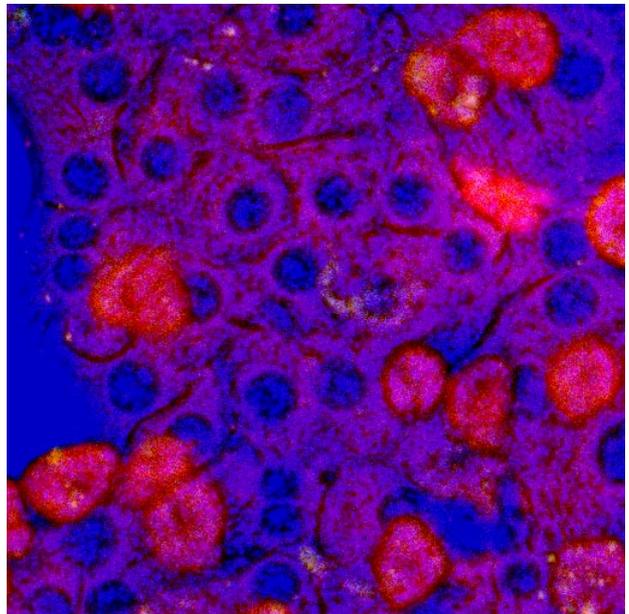


Figura IV-16: Micrografía óptica de contraste de fase de células parenquimatosas cultivadas teñidas con rojo Nilo (x1200)

IV.3.1.2. CONTENIDO INTRACELULAR DE GLUTATIÓN

Las células parenquimatosas son aisladas por el método de Berry y Friend³²³ modificado por Seglen³²⁴⁻³²⁶ con colagenasa tal y como se describe en Materiales y Métodos. Se cultivan en medio William's con bicarbonato y suero bovino fetal. Con el fin de conocer las condiciones óptimas para los estudios de respuesta antioxidante a la endotoxina se evaluó el efecto del cambio de medio en la relación GSSG/tGSH. Como se observa en la Figura IV-17, la relación de estrés oxidativo se ve fuertemente afectada por los lavados con PBS y el cambio de medio.

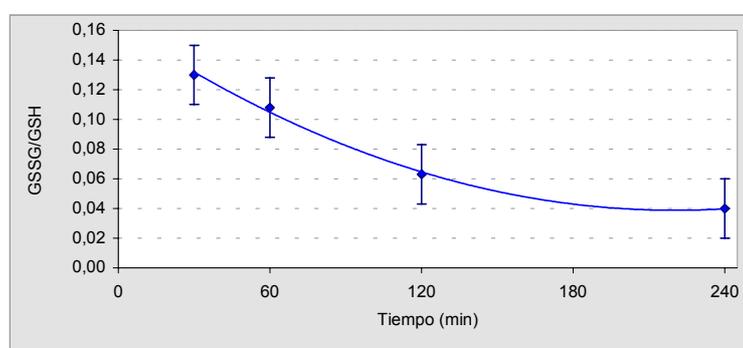


Figura IV-17: Evolución de la relación de estrés oxidativo tras un cambio de medio

Dado que a las 2h la relación de estrés ya se ha estabilizado, se establece un tiempo de descanso igual o superior a 3h a partir del cambio de medio. Tras este tiempo se administra una alícuota concentrada de LPS o del agente correspondiente (ver Materiales y Métodos).

IV.3.2. CÉLULAS SINUSOIDALES

Aunque las principales funciones hepáticas (metabolismo de proteínas, lípidos, hidratos de carbono y sales biliares) se realizan en las células del parénquima hepático, actualmente se consideran de gran importancia las interacciones de éstas células con las no parenquimatosas o sinusoidales que intervienen en la modulación metabólica y en la respuesta frente a distintos factores. Entre las células no parenquimatosas, la población de células de Kupffer representa los macrófagos hepáticos residentes que actúan principalmente como primera barrera de defensa frente a cualquier agresión hepática mediada por xenobióticos. Las células endoteliales tienen una función primordial en la regulación de la microcirculación hepática y del intercambio entre el parénquima hepático y la sangre. En el presente trabajo se han utilizado células sinusoidales

(Kupffer y endoteliales) tanto en suspensión como en cultivo, de acuerdo con el objetivo concreto de cada estudio.

IV.3.2.1. CÉLULAS EN SUSPENSIÓN. CARACTERIZACIÓN MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO

La determinación de la composición de las poblaciones de células sinusoidales obtenidas se ha llevado a cabo mediante técnicas de microscopía óptica en campo claro y citometría de flujo. En las preparaciones celulares recién aisladas se realiza rápidamente un recuento y un estudio de viabilidad celular mediante la tinción selectiva con azul Tripán al igual que en células parenquimatosas.

La caracterización de las células de Kupffer requiere, sin embargo, un estudio más detallado debido al gran parecido estructural con las células endoteliales. Se han realizado pruebas de tinción específica con diaminobencidina (marcador de oxidasas) pero esta tinción no es totalmente selectiva, pudiendo dar tinción positiva en algunos casos también las células endoteliales. Por ello se ha recurrido a la técnica de citometría de flujo como método para estudiar la composición de las preparaciones. Esta técnica permite distinguir poblaciones celulares según su complejidad estructural aunque la densidad y el tamaño celular sean muy parecidos. La citometría de flujo permite medir la luz dispersada por cada célula, demostrando diversos estudios que la luz dispersada en la dirección del haz (FSC) se correlaciona con el tamaño celular y la luz dispersada a 90° del haz se correlaciona con la complejidad celular. Además, en el caso de las células de Kupffer, existen marcadores específicos de macrófagos que permiten una caracterización completa de este tipo celular.

Tras la purificación se examinaron por citometría de flujo preparaciones mixtas de células sinusoidales, con células endoteliales y de Kupffer, lo que permite conocer las propiedades de dispersión de la luz y el porcentaje de cada tipo celular en la suspensión. En este estudio se han utilizado los anticuerpos monoclonales ED1 y ED2 marcados con PE, específicos para macrófagos de rata. Para comprobar la especificidad del marcaje y las condiciones óptimas de unión se realizaron diversos ensayos.

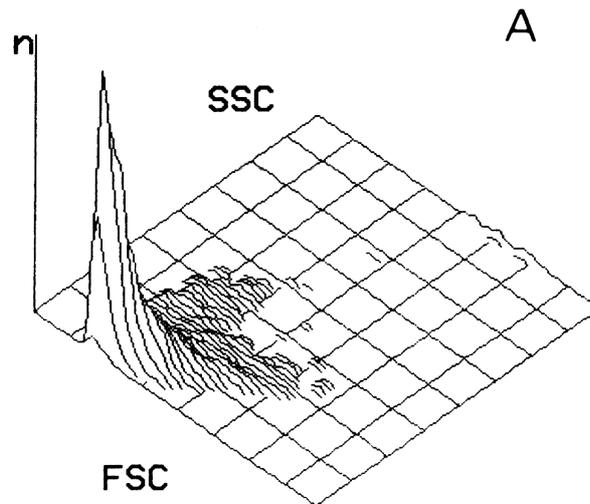


Figura IV-18: Propiedades de dispersión de la luz de células sinusoidales hepáticas en suspensión mixta. El gráfico muestra el número de células (n) frente a la luz dispersada a 0° y 90° del haz de luz, FSC y SSC respectivamente de la población total de células sinusoidales.

Como se puede observar en la Figura IV-18 la mayor parte de las células presentes en la suspensión pertenece a una población con valores bajos de FSC y SSC, correspondiente teóricamente a las células endoteliales.

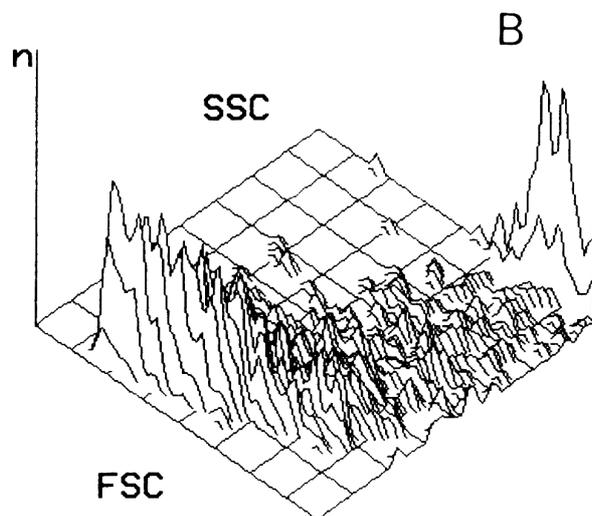


Figura IV-19: Propiedades de dispersión de la luz de células sinusoidales hepáticas. El gráfico muestra el número de células (n) frente a la luz dispersada a 0° y 90° del haz de luz, FSC y SSC respectivamente de la población de células sinusoidales positivas para el marcaje con ED1-PE. Se ha ampliado la escala del eje n para mejorar la imagen.

La Figura IV-19 muestra, en la misma población pero en una escala aumentada respecto a la Figura IV-18, las células reconocidas por ED1, caracterizadas por valores de FSC y SSC más altos, células con mayor tamaño y complejidad, identificadas como células de Kupffer. Los

porcentajes calculados de los análisis dan una proporción de 70% de células endoteliales frente a 30% de células de Kupffer marcadas.

Para demostrar la especificidad del inmunomarcaje se prepararon suspensiones puras de Kc y Ec mediante elutriación. Los ensayos demostraron una elevada especificidad para las Kc, no detectándose fluorescencia por citometría en suspensiones de células endoteliales puras tratadas con ED1-PE.

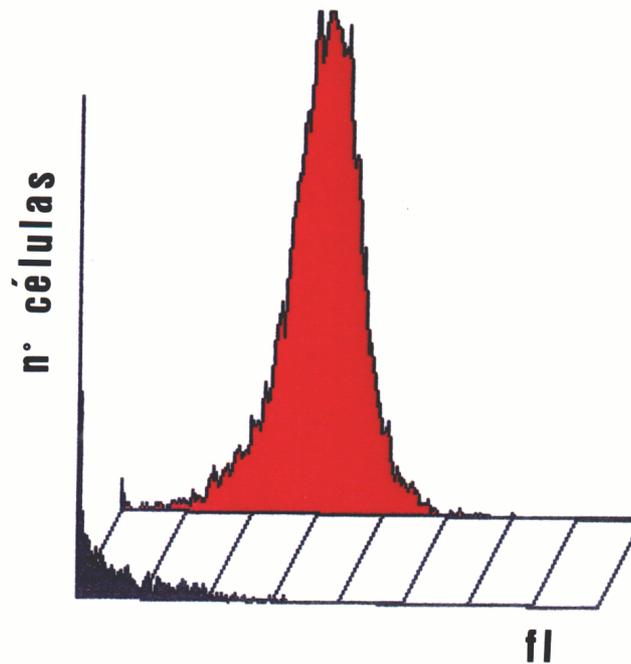


Figura IV-20: Caracterización de las células de Kupffer por inmunofluorescencia y citometría de flujo. Representación del número de células frente a la intensidad de fluorescencia emitida a 575nm de células no tratadas (negro) y células tratadas (rojo) con el anticuerpo monoclonal ED1-PE específico para el reconocimiento de macrófagos de rata.

En la Figura IV-20 se observa que las células de Kupffer no tratadas con el anticuerpo, no emiten fluorescencia significativa a la longitud de onda estudiada. Paralelamente se representa la fluorescencia emitida por las células de Kupffer tratadas con ED1-PE, comprobándose que existe una única población celular, reconocida específicamente por dicho anticuerpo.

IV.3.2.2. CÉLULAS EN CULTIVO. CARACTERIZACIÓN MEDIANTE MICROSCOPIA ÓPTICA Y CONFOCAL

Las células sinusoidales deben mantenerse un mínimo de 48h para formar una monocapa laxa, fuertemente adherida al sustrato, las células de Kupffer mantienen una morfología típica de células macrofágicas con abundancia de pseudópodos, las células endoteliales presentan el

citoplasma muy aplanado y *fenestrae* (Figura IV-21, Figura IV-22, Figura IV-23). Las condiciones de cultivo específicas permiten la utilización de los cultivos de células sinusoidales 15 días después de su aislamiento, comprobándose que, a estos tiempos, las células tienen una viabilidad y funcionalidad óptimas.

Las células de Kupffer responden a la endotoxina modificando su morfología de forma semejante a las células parenquimatosas pero son muy sensibles a dosis bajas (10µg/ml) y tiempos cortos de exposición (Figura IV-24)^{43,138}.

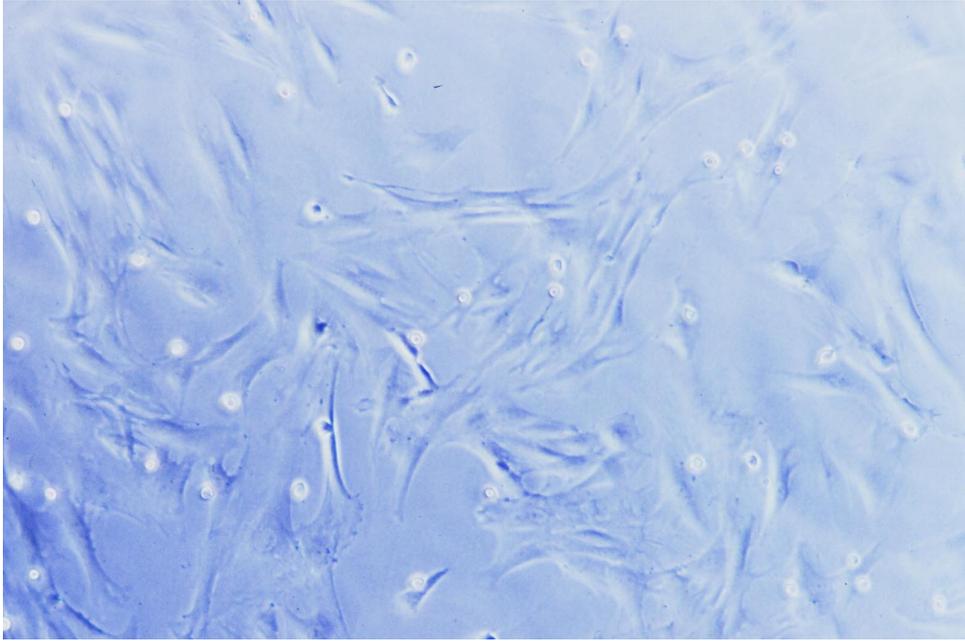


Figura IV-21: Cultivo de células sinusoidales enriquecido en células de Kupffer. Micrografía óptica en contraste de fases (48h)(x1000).

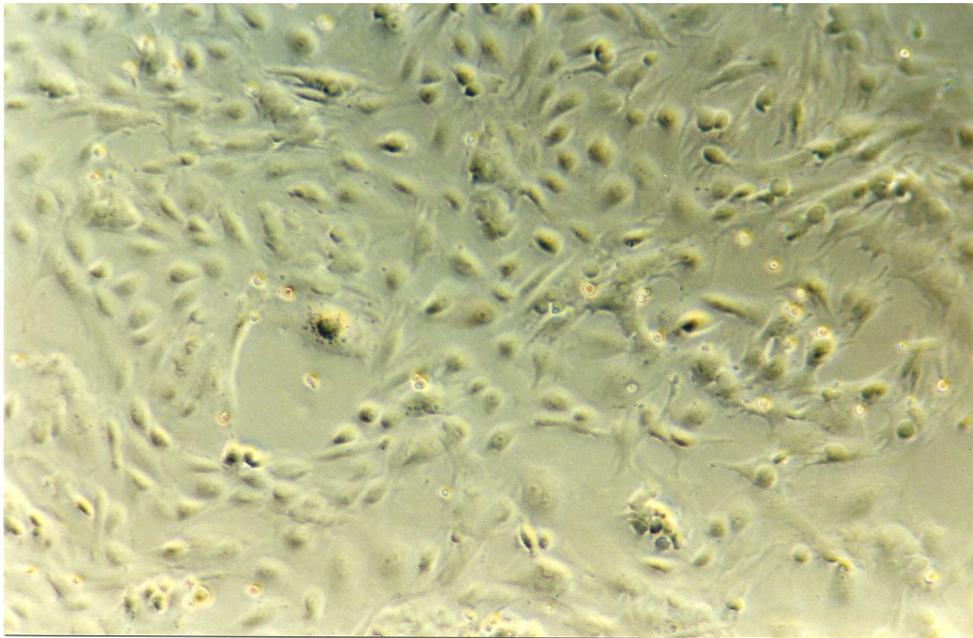


Figura IV-22: Cultivo de células sinusoidales enriquecido en células Kupffer. Micrografía óptica en campo claro (48h)(x1000)

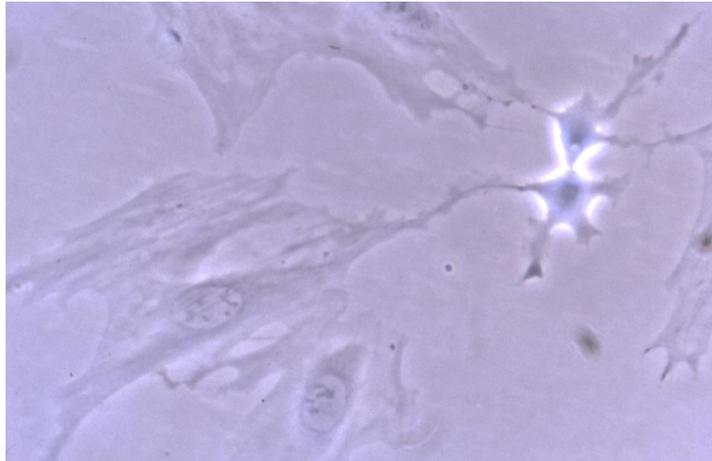


Figura IV-23: Cultivo de células sinusoidales enriquecido en células de Kupffer. Detalle de células en división.
Micrografía en contraste de fases (48h)(x2000)

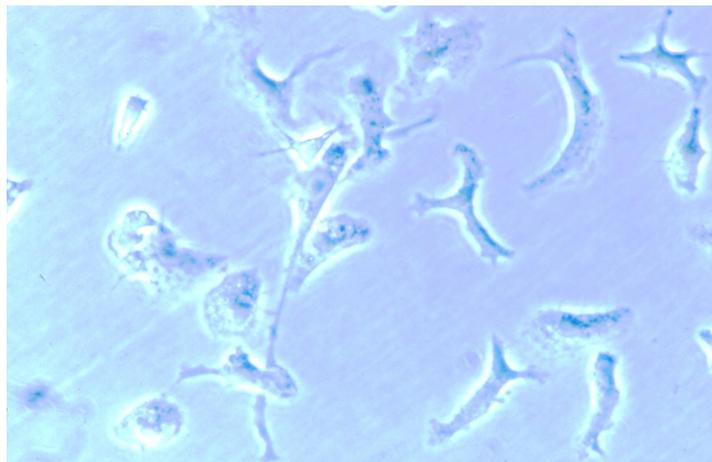


Figura IV-24: Cultivo de células sinusoidales enriquecido en células de Kupffer, tratado con LPS 100µg/ml, 5min.
Micrografía óptica en contraste de fases (48h)(x2000)

IV.3.2.2.1. Inmunomarcaje de las Células de Kupffer con ED1/ED2-PE

El marcaje de las células de Kupffer con anticuerpos unidos a sondas fluorescentes permiten identificar las células de Kupffer específicamente en los cultivos de las células sinusoidales (Figura IV-25, Figura IV-26)

El número de células marcadas respecto al total se mantiene aproximadamente en el 50%. Las células presentan una morfología redondeada y compacta. El éxito del marcaje demuestra que las células de Kupffer en cultivo mantienen marcadores específicos como la proteína CD11 a la que se une el anticuerpo utilizado.



Figura IV-25: Micrografía confocal de cultivos de células sinusoidales. La fluorescencia roja se debe la ficoeritrina unida al anticuerpo ED2 (x800)

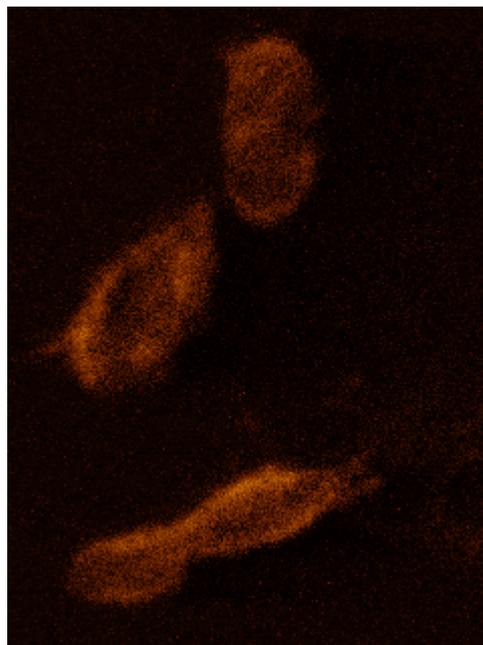


Figura IV-26: Micrografía confocal de cultivos de células sinusoidales. La fluorescencia roja se debe la ficoeritrina unida al anticuerpo ED2 (x3000)

IV.3.2.2.2. Contenido Intracelular de Especies Reactivas de Oxígeno.

En el metabolismo basal de todas las células se produce la reducción incompleta de moléculas de O_2 y la formación de radicales O_2^- . Estos radicales provocan la oxidación de la sonda DCFH que rinde un compuesto fluorescente.

En la Figura IV-27, la Figura IV-28 y la Figura IV-29 se observan dos tipos celulares diferenciados claramente tanto por su morfología como por la intensidad de la fluorescencia. Las células redondeadas y compactas corresponden a las células de Kupffer tal como se ha demostrado (IV.3.2.2.1 Inmunomarcaje de las Células de Kupffer con ED1/ED2-P). A pesar de no haber sido estimuladas muestran unos niveles de fluorescencia, es decir, niveles de especies oxidantes, claramente mayores que las células endoteliales. Esto concuerda con su función específica de defensa antimicrobiana constituyendo la liberación de radicales libres uno de sus mecanismos.

Se ha descrito que en las células de Kupffer, la inducción por LPS de la regulación positiva del transportador de glucosa GLUT1 y de la glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa (G6PD), junto con la SOD constitutiva y la ausencia de regulación positiva de Se-GPx, apoyan el hecho de que estas células poseen una capacidad elevada de producción de superóxido y peróxido de hidrógeno, lo cual concuerda con su función de eliminación bacteriana³⁸¹. Todas las principales enzimas del metabolismo de las ROS (GPx, GR, Cat, SOD, NADPH oxidasa, NOS) dependen directa o indirectamente del NADPH, que se produce por el ciclo de las pentosas. Mientras que en las Kc los productos de la actividad G6PD están destinados principalmente para la producción aumentada de $\cdot O_2^-$, H_2O_2 y NO, en las Ec, este patrón resulta en el aumento de la capacidad detoxificadora de ROS³⁸². En estas células el LPS estimula la expresión génica del transportador GLUT1, G6PD, Mn-SOD, CuZn-SOD y Se-GPx que representan un importante mecanismo para acelerar la eliminación de ROS liberados por las Kc³⁸³. Estos hechos sugieren la existencia de un equilibrio oxidativo intercelular entre las Kupffer prooxidantes y las endoteliales antioxidantes en el hígado³⁸².

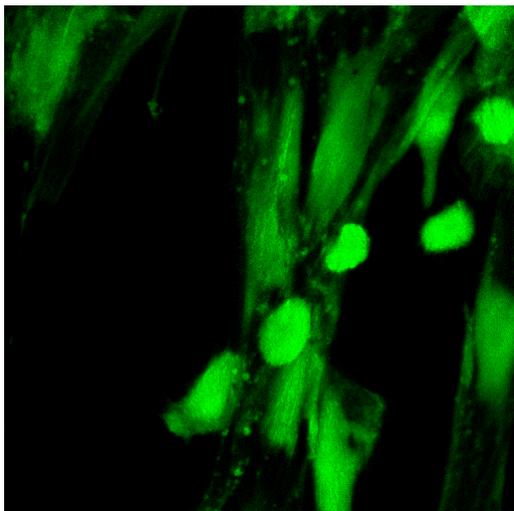


Figura IV-27: Micrografía confocal de células sinusoidales en presencia de la sonda DCFH (x1400)

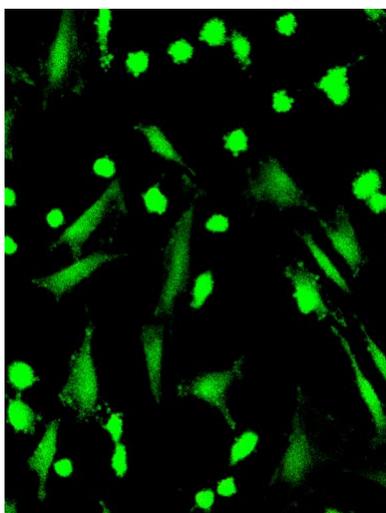


Figura IV-28: Micrografía confocal de células sinusoidales en presencia de la sonda DCFH (x600)

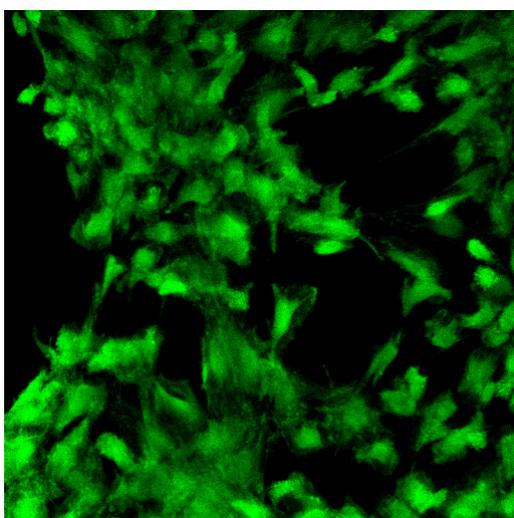


Figura IV-29: Micrografía confocal de células sinusoidales en presencia de la sonda DCFH (x800)

IV.3.3. CO-CULTIVO DE CÉLULAS PARENQUIMATOSAS CON CÉLULAS SINUSOIDALES

Las células sinusoidales y las parenquimatosas interactúan de diferentes maneras, utilizando varios mediadores solubles. Las sinusoidales pueden influir en el metabolismo de las células parenquimatosas a través de la producción de citoquinas inflamatorias. Las células parenquimatosas activadas por estas citoquinas producen, entre otros metabolitos, NO que interviene en la respuesta inflamatoria de las células de Kupffer³⁸⁴.

Estos antecedentes sugieren la importancia de buscar nuevos modelos experimentales que complementen los estudios de cultivos puros y supongan un paso intermedio entre estos y la situación *in vivo*. Los co-cultivos con membranas *Transwell*[®] son un modelo muy interesante ya que permite una comunicación entre dos poblaciones celulares independientes a través de la difusión de mediadores por el medio de cultivo que baña ambas poblaciones simultáneamente. Este modelo hace posible, por ejemplo, estudiar los efectos de la comunicación intercelular entre células sinusoidales activadas con LPS sobre Pc no activados ya que, antes y después del experimento, se pueden manipular ambas poblaciones celulares independientemente.

Las células parenquimatosas son cultivadas durante 24h sobre membranas de co-cultivo, que, únicamente durante el tratamiento, son situadas en el mismo medio que las células sinusoidales. De esta manera se estudia el efecto de la endotoxina simultáneamente sobre las células parenquimatosas co-cultivadas con células sinusoidales, aproximándose a la situación *in vivo*. Con este modelo también es posible estudiar de forma independiente el papel de los mediadores liberados en respuesta a la endotoxina pero en ausencia de ésta. Para ello se tratan las células sinusoidales (15min, 120min) con LPS, y tras retirarlo, se co-cultivan con células parenquimatosas 30 ó 60min en medio fresco y se realizan las medidas de los diferentes parámetros a estudiar.

IV.3.3.1. LIBERACIÓN DE LACTATO DESHIDROGENASA AL MEDIO

Con el fin de comprobar el efecto del co-cultivo de células sinusoidales y células parenquimatosas sobre la integridad de la membrana celular se valora la cantidad de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) en el medio de cultivo. En la Figura IV-30 se representan los resultados.

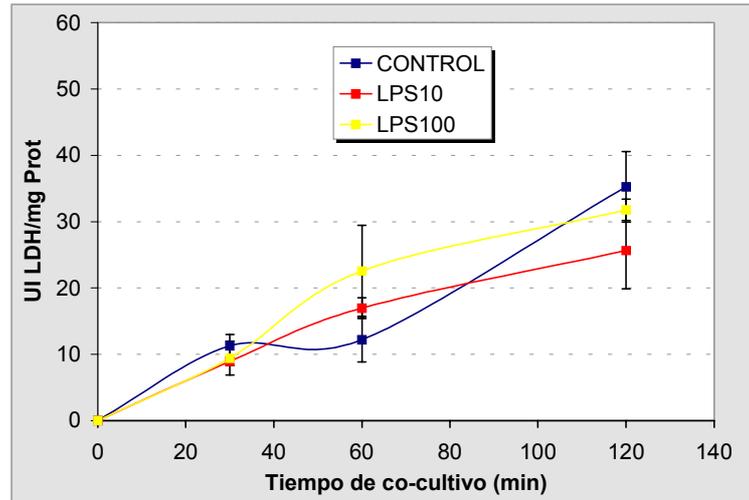


Figura IV-30: Valoración de LDH en el medio de co-cultivos de células sinusoidales y células parenquimatosas.

La Figura IV-30 nos demuestra que el LPS no es tóxico a los tiempos y dosis estudiados, incluso parece proteger a las células del estrés producido durante el cambio de medio, aunque a la dosis 10µg LPS /ml este efecto de protección no es significativo. Este efecto podría correlacionarse con la protección por LPS descrita ante radiaciones o hiperoxia (Tabla I-2).

IV.3.3.2. *CONTENIDO INTRACELULAR DE GLUTATIÓN*

Dado que uno de los objetivos del presente estudio es conocer el efecto del LPS sobre la regulación del sistema glutatión en las células parenquimatosas, es importante saber si este sistema está regulado por mediadores liberados de células sinusoidales como lo es la síntesis de proteínas³⁸⁵ o la inducción de iNOS³⁸⁶.

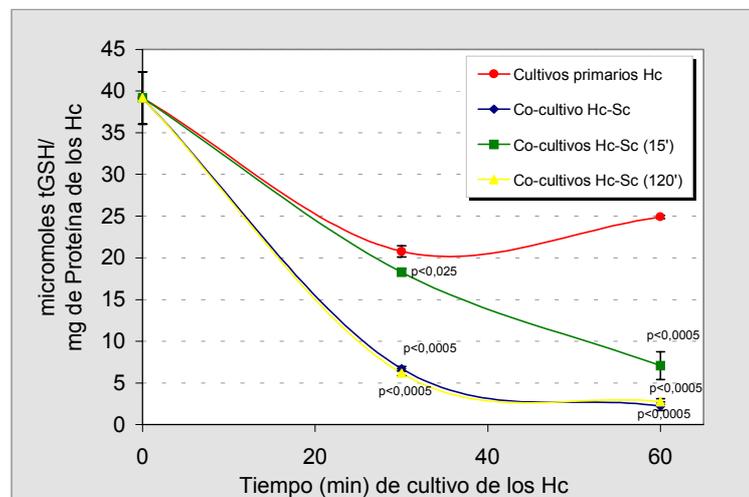


Figura IV-31: Contenido intracelular de glutatión de células parenquimatosas co-cultivadas con células sinusoidales en condiciones basales y a diferentes tiempos. Las células sinusoidales son pretratadas con medio control 0, 15 ó 120min. Tras retirar este medio se realiza el co-cultivo con las células parenquimatosas.

En la Figura IV-31 se observa cómo el co-cultivo de células parenquimatosas con células sinusoidales provoca una disminución drástica en los niveles de tGSH de los primeros. La desviación en el comportamiento de los co-cultivos Pc-Sc (15') puede deberse a la cercanía de los cambios de medio efectuados.

IV.3.4. CÉLULAS PARENQUIMATOSAS EN CULTIVO TRATADAS CON SOBRENADANTES DE CÉLULAS SINUSOIDALES. CONTENIDO INTRACELULAR DE GLUTATIÓN

Como se ha descrito en los apartados anteriores la interacción entre los distintos tipos celulares hepáticos es muy importante en la respuesta ante el LPS. Sin embargo Clemens y col³⁸⁷ hacen notar que la estricta organización celular hepática provoca ciertas restricciones en los tipos de comunicación. Específicamente, tanto el compartimento vascular como el perivascular están sujetos a un flujo convectivo en la dirección periportal a perivenosa, la comunicación vía mediadores solubles sólo afecta a las células que se encuentren en la dirección del flujo. Esta restricción puede moderarse por la conductancia debida a las uniones canaliculares intercelulares, que es difusiva en vez de convectiva, pero durante los estados inflamatorios estas comunicaciones canaliculares intercelulares están profundamente deprimidas vía regulación negativa de las subunidades polipeptídicas de los canales (conexinas). Por este motivo es interesante encontrar un modelo que nos permita abordar el estudio de forma complementaria a los co-cultivos. Se ha elegido la utilización de sobrenadantes de cultivos de células sinusoidales.

En la Figura IV-32 se representa el contenido de glutatión de Pc cultivados tratados con sobrenadantes control (sin ningún aditivo) de células sinusoidales. Se ha elegido como referencia la evolución del contenido de glutatión de Pc cultivados con medio fresco. La siguiente serie corresponde al tratamiento 15min con medio control incubado previamente con una monocapa de células sinusoidales. La última serie representa los valores obtenidos si la pre-incubación del medio se prolonga hasta 120min.

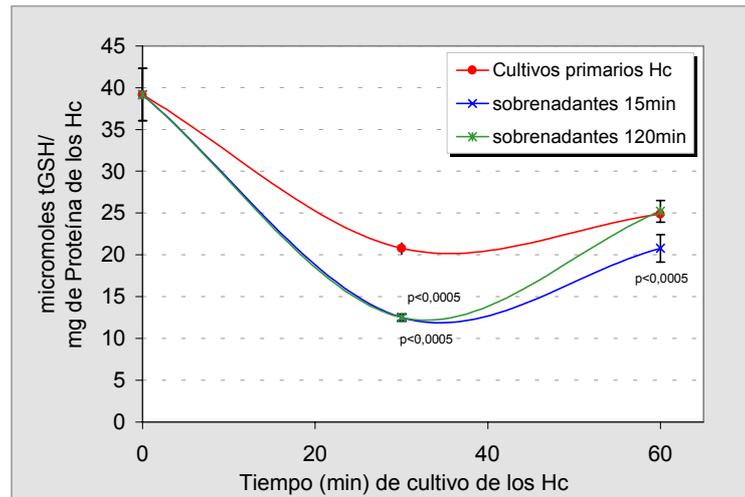


Figura IV-32: Efecto de sobrenadantes control de células sinusoidales sobre el contenido en tGSH de Pc cultivados

La Figura IV-32 demuestra que los mediadores liberados por las células sinusoidales en estado basal regulan el contenido en glutatión de las células parenquimatosas. Esta regulación se caracteriza por una disminución significativa del contenido de GSH en los Pc cultivados. Estos mediadores son de liberación rápida dado que medios pre-incubados con las células sinusoidales 15min ya los contienen. Sin embargo, su acción parece menos duradera en los medios pre-incubados 120min, ya que a 60min de incubación, los Pc recuperan los valores control de GSH.

De estos resultados se deduce que, si bien las Sc controlan en estado basal los niveles de GSH en las células parenquimatosas, la retroalimentación generada por éstos intensifica el control negativo de las células sinusoidales sobre el GSH como demuestran los resultados obtenidos con co-cultivos.

IV.4. ACCIÓN DIRECTA DEL LPS SOBRE SISTEMAS ANTIOXIDANTES EN CÉLULAS PARENQUIMATOSAS EN CULTIVO

Como se ha observado en el Apartado IV.2.1, estudios previos realizados *in vivo*, mediante inducción del **shock endotóxico reversible** en rata, indican que se produce un incremento de la peroxidación lipídica en hígado durante la fase aguda del proceso y una disminución por debajo de los niveles control en la fase de recuperación⁴⁵ (Figura IV-4). El aumento de la peroxidación lipídica parece deberse, al menos en parte, a una acción directa de la endotoxina sobre las células parenquimatosas ya que el tratamiento *in vitro* de estas células en cultivo con la endotoxina produce el mismo efecto observado *in vivo*.

Las alteraciones estructurales y funcionales de la membrana plasmática producidas por el aumento de peroxidación lipídica^{45,118} suponen la distorsión de los gradientes transmembranales, una disminución de la fluidez^{104,116} y la alteración de mecanismos de transducción de señales^{105,106}, imprescindibles para el control del metabolismo celular. Puesto que el grado de lesión celular es el que determina la irreversibilidad del *shock*, en el presente trabajo se ha analizado el efecto del LPS sobre el contenido intracelular de glutatión en células parenquimatosas, para evaluar la capacidad de respuesta celular ante la producción de radicales libres desencadenada por la endotoxina.

Asimismo se ha estudiado la acción del LPS sobre las actividades glutatión reductasa y glutatión peroxidasa, enzimas implicadas en el mantenimiento de los niveles de GSH y la eliminación de peróxidos respectivamente. Estudios previos han demostrado que el tratamiento *in vitro* con LPS provoca aumentos en la actividad catalasa y cambios en la actividad SOD paralelos a los observados *in vivo*³⁸⁸.

IV.4.1. SISTEMA GLUTATIÓN

Para conocer el efecto directo de la endotoxina sobre el sistema glutatión de células parenquimatosas aisladas en cultivo se trataron estas células con LPS durante 30, 60 y 120min. Las dosis utilizadas han sido 10µg/ml y 100µg/ml. Los resultados se pueden observar en la Figura IV-33, la Figura IV-34 y la Figura IV-35.

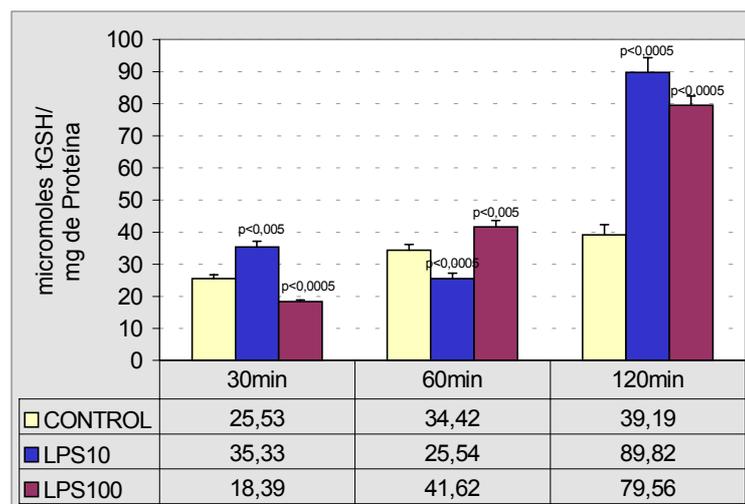


Figura IV-33: Acción directa de la endotoxina sobre el tGSH de Pc en cultivo primario de 24h

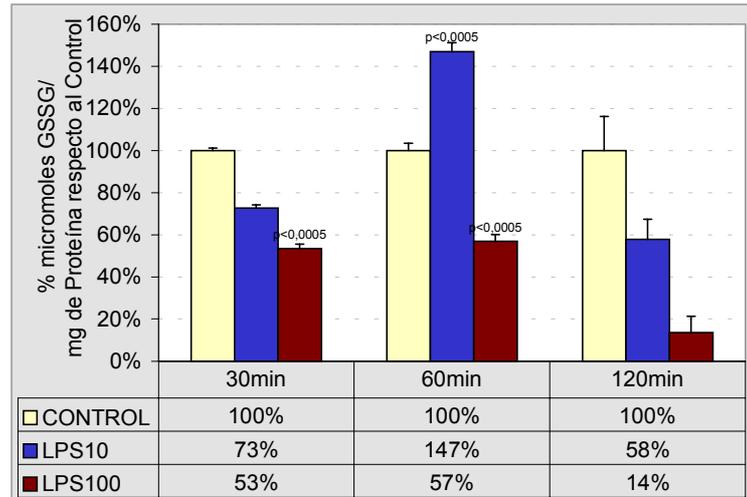


Figura IV-34: Acción directa de la endotoxina sobre el GSSG de Pc en cultivo primario de 24h

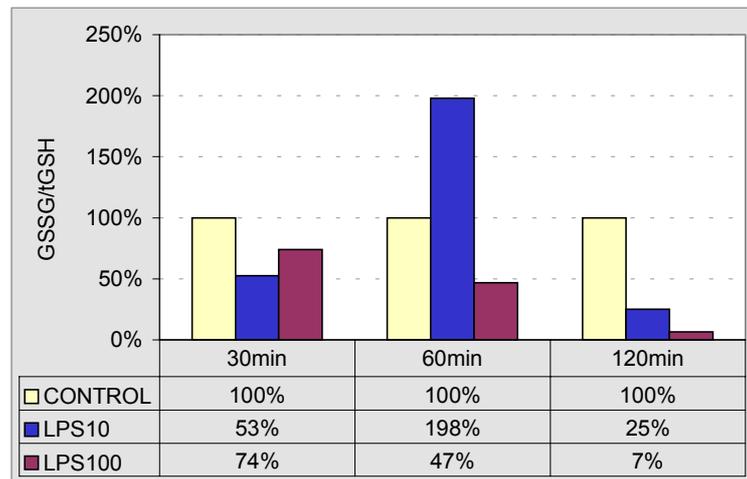


Figura IV-35: Acción directa de la endotoxina sobre la relación GSSG/GSH de Pc en cultivo primario de 24h

En la Figura IV-33 se observa cómo a 30min la dosis de 10µg LPS /ml produce un aumento que contrasta con el descenso producido por la dosis superior (100µg/ml). A 60min el patrón se invierte, induciendo un descenso la dosis de 10µg LPS/ml y un ligero aumento la de 100µg LPS/ml. Tras 120min de cultivo, con ambas dosis de LPS, se observa un aumento destacable de GSH intracelular que supera el 200% respecto del contenido en GSH de células parenquimatosas control.

En las mismas muestras de Pc se procedió a valorar el contenido en GSSG, parámetro que indica la presencia de agentes oxidantes en el interior de la célula. En la Figura IV-34 se representa dicho valor, en porcentaje respecto a cultivos control, cuyo contenido en GSSG varía entre 4 y 10µmoles/mg de proteína. Se observa un descenso relativo al control, para ambas dosis, en el contenido de GSSG a todos los tiempos, con la excepción de la dosis 10µg LPS/ml a

60min. En este caso el tratamiento produce un aumento de casi el 200%. A 120min no se puede establecer la significatividad dada las discrepancias, evaluadas por el índice de Fisher, en las desviaciones estándar de los grupos de datos.

Para evaluar el estrés oxidativo celular en estas condiciones se utiliza el índice GSSG/tGSH (Figura IV-35). A 30min la endotoxina no produce estrés oxidativo, para ninguna de las dosis empleadas. La dosis 100µg LPS/ml no induce estrés oxidativo significativo en ninguno de los tiempos estudiados, desplazando el estado redox de la célula hacia la capacidad reductora. Sin embargo, la dosis de 10µg LPS/ml sí induce un gran estrés oxidativo tras 60min de tratamiento, aunque a 120min desplaza, como la dosis superior, el equilibrio hacia la capacidad reductora.

La discrepancia entre las dos dosis puede ser debida simplemente a un desfase en el tiempo de acción de cada una. Observando las gráficas se puede apreciar cómo el comportamiento ante la dosis de 100µg LPS/ml parece ser un preludio del comportamiento 10µg LPS/ml en el siguiente periodo.

De los resultados obtenidos *in vitro* se deduce que la endotoxina tiene un efecto bifásico en la cantidad de glutatión intracelular, tendiendo a reducirlo en los primeros minutos pero aumentándolo tras las primeras dos horas. Se puede concluir que contribuye directamente al aumento de glutatión detectado *in vivo*, a partir del establecimiento de la fase aguda (5h). Suntres y Shek²⁸⁸ analizaron el contenido hepático de glutatión tras 2h de tratamiento, en un modelo de **shock endotóxico reversible**, encontrando un descenso frente a animales control. El nivel del GSH también se encuentra reducido en Pc en cultivo, aisladas de ratas infundidas durante 30min con endotoxina³⁸⁹. Por lo tanto los descensos descritos para Pc cultivadas en una primera fase, también se relacionan con los datos hallados *in vivo* a tiempos cortos. Por otro lado Tian y col (1997) demostraron que la transcripción de la γ -glutamilcisteína sintetasa (γ -GSC-HS), enzima limitante en la síntesis de novo de GSH, está regulada por reducción del contenido de GSH. En estas condiciones existe un aumento en la transcripción tanto de la subunidad catalítica³⁹⁰ como de la reguladora, que promueven un aumento en la concentración de GSH. Por lo tanto la reducción inicial en el contenido de GSH intracelular es el hecho desencadenante del aumento posterior de sus niveles.

Sin embargo, ni la disminución en el contenido de GSSG ni del índice GSSG/tGSH encuentran paralelismo *in vivo*. Estos hechos no se pueden justificar como acciones directas de la

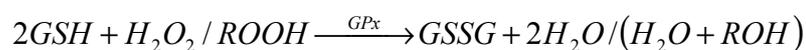
endotoxina, sino como efecto de mediadores del *shock*. El descenso de la relación de estrés provoca una desactivación de las enzimas de la ruta gluconeogénica reguladas por equilibrio redox³⁵² lo que implica la inhibición de la formación *de novo* de glucosa. Este fenómeno es refutado por los resultados de Pagani y col¹⁰⁶. Estos autores detectaron una reducción de la síntesis de glucosa de células parenquimatosas en suspensión, aisladas de ratas ayunadas, tratadas con LPS. Este efecto constituye una acción nociva de la acción directa del LPS sobre las células y pone de manifiesto que el aumento del índice GSSG/GSH *in vivo* requiere la mediación de algún mediador.

La endotoxina se une rápidamente a las mitocondrias³⁷⁹ alterando las funciones de membrana^{42,104-106,139}, particularmente las cadenas oxidativas³⁸⁰, provocando peroxidación lipídica^{45,138}. Sin embargo, se comprueba en los presentes resultados que el tratamiento con la endotoxina *in vitro* provoca un aumento muy notable de la capacidad reductora intracelular, disminuyendo el contenido de GSSG (producto de la presencia de radicales libres) y del índice de estrés oxidativo intracelular. Numerosos estudios demuestran la capacidad del GSH de reducir la lipoperoxidación por sí sólo^{283,391,392}. Esta actividad puede ejercerse por la unión directa del GSH a grupos tiólicos de diversas proteínas o bien a través de mecanismos enzimáticos como la glutatión reductasa o la glutatión peroxidasa. La terminación de la cadena peroxidativa por la unión del GSH a restos radicales justificaría el descenso en el contenido total de GSH sin aumento del GSSG ni del índice GSSG/tGSH. Halliwell y Gutteridge³⁹³, describen que hasta un tercio del GSH total puede estar presente como disulfuros mixtos con otros compuestos que contienen grupos -SH, tales como la cisteína, el coenzima A, y los grupos tiólicos de las cisteínas de diversas proteínas.

Sin embargo una alteración en los sistemas enzimáticos que implican al GSH, glutatión reductasa y glutatión peroxidasa, también podrían dar cuenta de los efectos observados.

IV.4.2. GLUTATIÓN PEROXIDASA (SE-GPX)

La glutatión peroxidasa cataliza la neutralización de restos radicales por GSH, dando como resultado GSSG y agua.



Ecuación IV-3: Reacción general catalizada por la GPx.

El intermediario clave en la peroxidación lipídica son los hidroperóxidos lipídicos generados por una reacción en cadena iniciada por el ion superóxido. En condiciones basales la eliminación de estos hidroperóxidos por la glutatión peroxidasa constituye un mecanismo de protección contra la peroxidación. La inactivación de la peroxidasa conduce a un aumento de los hidroperóxidos lipídicos incrementando así la tasa de peroxidación^{394,395}.

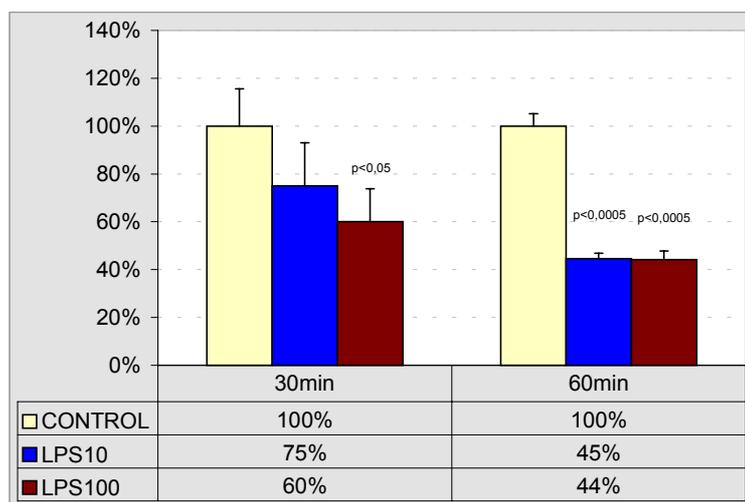


Figura IV-36: Acción directa del LPS sobre la actividad de la Se-GPx de Pc cultivadas.

En la Figura IV-36, se han representado los resultados obtenidos al estudiar el efecto del LPS sobre la actividad Se-GPx de Pc cultivadas. Los valores control oscilaron entre 30-56 UI/mg Prot/ml. Todas las dosis de LPS utilizadas provocan una disminución de la actividad GPx a 30min, dependiendo dicho efecto de la concentración de endotoxina. Esta reducción de la actividad es significativa para la dosis de 100µg LPS/ml. A los 60min el efecto de ambas dosis es el descenso significativo de la actividad a menos de la mitad de la actividad control.

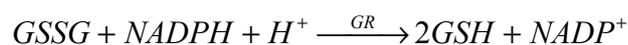
Este trabajo demuestra que el LPS inhibe directamente la actividad GPx en cultivos primarios de células parenquimatosas. Este resultado coincide con los datos *in vivo* de Popkova y col.³⁹⁶ que utilizando un modelo experimental con endotoxina de *Salmonella*, observaron que la actividad de la GPx en el hígado disminuye tras 1h de acción de la endotoxina.

Los resultados expuestos justifican los aumentos detectados en MDA en estudios previos con células parenquimatosas cultivadas. Anteriormente se mencionaba la capacidad del GSH libre de reaccionar directamente con los lipoperóxidos. La terminación de la cadena peroxidativa por la reacción directa del GSH con restos radicales explicaría el descenso en el contenido total de GSH sin aumentar ni el GSSG ni la relación de estrés oxidativo. Numerosos estudios³⁹⁷ sugieren la existencia de una glutatión peroxidasa no dependiente de Se que actúa sobre

hidroperóxidos orgánicos pero no sobre el H₂O₂. Esta actividad parece deberse a algunas glutatión-S-transferasas implicadas en la conjugación del GSH con xenobióticos. El balance entre SePx y peroxidadas no dependientes de Se varía en diferentes tejidos. En el hígado de rata puede llegar a constituir el 35% de la actividad peroxidasa total, aunque estos valores encontrados varían con el contenido de Se en la dieta de los animales³⁹⁷. Es posible que la inactivación de la SeGPx promueva un aumento de la actividad GSH peroxidasa de las glutatión-S-transferasas antes mencionadas, y que éstas terminen la cadena peroxidativa conjugando una molécula de GSH con el resto radical. De esta manera se justificarían los resultados observados sobre el sistema glutatión, disminución del contenido total de GSH, sin aparición de GSSG, y control de la tasa de peroxidación. De hecho, Suntres y Shek²⁸⁸, observaron *in vivo* que el pretratamiento de las ratas con liposomas de alfa-tocoferol, reforzando la capacidad antioxidante de las membranas, confería protección contra el LPS no sólo bajando los niveles de peroxidación lipídica, sino también aumentando los de glutatión. Esto indica que efectivamente el GSH está implicado en el mantenimiento de la integridad de la membrana, y evita que la peroxidación afecte al citosol.

IV.4.3. GLUTATIÓN REDUCTASA (GR)

El reciclado enzimático del GSSG a GSH es de gran importancia para el mantenimiento de los mecanismos antioxidantes (GPx), el metabolismo de xenobióticos (glutatión-transferasas) y el metabolismo de la glucosa. La glutatión reductasa cataliza la siguiente reacción:



Ecuación IV-4: Reacción catalizada por la glutatión reductasa

Una alteración en la actividad glutatión reductasa podría provocar la excreción del GSSG con la bilis justificándose los resultados obtenidos. En el presente trabajo se ha determinado el efecto del LPS sobre dicha actividad en las condiciones descritas en Materiales y Métodos.

Los valores de los controles oscilan entre 28,7 y 42,3UI/mg Prot/ml. La endotoxina ejerce a 30min un efecto inverso, según la dosis utilizada. La dosis de 10µg LPS/ml provoca un aumento de la actividad de la enzima de casi un 149%, mientras que la dosis superior de 100µg LPS/ml reduce esta actividad hasta el 62%. A 60min las variaciones ya no son significativas. Con el tiempo la tendencia de ambas dosis es el retorno a los valores control, a 120min ninguna de las dos modifica la actividad GSSG-reductasa significativamente.

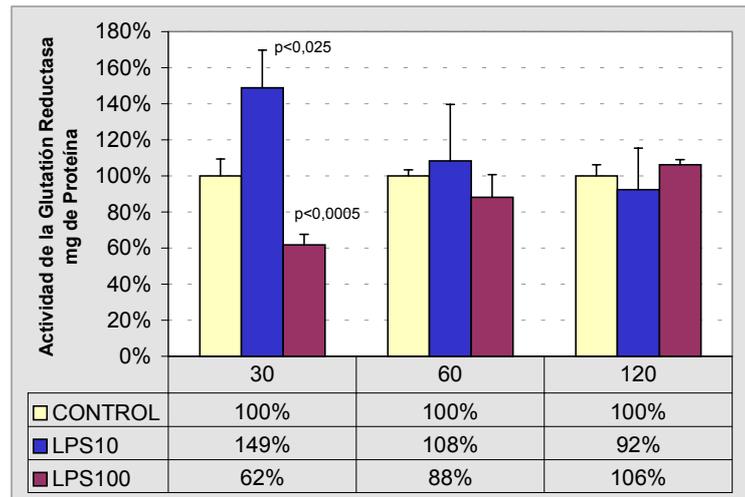


Figura IV-37: Acción del LPS sobre la actividad GR en cultivos primarios de célula parenquimatosas

Observando simultáneamente la actividad GR (Figura IV-37) y el contenido tGSH en las mismas condiciones (Figura IV-33) a 30min se puede deducir que el aumento en el tGSH producido por 10µg LPS/ml está directamente relacionado con el reciclado de GSSG, si bien el descenso observado en la concentración de este ditiol no es significativo. Sin embargo, al aumentar la dosis, 100µg LPS/ml, este reciclado se inhibe. Sakaguchi y col³⁹⁸ observaron una disminución de la actividad GR tras la intoxicación de ratones con endotoxina de *Salmonella*. Este efecto también se ha observado en otros modelos de daño por radicales libres que provocan peroxidación lipídica³⁹⁹, si bien no se ha descrito su mecanismo.

La GR responde muy rápidamente al desequilibrio en el sistema GSH tras la acción del LPS aunque, una vez recuperados los niveles de tGSH (Figura IV-33), vuelve a la actividad normal, lo que permite concluir que no está implicada en la modulación del sistema glutatión por efecto del LPS *in vitro*. El mantenimiento de la actividad de la GR en valores control no favorece la exportación del GSSG con la bilis y por tanto no parece ser éste el mecanismo que justifique la reducción en sus niveles observada con LPS.

IV.5. ACCIÓN DE CITOQUINAS SOBRE SISTEMAS ANTIOXIDANTES EN CÉLULAS PARENQUIMATOSAS EN CULTIVO

La acción directa del LPS justifica el aumento de los niveles de glutatión descritos *in vivo*. Sin embargo también produce un descenso en los niveles de GSSG y en la relación GSSG/GSH contradictoria con lo encontrado *in vivo*. Estos dos efectos deben estar, por tanto, regulados por mediadores de la inflamación. Según los estudios realizados por diversos autores, la administración de IL-1β o TNF-α a animales de experimentación sanos reproduce muchas de

las alteraciones presentes en el **shock endotóxico**^{154,400-403}. Estas interleuquinas se han presentado como los mediadores más relevantes del *shock*. Por este motivo se ha estudiado su acción sobre el sistema GSH en las mismas condiciones *in vitro* que las empleadas con la endotoxina. Se han escogido dos dosis, 5ng/ml de TNF- α (3×10^2 U/ml) y 25 UI/ml de IL-1 β , cercanas a las presentes en el plasma de animales afectados⁴⁰⁴⁻⁴⁰⁸ y una dosis más elevada de ambas, 10ng/ml y 50 UI/ml, respectivamente. Estas dosis son aún fisiológicas^{409,410} pero permiten extremar las condiciones de exposición de las células. Las referencias mencionadas anteriormente establecen el máximo de estas interleuquinas en el plasma entre los 90-120min tras la administración de la endotoxina, por lo tanto la selección de un solo tiempo corto de 30min permite comparar estos resultados a las alteraciones que ocurren en la instauración de fase aguda del **shock endotóxico reversible**.

IV.5.1. SISTEMA GLUTATIÓN

Los valores de los controles se encuentran entre 25,5 y 39,2 μ moles/mgProt. Como se puede observar en la Figura IV-38, a tiempos cortos las citoquinas hacen disminuir significativamente el contenido en glutatión de las células parenquimatosas. En cuanto al GSSG y la relación GSSG/tGSH observamos un comportamiento diferente según la citoquina y la cantidad utilizada. La IL-1 β a dosis bajas apenas reduce el contenido de GSSG frente a los controles, resultando en un incremento notable del índice de estrés oxidativo. La dosis alta de IL-1 β produce, sin embargo, un descenso en el contenido de GSSG de forma que el índice de estrés es del mismo orden que en los controles. La dosis inferior de TNF- α tiene un efecto similar no modificando el estado redox de la célula, a pesar de reducir el contenido total del tripéptido. Sin embargo, la dosis alta de TNF- α produce un descenso muy pronunciado en el GSSG, de forma que, a pesar del descenso en el tGSH, la relación de estrés está reducida en casi 2/3 respecto del control.

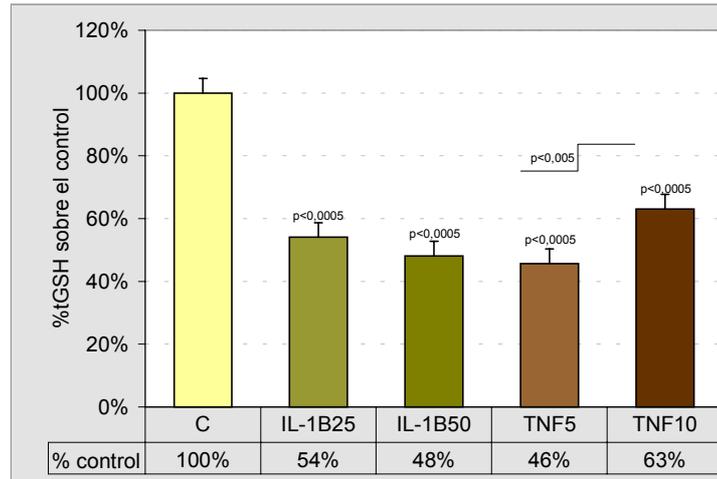


Figura IV-38: Acción directa de IL-1 β y TNF- α sobre el contenido en tGSH de Pc cultivadas 30min

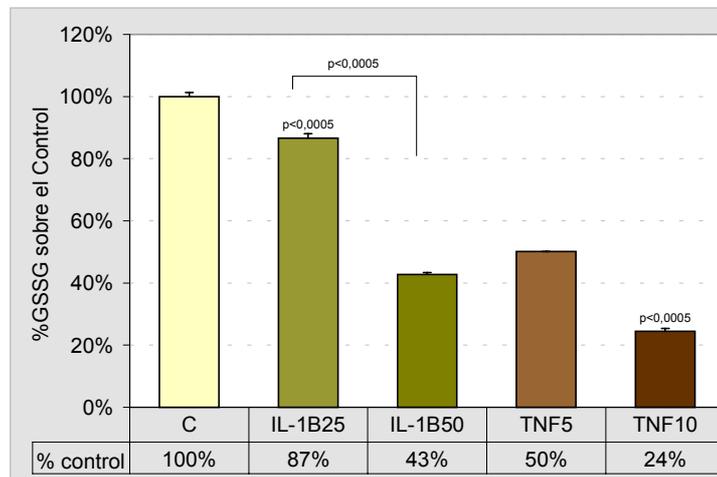


Figura IV-39: Acción directa de IL-1 β y TNF- α sobre el contenido en GSSG de Pc cultivadas 30min.

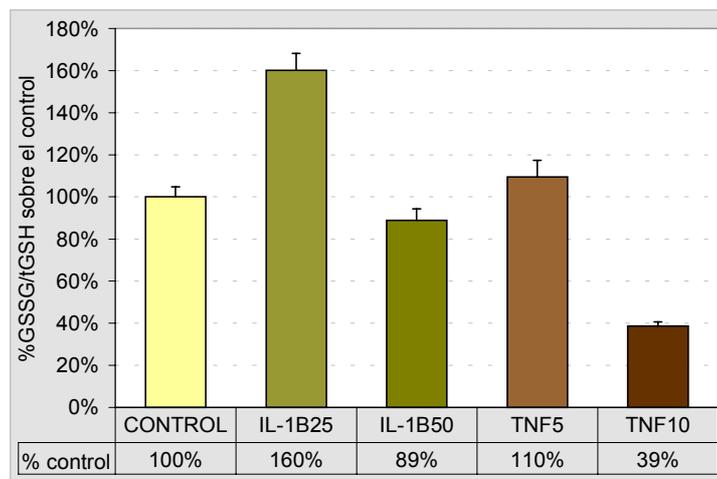
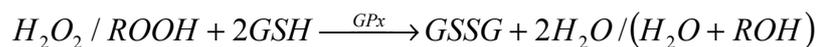


Figura IV-40: Acción directa de IL-1 β y TNF- α sobre el índice GSSG/tGSH de Pc cultivadas 30min.

Otros autores han descrito variaciones de GSH provocadas por TNF en cultivos de células parenquimatosas^{411,412}. Adamson y Billings relacionan la disminución de GSH producida por TNF con un aumento en la secreción de GSSG⁴¹², lo que puede justificar el descenso en la relación GSSG/tGSH hallada en este trabajo. Estos resultados sugieren que la relación GSSG/tGSH no refleja el estrés oxidativo generado por el TNF. Sus efectos no se correlacionan con lo encontrado *in vivo*, por lo que esta citoquina no parece estar implicada en la regulación del sistema glutatión. La IL-1 β reduce significativamente el contenido de glutatión total en la célula lo que se puede considerar como observación indirecta de la inducción de especies oxidantes. Los efectos prooxidantes por parte de esta interleuquina podrían estar relacionados con su capacidad de activar iNOS en células parenquimatosas^{413,414}.

El descenso en el contenido total de GSH que, tanto el LPS a tiempos cortos como ambas citoquinas producen *in vitro*, podría estar relacionado con el efecto negativo que se les ha asignado en los procesos de *shock*. Dado que la exportación de GSH es un proceso cuya regulación depende, de forma significativa, de la tasa de síntesis de GSH³⁷⁷ es posible que ambas citoquinas tiendan a reducir los niveles del péptido en el espacio extracelular al disminuir su síntesis. Este hecho conduciría a un aumento del daño sistémico causado por la liberación masiva de ROS por parte de los leucocitos activados. Como se ha discutido en el apartado IV.2.1.1 el índice de estrés oxidativo modula importantes rutas metabólicas, entre las que cabe destacar la gluconeogénesis. La disminución en la relación GSSG/tGSH hallada en los resultados presentados justifica la inhibición *in vitro* de la gluconeogénesis en células parenquimatosas cultivadas descrita por Ceppy y Titheradge⁴¹⁴ utilizando TNF- α , IL-1 β y LPS. Por lo tanto ambas interleuquinas además de provocar una disminución importante en la capacidad tamponadora redox celular, contribuirían, junto con el LPS a inhibir la síntesis de glucosa.

IV.5.2. GLUTATIÓN PEROXIDASA



Ecuación IV-5: Reacción general catalizada por la GPx.

En la Figura IV-41, se han representado los resultados obtenidos al estudiar el comportamiento de la actividad glutatión peroxidasa frente a IL-1 β y TNF- α en células parenquimatosas cultivadas.

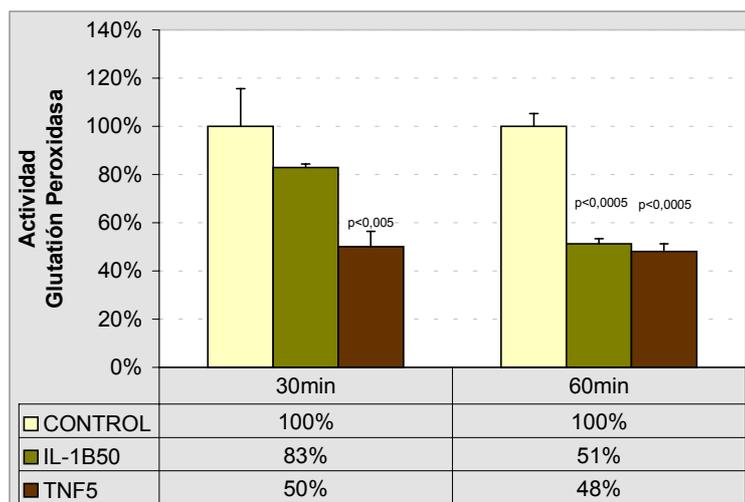


Figura IV-41: Acción directa de IL-1 β y TNF- α sobre la actividad de la Se-GPx de Pc cultivadas.

Los controles se situaron en valores entre 36 y 56 UI/mg Prot/ml. Todas las dosis de interleuquinas utilizadas provocan una disminución de la actividad GPx a 30min, si bien este efecto es desigual dependiendo del agente. Esta reducción de la actividad es significativa para el TNF 5ng/ml. A los 60min el efecto de todos los agentes es la reducción significativa de la actividad a la mitad de la actividad control.

Se ha demostrado que el LPS tiene un efecto directo *in vitro* sobre la actividad GPx en cultivos primarios de Pc Figura IV-36. Como puede deducirse de la Figura IV-41, las citoquinas TNF- α e Il-1- β potenciarían esta acción durante el **shock endotóxico**. Este resultado coincide con lo encontrado *in vivo* por Popkova y col³⁹⁶, que utilizando un modelo de endotoxemia con endotoxina de *Salmonella*, observaron que la actividad de la GPx en el hígado disminuye tras 30min o 1h de acción de la endotoxina.

IV.5.3. GLUTATIÓN REDUCTASA

La Figura IV-42 muestra los resultados obtenidos al estudiar el efecto de la IL-1 β y el TNF- α sobre la actividad glutatión reductasa (GR) de células parenquimatosas cultivadas.

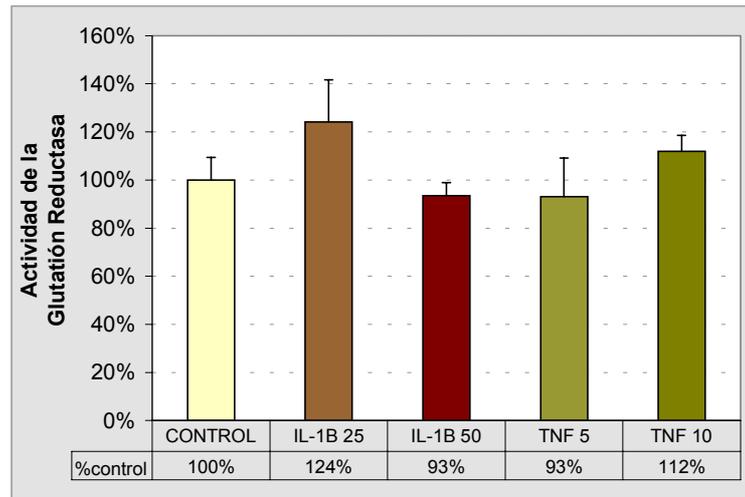


Figura IV-42: Acción directa durante 30min de IL-1 β y TNF- α sobre la actividad GR de células parenquimatosas cultivadas

Los valores de los controles oscilan entre 28,7 y 42,3UI/mg Prot/ml. La IL-1 β 25 UI/ml aumenta la actividad GR un 24% por encima de los controles, aunque la dosis de 50UI/ml no modifica apreciablemente la actividad. El TNF no modifica significativamente la actividad de la glutatión reductasa a ninguna de las dosis.

Sakaguchi y col³⁹⁸ observaron una disminución de la actividad GR tras la intoxicación de ratones con endotoxina de *Salmonella*. Este efecto ha sido también observado en otros modelos de daño por radicales libres que provocan peroxidación lipídica³⁹⁹. Los resultados recogidos en la Figura IV-42, indican que las interleuquinas estudiadas no son las responsables de la disminución hallada *in vivo*, al menos en las condiciones estudiadas.

IV.6. EFECTO DE LOS MEDIADORES LIBERADOS POR CÉLULAS SINUSOIDALES ACTIVADAS CON LPS SOBRE CÉLULAS PARENQUIMATOSAS EN CULTIVO

Las células sinusoidales que regulan de manera muy importante la función hepática, convierten al hígado en el mayor órgano del Sistema Retículo-Endotelial (RES) responsable de la respuesta inflamatoria inespecífica. El sistema RES tiene una importante acción paracrina sobre la función hepática. Durante la endotoxemia el LPS es retirado mayoritariamente del torrente circulatorio por las células de Kupffer produciéndose la liberación por estos macrófagos de mediadores de inflamación^{99,415-417}.

Knolle y col.²⁰⁰ destacan que las células no parenquimatosas (células de Kupffer, células endoteliales sinusoidales, células Ito y linfocitos asociados al hígado) interaccionan con las

células parenquimatosas y entre ellas mismas por mediadores solubles y contactos directos célula-célula. Para conocer en qué medida el sistema GSH está regulado por mediadores liberados por células sinusoidales activadas con LPS se utilizaron dos modelos distintos:

- El co-cultivo de células sinusoidales y parenquimatosas utilizando membranas de co-cultivo *Transwell*.
- La adición de sobrenadantes de células sinusoidales tratadas con LPS a cultivos puros de células parenquimatosas.

IV.6.1. EFECTO DEL LPS SOBRE EL CONTENIDO DE GSH DE CÉLULAS PARENQUIMATOSAS EN CO-CULTIVO CON CÉLULAS SINUSOIDALES

El contenido en glutatión de células parenquimatosas co-cultivadas con células sinusoidales en medios con diferentes dosis de endotoxina se representa en la Figura IV-43.

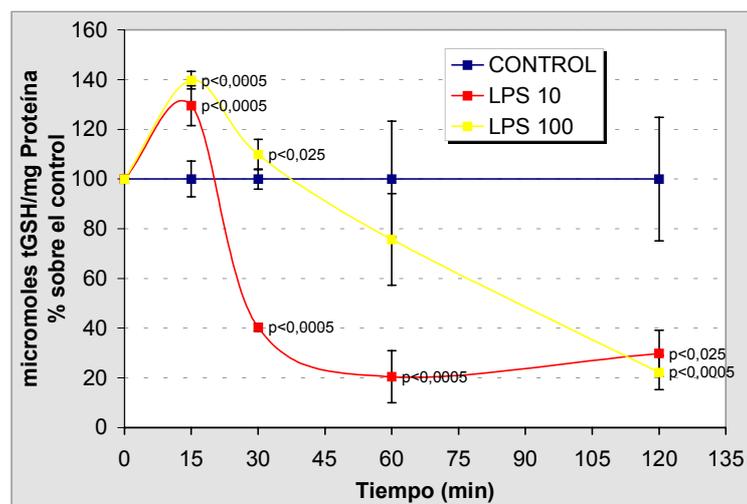


Figura IV-43: Efecto del LPS sobre el contenido en GSH de Pc co-cultivadas con células sinusoidales

Los niveles control han sido representados en la Figura IV-31. La dosis de 10 μ gLPS/ml provoca un aumento momentáneo significativo sobre el control tras 15min de la exposición al LPS. A los 30min se observa un brusco descenso al 40% de los niveles basales, manteniendo niveles entre el 20% y el 40% hasta los 120min. En cuanto a la dosis de 100 μ gLPS/ml se observa un aumento significativo a 15min ligeramente superior, entorno al 140%, sobre los niveles control. A partir de ese momento se produce una disminución hasta alcanzar niveles del 20% similares los de la dosis de 10 μ gLPS/ml. Sin embargo la disminución a lo largo del tiempo

de esta dosis superior es mucho más paulatina, manteniéndose a 30min todavía significativamente sobre los niveles control.

Se observa un claro comportamiento bifásico respecto a la endotoxina. Existe una activación inicial de la síntesis de glutatión que es inhibida fuertemente a tiempos más largos. Es la dosis inferior la que inhibe la síntesis de forma más rápida y drástica. Es importante destacar que el simple co-cultivo de células Sc con Pc provoca una fuerte disminución del contenido de glutatión de las últimas, por lo tanto, a 120min los niveles alcanzados tras el tratamiento con LPS son más de 35 veces menores que en cultivos primarios de Pc. Se demuestra que la regulación negativa del GSH de Pc se intensifica con la activación de las células con LPS, por lo tanto durante la fase aguda del **shock endotóxico reversible** debe haber otros factores hormonales que influyan sobre la comunicación Sc-Pc y que regulen los niveles de tGSH para elevarlos sobre los niveles control (Figura IV-6).

Se ha descrito la disminución del glutatión intracelular en células parenquimatosas tratadas con medio condicionado de células de Kupffer activadas con LPS³⁸⁶, células parenquimatosas aisladas de ratas endotoxémicas y co-cultivos de Pc con PMN o Kc de hígados endotoxémicos³⁸⁹. Entre los mediadores liberados por células sinusoidales que participan en este efecto se describe principalmente el TNF, que incluso muestra un comportamiento bifásico en función de la dosis^{411,412}. En el presente trabajo se ha demostrado que la IL-1 β también participa en la disminución de los niveles del tripéptido. Una reducción tan pronunciada de los niveles de GSH podría comprometer seriamente la funciones metabólicas del GSH así como su capacidad antioxidante potenciando el daño tisular causado por el peroxinitrito (ONOO⁻)⁴¹⁸.

Diversos estudios concluyen que el TNF- α , u otros procesos fisiológicos que producen la generación de ROS, estimulan la inducción de NOS. Este proceso está regulado por los niveles celulares de GSH, demostrándose que el GSH no sólo participa en la regulación de la iNOS de las Pc sino que además regula los niveles de mRNA de esta enzima^{386,419,420}. Por lo tanto es interesante conocer el efecto que esta drástica reducción en los niveles de GSH de co-cultivos tiene sobre el NO liberado al medio.

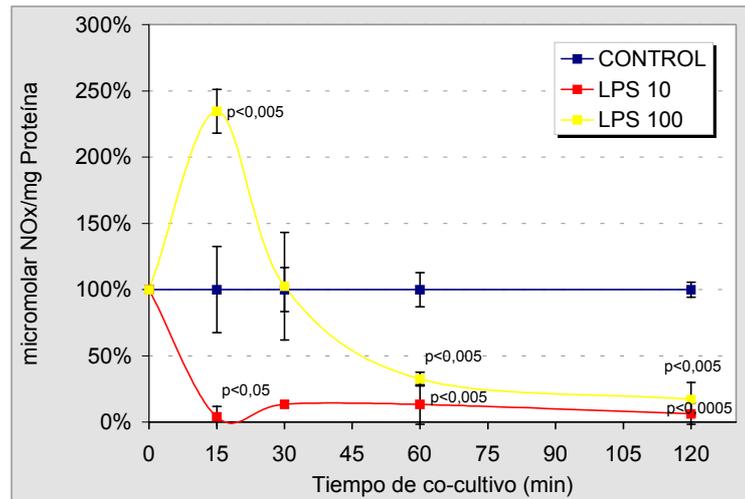


Figura IV-44: Valoración de las especies derivadas del NO en sobrenadantes de co-cultivos de células sinusoidales y células parenquimatosas.

En la Figura IV-44 se demuestra cómo la activación de los co-cultivos con 10µg LPS /ml provoca un descenso en la liberación de especies derivadas del óxido nítrico. La dosis superior de 100µg/ml exhibe un comportamiento bifásico, al primer tiempo medido, 15min, provoca un aumento significativo del más del 200% sobre los valores control. A partir de este tiempo se produce una disminución por debajo de los valores control que se hace significativa a los 60min de incubación.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo con co-cultivos de células sinusoidales y parenquimatosas revelan un comportamiento paralelo entre el contenido en GSH y la producción de NO en respuesta a la endotoxina. Se ha demostrado que la inducción de iNOS está regulada por el sistema GSH^{413,420}. Al mismo tiempo se ha demostrado que los niveles de NO regulan la síntesis de GSH a través de la transcripción de la enzima limitante en la síntesis de GSH⁴²¹. Esto ha llevado a pensar que los efectos del NO están mediados por el estado redox del sistema glutatión⁴²², así como que su acción protectora puede deberse a la inducción de la síntesis de GSH^{191,421,423,424}. Esta complementariedad puede justificarse por la eficacia del GSH en neutralizar peroxinitritos⁴¹⁸, y explicar los efectos contradictorios descritos sobre la inhibición de la síntesis de NO (Apartado I.4.1.2).

IV.6.2. ACCIÓN DE SOBRENADANTES DE CÉLULAS SINUSOIDALES TRATADAS CON LPS SOBRE EL SISTEMA GLUTATIÓN DE CULTIVOS PRIMARIOS DE CÉLULAS PARENQUIMATOSAS

Con el fin de conocer el efecto sinérgico, sobre el sistema GSH, de los mediadores liberados por las células sinusoidales activadas con LPS y el propio LPS, se diseñaron experimentos en los que el sobrenadante de células sinusoidales en cultivo tratadas con LPS es añadido posteriormente sobre células parenquimatosas en cultivo. Para el tratamiento de las células sinusoidales con LPS se escogieron dos tiempos: 15min y 120min. Se estima que entre los mediadores liberados a 15min por las células sinusoidales se encuentran especialmente las especies reactivas del oxígeno y derivados del ácido araquidónico mientras que tiempos de 120min permiten la síntesis de mediadores proteicos. El sobrenadante, que contiene tanto el LPS añadido como los mediadores liberados, es recogido y depositado sobre los cultivos de Pc durante 30min ó 60min. Después se retira el medio y se congelan las monocapas para medir posteriormente el contenido de GSH como se describe en Materiales y Métodos (apartado III.3.6).

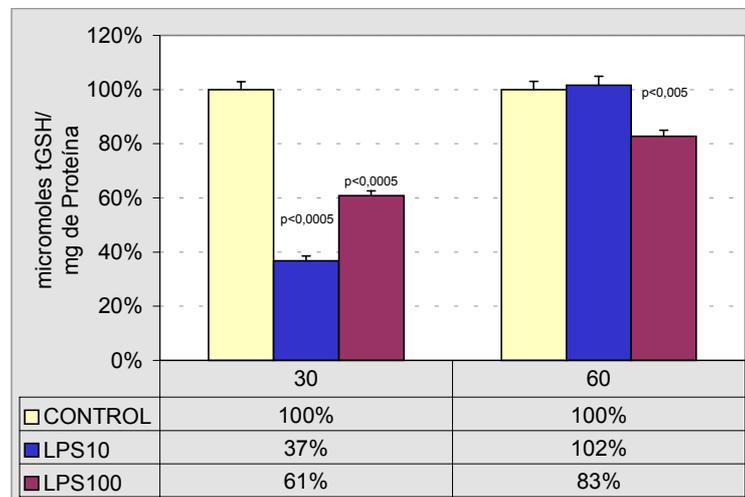


Figura IV-45: Modulación del tGSH intracelular de Pc cultivadas diferentes tiempos por sobrenadantes de células sinusoidales tratadas 15min con LPS.

La Figura IV-45 muestra el efecto del medio de células sinusoidales preincubadas con LPS 15min sobre el contenido de glutatión de Pc cultivadas. La serie Control se corresponde a la utilización de medio de cultivo control para la preincubación, los valores absolutos se encuentran representados en la Figura IV-32. La serie LPS 10 y la serie LPS 100 corresponden a la adición al medio de preincubación de 10µg/ml y 100µg/ml de endotoxina, respectivamente. Las células

parenquimatosas, por tanto, son tratadas en los dos últimos casos en un medio que contiene LPS y los mediadores que las células sinusoidales liberan durante los 15min de preincubación por estimulación con la endotoxina.

La preincubación de las células sinusoidales 15min con 10µg LPS/ml produce una reducción drástica (37%) del glutatión en las Pc tras 30min de aplicación, si bien este efecto desaparece a los 60min, Figura IV-45. Al aumentar la dosis a 100µg LPS/ml el efecto es menos drástico (61%) aunque más perdurable.

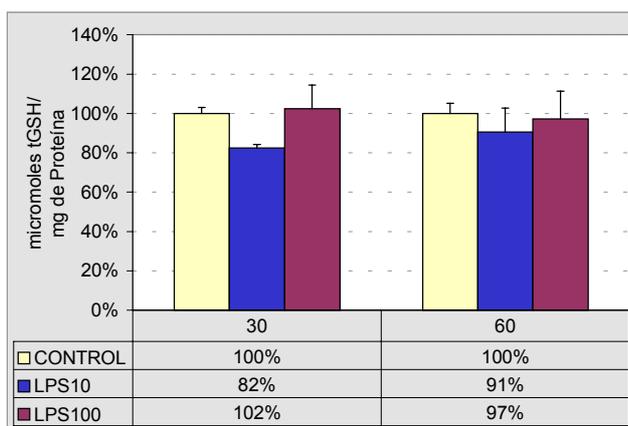


Figura IV-46: Modulación del tGSH intracelular de Pc cultivadas diferentes tiempos por sobrenadantes de células sinusoidales tratadas 120min con LPS.

En la Figura IV-46 se representan de la misma manera que en la Figura IV-45, una serie Control, con sobrenadantes sin LPS y dos series, LPS 10 y LPS100, con sobrenadantes a los que se añadió endotoxina (datos absolutos de los controles en Figura IV-32). Sin embargo la preincubación se alargó hasta 120min.

Al aumentar el tiempo de preincubación a 120min la dosis de 10µg LPS /ml tiene una acción mucho más leve sobre el contenido de GSH, disminuyéndolo en un 18% del valor control tras 30min y en un 9% tras 60min. La dosis LPS 100µg/ml no tiene efecto sobre el contenido en glutatión.

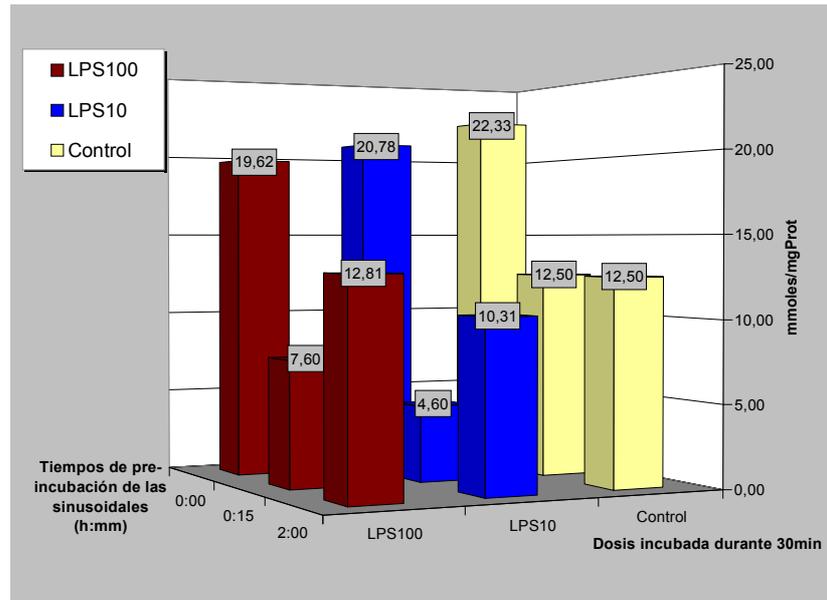


Figura IV-47: Representación tridimensional de la acción de medios preincubados con células sinusoidales y diversas dosis de LPS sobre el contenido en GSH de células parenquimatosas. Se han representado en el mismo color las series de dosis: Control, LPS 0µg/ml, LPS 10µg/ml y LPS 100µg/ml. En el eje X se han representado los tiempos de preincubación del medio condicionado con las células sinusoidales.

Se representa en la Figura IV-47 un resumen de los niveles de GSH de las células parenquimatosas tras 30min con sobrenadantes de células sinusoidales preincubadas con LPS durante 15min y 120min, ya que son estos datos los más significativos. Como ya se ha señalado anteriormente se concluye que existe una disminución del contenido de GSH de las Pc producido por los mediadores basales liberados por las células sinusoidales. En segundo lugar se concluye que esta modulación es amplificada por la adición de LPS al medio. Estos hechos confirman que el LPS induce a tiempos cortos la liberación de mediadores que tienden a rebajar el contenido de GSH de los Pc, enmascarando el efecto producido por la acción directa (Figura IV-33). Las diferencias detectadas entre las dosis a ambos tiempos de preincubación demuestran que el efecto de LPS no es dosis dependiente.

El efecto observado sobre el glutatión a 30min parece estar debido a los factores segregados por las Kc ya que el co-cultivo de Kc aisladas de ratas septicémicas con Pc produce en éstos la disminución significativa del glutatión intracelular³⁸⁹. Entre estos mediadores podemos encontrar ROS, PGEs, TNF- α y IL-1³⁸⁵. Dado que los mediadores proteicos como interleuquinas y TNF necesitan al menos 2h para alcanzar sus concentraciones máximas⁴⁰⁴, quedan descartados como efectores de la modulación del GSH de los Pc por parte de las células sinusoidales. Cook y col⁴²⁵ midieron niveles de eicosanoides en el plasma de ratas en las que se había inducido previamente un *shock* con endotoxina de *Salmonella enteriditis* obteniendo tan sólo diez minutos después de la inyección niveles máximos de TxB₂, que permanecieron

elevados durante 30-60min. Por lo tanto los mediadores más probables responsables de los efectos observados son ROS y derivados del ácido araquidónico.

IV.6.3. EFECTO DEL CO-CULTIVO DE CÉLULAS PARENQUIMATOSAS CON CÉLULAS NO PARENQUIMATOSAS PREESTIMULADAS CON LPS

El sistema de co-cultivos utilizado permite activar las células sinusoidales con LPS, reemplazar el medio con LPS por medio fresco y observar el efecto que los mediadores liberados tienen sobre el contenido de glutatión de células parenquimatosas no activadas. De esta manera se puede identificar el papel que tienen los mediadores independientemente, sin la presencia de LPS añadido.

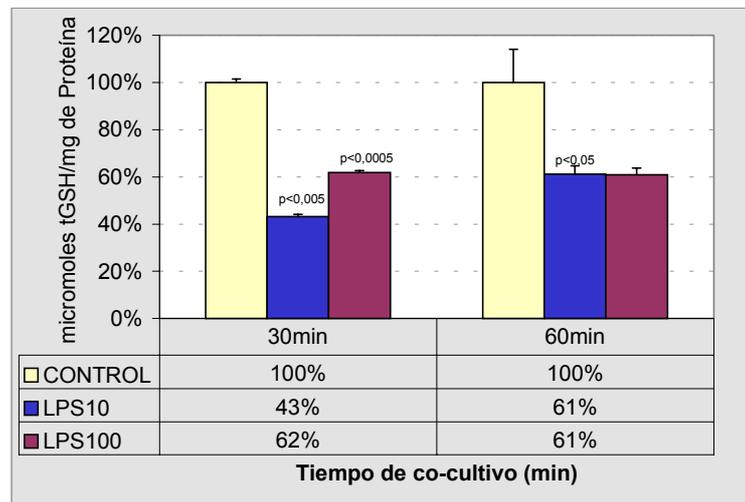


Figura IV-48: Efecto en el contenido total de glutatión de células parenquimatosas del co-cultivo con células sinusoidales preactivadas 15min con distintas dosis de LPS

En la Figura IV-48 se han representado los valores de glutatión total obtenidos en células parenquimatosas co-cultivadas 30 ó 60min con células sinusoidales activadas durante tan sólo 15min con LPS. En este tiempo tan corto es evidente que el LPS a ambas dosis, 10µgLPS/ml y 100µgLPS/ml, es capaz de activar a las células sinusoidales para que regulen negativamente de forma muy importante el contenido en glutatión de las células parenquimatosas co-cultivadas ya en ausencia de la endotoxina.

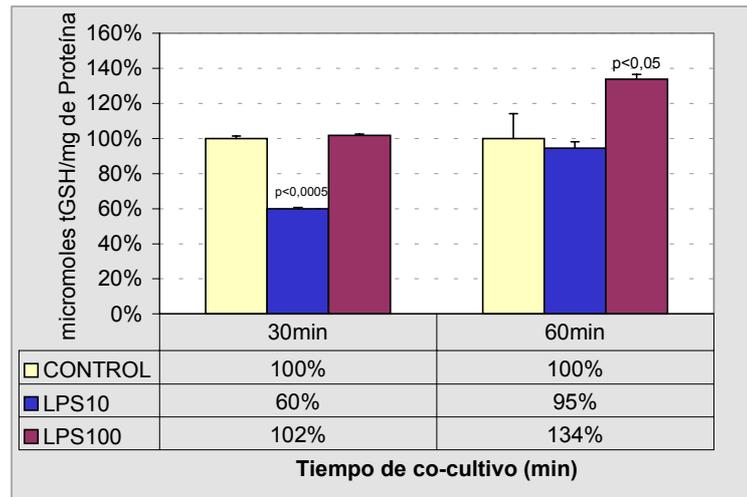


Figura IV-49: Efecto en el contenido total de glutatión de células parenquimatosas del co-cultivo con células sinusoidales preactivadas 120min con distintas dosis de LPS

En la Figura IV-49 las Sc han permanecido 120min en contacto con el LPS antes de co-cultivarse con los Pc 30 ó 60min. Se puede observar cómo los mediadores liberados por las primeras ejercen un efecto diferente. El pretratamiento con la dosis 10µgLPS/ml activa las Sc para regular el tGSH de los Pc durante los 30 primeros minutos, desapareciendo esta regulación negativa a los 60min. Es decir, es un efecto menos duradero que cuando la preincubación se limita a tan sólo 15min. En cuanto a la dosis de 100µgLPS/ml, no parece activar a las Sc para que regulen el tGSH de los Pc en los 30 primeros minutos, pero tras 60min provoca una inducción de la síntesis de tGSH.

Estos resultados confirman que son los mediadores liberados a tiempos cortos los principales responsables del efecto sobre el tripéptido observado en los co-cultivos tras el tratamiento con LPS. Probablemente sean radicales libres, ya que la adición de SOD/catalasa al medio revierte significativamente la disminución de GSH causada por Kc de ratas septicémicas³⁸⁹. Cutrin y col.⁴²⁶ proponen la existencia de un circuito paracrino entre las Kc activadas y los Pc, clave en la inducción de estrés oxidativo hepático. Según estos autores la interferencia de la cadena electrónica mitocondrial por moléculas liberadas por las Kc activadas incrementaría la tasa de generación de ROS por la cadena respiratoria mitocondrial inhibida.

Los mediadores liberados tras un tiempo de exposición más largo de preestimulación de las Kc provocan la recuperación y elevación de los niveles de glutatión, de modo similar a lo que se ha observado *in vivo* durante la fase aguda (Figura IV-6). Como se ha demostrado anteriormente TNF-α y IL-1β disminuyen el contenido intracelular de Pc y no parecen ser responsables directos de la recuperación de los niveles (Figura IV-38) de GSH.

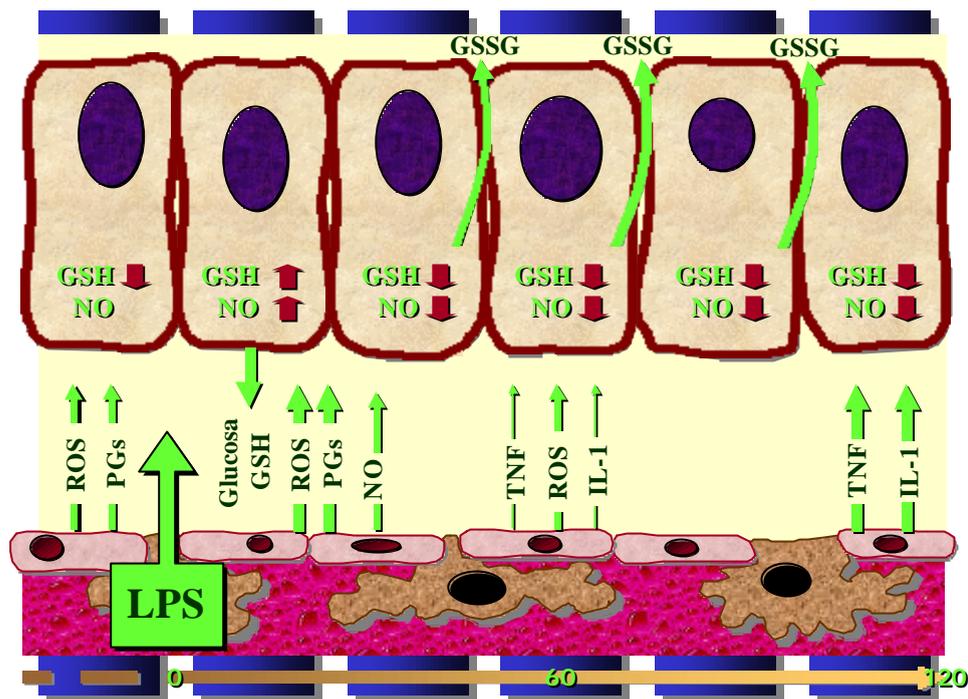


Ilustración IV - 5: Hipótesis propuesta para la acción *in vitro* del LPS sobre las células sinusoidales y su interacción con las células parenquimatosas

Los resultados obtenidos en los últimos apartados permiten la elaboración de la siguiente hipótesis (Ilustración IV-5). Las células sinusoidales modulan de forma negativa los niveles de GSH en células parenquimatosas a través de la liberación de ROS y PGs. La adición de LPS provoca una activación de la síntesis de GSH en las células parenquimatosas pero al mismo tiempo estimula la formación de ROS y PGs por parte de las células sinusoidales que contrarrestan la acción directa del LPS sobre el GSH. A tiempos más largos las células sinusoidales activadas sintetizan y liberan citoquinas tales como TNF e IL-1 que acentúan la regulación negativa del GSH en las células parenquimatosas y provocan la secreción de GSSG.

IV.7. EFECTO DE LAS LIPOPROTEÍNAS SOBRE EL CONTENIDO EN GSH DE CÉLULAS PARENQUIMATOSAS CULTIVADAS Y SOBRE SU REGULACIÓN POR EL LPS

En el presente estudio se ha abordado la capacidad de las HDL para modular el efecto del LPS sobre el contenido intracelular de GSH de las células parenquimatosas. Para ello, previamente se ha caracterizado la interacción de estas lipoproteínas con la endotoxina con el fin de encontrar las condiciones de máxima interacción. Por otra parte se ha investigado el efecto de las HDL sobre la interacción del LPS con las células parenquimatosas mediante citometría de flujo.

IV.7.1. CARACTERIZACIÓN DE LA INTERACCIÓN LPS-HDL

IV.7.1.1. EFECTO DE LA INCUBACIÓN DE LPS Y HDL SOBRE SU DENSIDAD

Está establecido que las lipoproteínas forman complejos estables con el LPS. Para estudiar esta interacción se realizó un gradiente de densidad Redgrave para comprobar el comportamiento de I^{125} -LPS (en ausencia y presencia de 1% de suero humano fresco), I^{125} -HDL y HDL+ I^{125} -LPS (en ausencia y presencia de 1% de suero humano fresco).

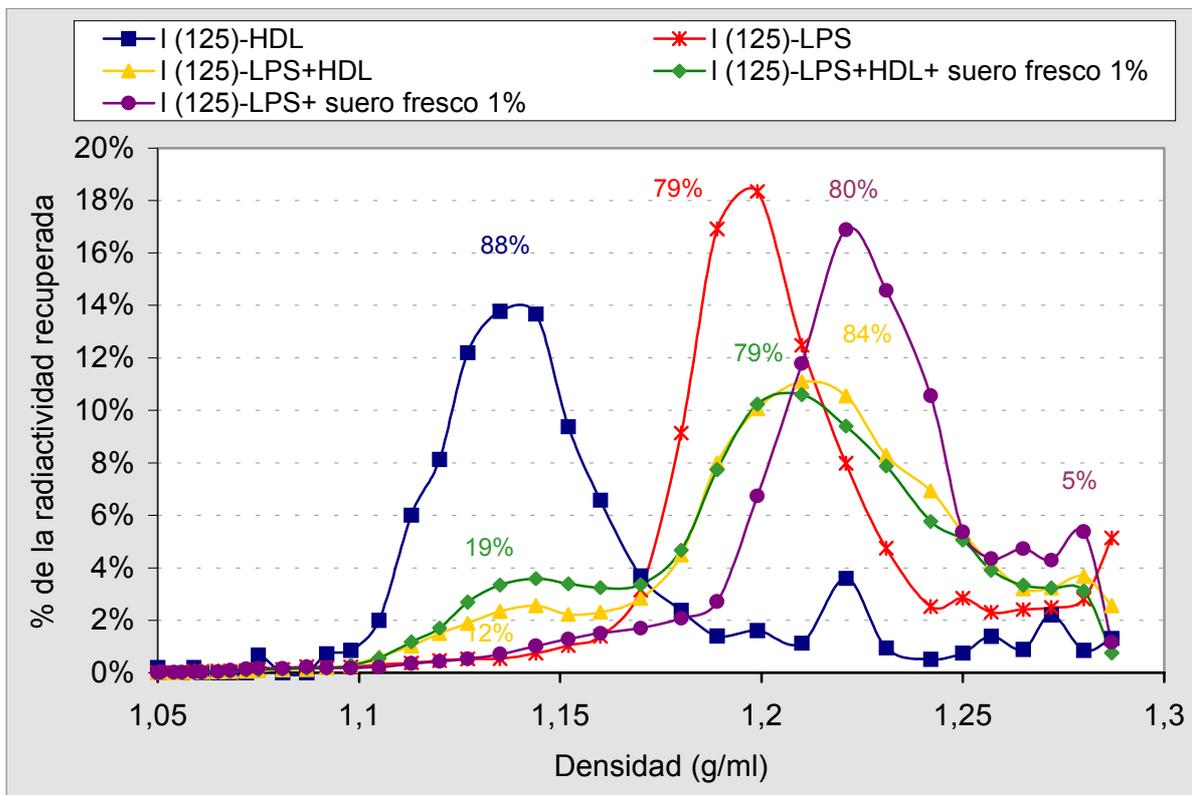


Figura IV-50: Porcentaje de radioactividad total recogida en función de la densidad en un gradiente tipo Redgrave.

Se puede observar en la Figura IV-50 que el 88% de la I^{125} -HDL recuperada presenta una densidad entre 1,09-1,23g/ml. El 79% del I^{125} -LPS se recupera a densidades entre 1,14-1,24g/ml. Las fracciones de ambas especies recogidas a densidades superiores a 1,25g/ml son probablemente debidas a agregación. La incubación de I^{125} -LPS con 1% de suero completo fresco durante 30min provoca el aumento de densidad de la banda observándose un desplazamiento a densidades más elevadas (1,14-1,27g/ml), con fracciones considerables a densidades superiores (5% radioactividad recuperada a 1,27g/m). La incubación de LPS con HDL da lugar a una fracción de I^{125} -LPS recuperado (12%) cuya densidad se encuentra entre 1,10-

1,15g/ml y que podría corresponderse con los complejos HDL-LPS formados durante la incubación. Esta incubación provoca, además, un desplazamiento y ensanchamiento en la banda del I^{125} -LPS a densidades más elevadas (1,17-1,29g/ml), similar al observado al incubar el LPS con suero fresco. La incubación de I^{125} -LPS+HDL+suero fresco (1%) permite recuperar hasta un 19% de la radioactividad total I^{125} -LPS asociada a la HDL, y un desplazamiento y ensanchamiento de la banda correspondiente al I^{125} -LPS libre. Ambas bandas solapan considerablemente haciendo difícil el posible aislamiento de fracciones puras por este método.

Estos cambios en la densidad demuestran que el I^{125} -LPS interacciona con componentes del suero y con las HDL sufriendo alteraciones en el estado de agregación y/o en la composición de los agregados que podría tener consecuencias biológicas³⁰⁶. Nuestros resultados coinciden con los de Van Lenten y col⁷³, quienes describieron la formación de complejos estables de I^{125} -LPS con HDL resistentes a la ultracentrifugación y las enzimas del suero.

IV.7.1.2. EFECTO DE LA DOSIS DE HDL EN LA INTERACCIÓN HDL/LPS

Se llevaron a cabo estudios con diferentes relaciones HDL/LPS para encontrar la relación en la que la interacción HDL-LPS es máxima. Para ello se prepararon muestras con las concentraciones que se describen en la Tabla III-9, que se incubaron durante 30min a 37°C.

En la Figura IV-51 se han superpuesto las imágenes del gel de agarosa teñido con azul de Coomassie y su autorradiografía. El azul de Coomassie tiñe las proteínas presentes en las HDL, mientras que la autorradiografía muestra dónde se encuentra el I^{125} -LPS.

Se puede observar en la Figura IV-51 cómo el LPS migra de forma bastante heterogénea (última calle). La incubación con altas concentraciones de HDL aumenta la homogeneidad del LPS, haciéndolo migrar en dos bandas bien definidas, la más notable constituye el frente de migración del LPS. Este efecto podría justificarse por la inserción de componentes lipídicos y/o proteínicos de la lipoproteína en los agregados de LPS.

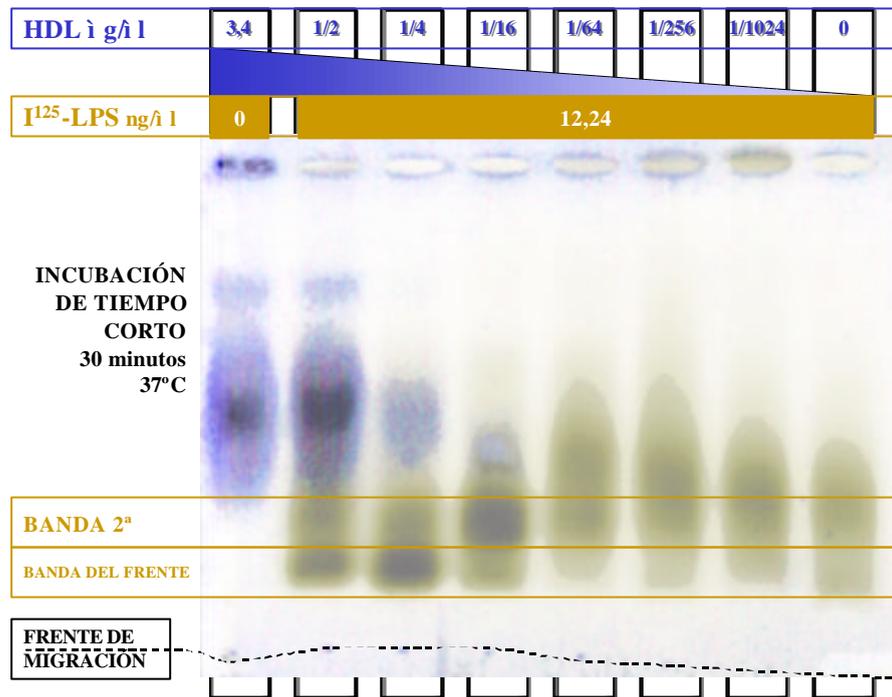


Figura IV - 51: Estudio de la concentración en la interacción ^{125}I -LPS-HDL (30min 37°C). Superposición de las imágenes del gel de agaosa teñido con azul de Coomase y de su propia autoradiografía.

CALLE	1	2	3	4
FRENTE	7,5	7,2	7,4	7,5
BANDA	4,0	3,8	3,8	4,3
MOVILIDAD RELATIVA	0,530	0,507	0,510	0,573

Tabla IV - 2 Movilidad de las bandas de HDL teñidas con azul de Coomase relativa a la movilidad del frente de migración

La Figura IV-52 demuestra que las bandas frontales no contienen proteínas. Por lo tanto su formación es consecuencia de la inserción de componentes lipídicos en los agregados de LPS. Esta banda desaparece al bajar las concentraciones de HDL, concentrándose el LPS a movilidades más cercanas a las de las lipoproteínas. A bajas concentraciones relativas de HDL frente a LPS también se modifica su propia movilidad. En la Tabla IV-2 se observan estas variaciones. La movilidad de 0,53 de la HDL pura se corresponde con los valores habituales.



Figura IV-52: Tinción de plata de un gel SDS-PAGE. El carril 1 se corresponde con las proteínas patrón. En el carril 2 se cargó la porción de gel de agarosa correspondiente a la banda frontal de LPS observada en las autorradiografías tras la incubación a tiempos cortos de LPS y HDL.

Estos hechos podrían explicarse de dos maneras, la inserción de moléculas de LPS en las lipoproteínas o la adsorción de moléculas/agregados de endotoxina sobre las HDL

IV.7.1.3. EFECTO DEL SUERO EN LA MOVILIDAD DEL I¹²⁵-LPS Y DE LOS COMPLEJOS I¹²⁵-LPS-HDL

El suero parece tener un importante papel en la interacción I¹²⁵-LPS-HDL, en la Figura IV-50, se ha demostrado cómo la adición de suero fresco 1% provoca un aumento en la cantidad del I¹²⁵-LPS asociado a la banda de la HDL. Para conocer el efecto del suero en la interacción I¹²⁵-LPS-HDL, se realizaron estudios de movilidad en geles de agarosa, tras 30 minutos de incubación a 37°C. En la Tabla III-10 se describen las proporciones utilizadas.

Se observa que el suero produce una disminución de la movilidad del I¹²⁵-LPS sin reducir la heterogeneidad en la movilidad. Por otro lado potencia la interacción de las HDL con el I¹²⁵-LPS y elimina las bandas frontales que se observan en su ausencia.

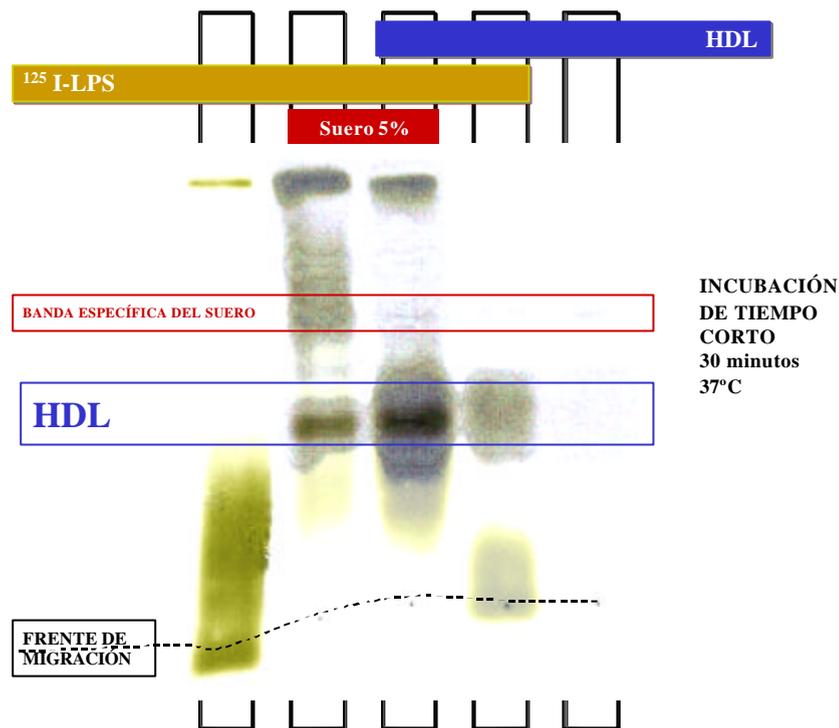


Figura IV-53: Estudio del efecto del suero en la interacción ^{125}I -LPS-HDL (30min 37°C). Superposición de las imágenes del gel de agarosa teñido con azul de Coomassie y de su propia autoradiografía.

IV.7.1.4. EFECTO DEL LPS EN LA MOVILIDAD ELECTROFORÉTICA DE LAS HDL

En la Figura IV-51 se observa que, a bajas concentraciones de HDL el LPS produce un aumento en su movilidad electroforética. Los siguientes resultados muestran un estudio más detallado de esta interacción a bajas concentraciones de HDL.

Para complementar los estudios realizados con ^{125}I -HDL se estudió el efecto sobre la movilidad de las HDL con diferentes concentraciones de LPS a las que se añadió una pequeña cantidad de ^{125}I -LPS. Las proporciones utilizadas se recogen en la Tabla III-11 y la Tabla III-12 respectivamente.

En la Figura IV-54 se observa que las ^{125}I -HDL muestran una movilidad electroforética ligeramente aumentada respecto a las HDL nativas. Se demuestra que la interacción LPS-HDL provoca un aumento de la movilidad de las lipoproteínas que es dependiente de la dosis de endotoxina, efecto también observado por Freudenberg y col¹⁰⁰, en complejos LPS-HDL aislados *in vivo*. La adición de suero fresco 1% provoca que parte de las HDL retengan la movilidad electroforética del estado nativo.

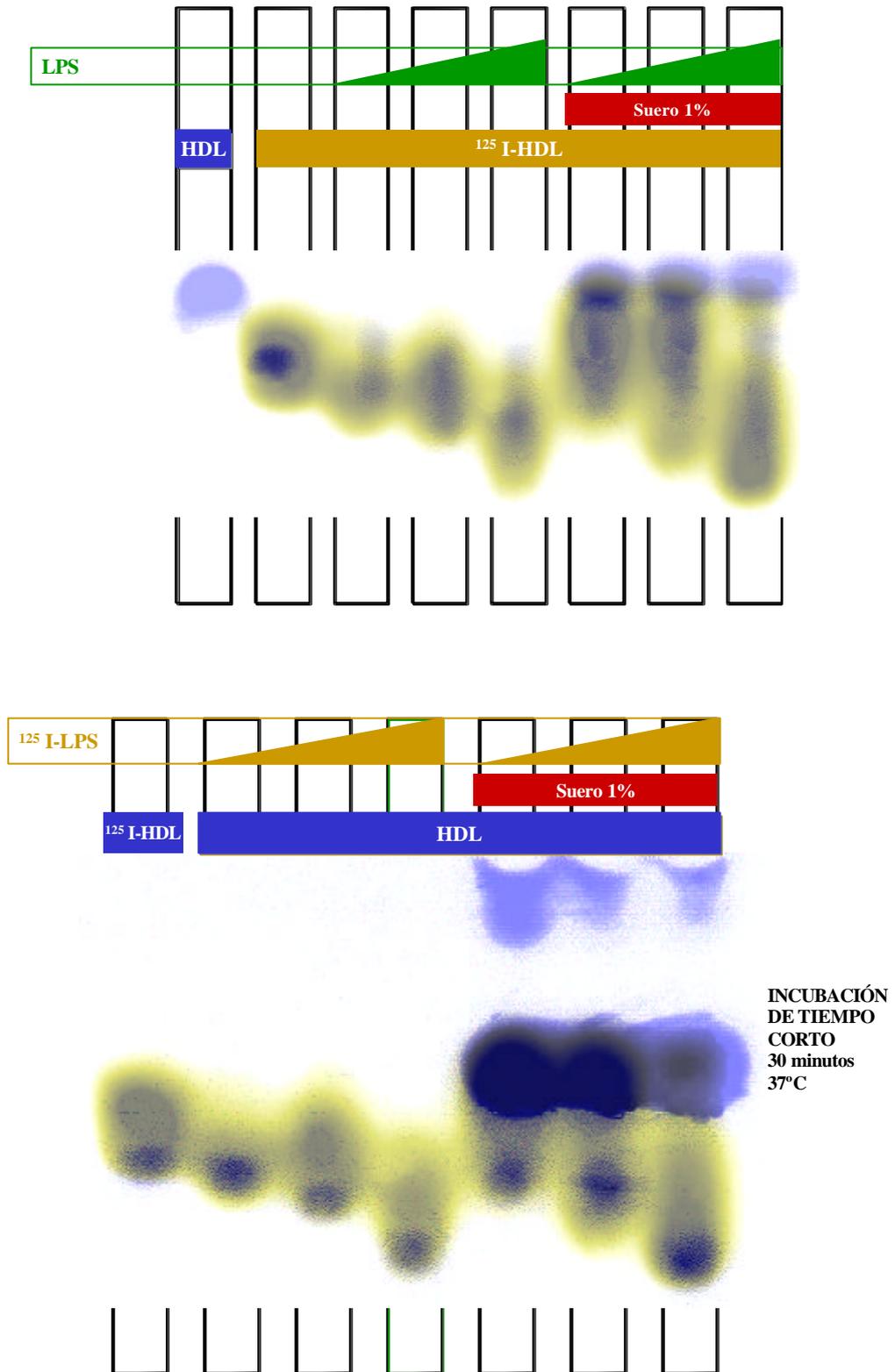


Figura IV - 54: Estudio de la movilidad de las HDL incubadas con LPS (30min 37°C). Superposición de las imágenes del gel de agarosa teñido con azul de Coomasie y de su propia autorradiografía.

IV.7.1.5. *EFFECTO DE LA SONICACIÓN EN LA MOVILIDAD ELECTROFORÉTICA DEL LPS Y EN SU INTERACCIÓN CON SUERO HUMANO Y ALBÚMINA BOVINA*

Se ha observado que las HDL modifican la movilidad electroforética de los agregados de LPS, resultando un patrón de migración más homogéneo. La sonicación altera el estado de agregación del LPS en disolución rindiendo agregados más pequeños y homogéneos⁴²⁷. Los siguientes estudios también incluyen la acción que el suero y la albúmina bovina (BSA) ejercen sobre el patrón de movilidad electroforética del LPS. El procedimiento se describe en el apartado III.6.2.4 y las proporciones utilizadas en la Tabla III-13.

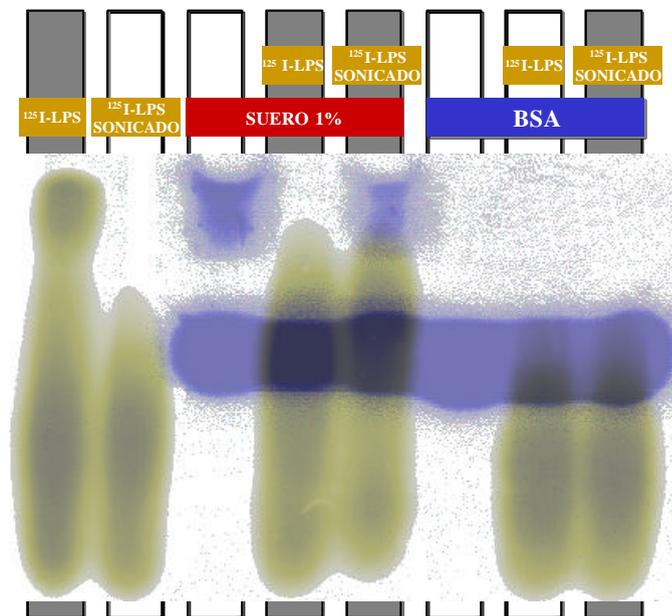


Figura IV - 55: Estudio del efecto de la sonicación, el suero humano y la BSA en la movilidad electroforética del LPS. Superposición de las imágenes del gel de agarosa teñido con azul de Coomassie y de su propia autoradiografía.

La sonicación no promueve la homogeneidad de la movilidad electroforética del LPS pero provoca una mayor interacción con el suero. La albúmina bovina (BSA) no tiene influencia sobre la movilidad electroforética de la endotoxina.

IV.7.1.6. *CINÉTICA DE LA INTERACCIÓN 125 -LPS-HDL EN PRESENCIA DE SUERO HUMANO*

Con el fin de conocer la evolución de la interacción LPS-HDL con el tiempo, se realizó un estudio cinético que proporcionase el tiempo óptimo de incubación. En el apartado IV.7.1.3 se ha demostrado que la presencia de suero aumenta de forma muy considerable la interacción

LPS-HDL por lo tanto se utilizará suero en los ensayos restantes, ya que éste es el fin último de los presentes estudios. Las proporciones utilizadas en el gel de agarosa se describen en la Tabla III-14.

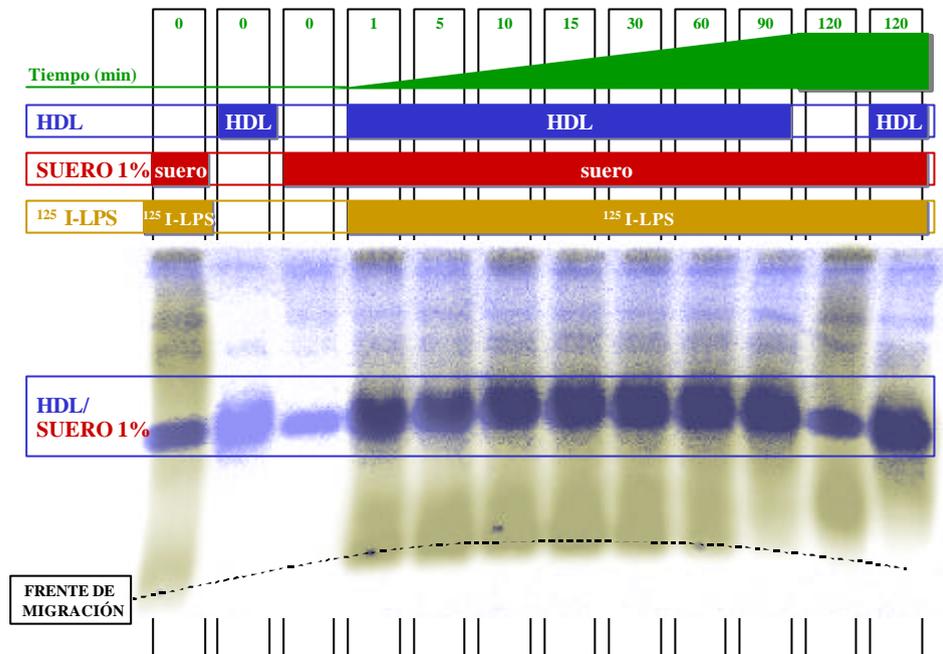


Figura IV - 56: Estudio cinético de la interacción HDL-LPS a través de su movilidad electroforética. Superposición de las imágenes del gel de agarosa teñido con azul de Coomassie y de su propia autorradiografía.

Los resultados en la Figura IV-56 demuestran que la interacción cambia a lo largo de los 120min de incubación. A tiempo 0 la mezcla LPS/suero muestra un patrón de difusión muy heterogéneo. Cierta población de agregados migra con el frente de electroforesis, mientras que otra población se encuentra asociada a la segunda banda característica del suero. Esta modificación en la movilidad del LPS es extremadamente rápida ya que las muestras fueron introducidas en hielo inmediatamente tras la mezcla.

Puesto que la movilidad electroforética está determinada por la relación carga/volumen (Q/V) de la partícula, el efecto observado es causado por la disminución del tamaño de los agregados de LPS. Se ha demostrado que la LBP presente en las HDL es capaz de dispersar los agregados de LPS⁴²⁸. Esta disminución de tamaño puede ser la causa del rápido aumento de la capacidad del LPS de activar neutrófilos polimorfonucleares durante los 10 primeros minutos de interacción entre el suero y la endotoxina^{320,429}.

Tras 2h de incubación a 37°C desaparecen los agregados de LPS con mayor movilidad y la banda de radiactividad asociada a las proteínas del suero. En tan sólo un minuto la interacción

HDL-LPS en presencia de suero provoca la aparición de una pequeña cantidad de LPS asociado a las lipoproteínas y una banda frontal, muy cerca del frente de migración. Hasta los 15min la banda frontal va aumentando de magnitud, los agregados con menor movilidad electroforética desaparecen, distribuyéndose de forma homogénea entre la banda correspondiente a las proteínas de las HDL y la banda frontal de LPS. Se puede deducir que aunque la modificación del LPS por las HDL es rápida, la asociación del LPS a las HDL es un proceso cinéticamente lento.

IV.7.1.7. EFECTO DE CATIONES DIVALENTES EN LA INTERACCIÓN HDL-LPS

Los resultados anteriores demuestran que el estado de agregación del LPS tiene un papel relevante en la interacción LPS-HDL. Por este motivo se probó el efecto de cationes divalentes en la movilidad electroforética de LPS, HDL y sus complejos. Las concentraciones de cationes divalentes se establecieron cercanas a las que existen en el plasma normal *in vivo*. También se ensayó la eliminación de toda traza de catión divalente con la adición del quelante EDTA, para observar si de esta manera se aumentaba la homogeneidad de los agregados. Las proporciones utilizadas están contenidas en la Tabla III-15.

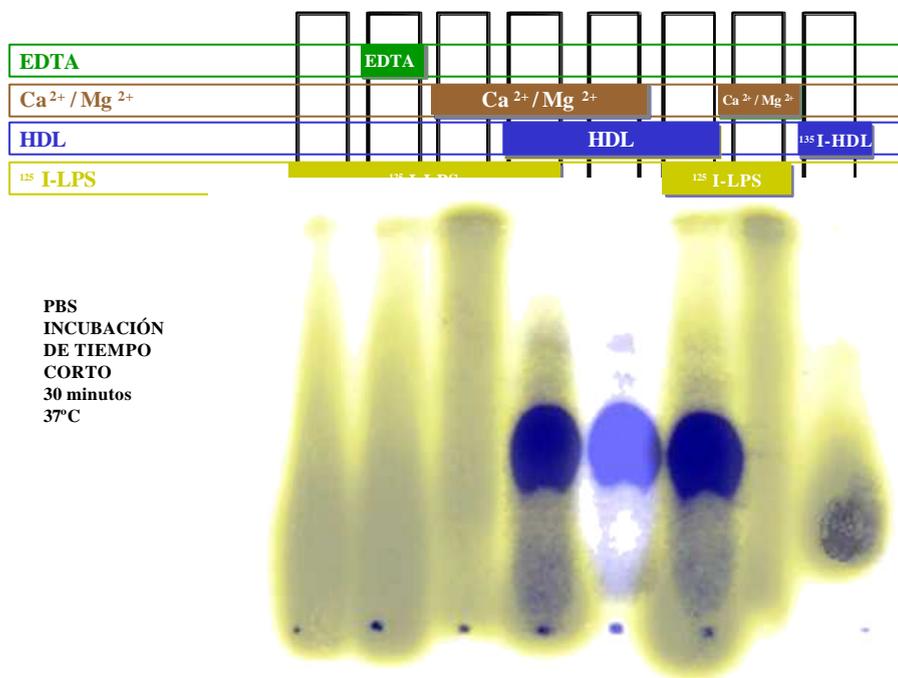


Figura IV - 57: Estudio del efecto de cationes divalentes en la interacción ¹²⁵I-LPS-HDL (30min 37°C). Superposición de las imágenes del gel de agarosa teñido con azul de Coomassie y de su propia autoradiografía

Los cationes divalentes Ca^{2+}/Mg^{2+} causan una disminución en la movilidad electroforética al neutralizar las cargas negativas (PO_4^-) del LPS. Probablemente esta neutralización de la carga provoque un aumento del tamaño de los agregados, la relación Q/V se

reduce mucho y los agregados permanecen inmóviles. Sin embargo, no existe un aumento en la homogeneidad electroforética de los agregados. La adición de EDTA al medio de incubación apenas tiene efecto en el patrón electroforético del LPS, lo que es, en parte, previsible ya que el tampón utilizado para todos los experimentos es PBS que carece de Ca^{2+} o Mg^{2+} . Las HDL provocan un aumento en la homogeneidad de los agregados de LPS también en presencia de cationes divalentes, observándose las dos bandas características, una en el frente y otra asociada a las proteínas de las HDL.

El aumento de la homogeneidad provocado por las HDL y la disminución de la carga neta por los cationes divalentes probablemente conllevan cambios en la densidad de los agregados de LPS. Para evaluar este efecto sobre la densidad se realizó un gradiente de densidad tipo Redgrave modificado, en el que el rango de densidades se redujo al intervalo 1,036-1,210g/ml. Para ello se utilizaron las proporciones que se detallan en Tabla III-16. El I^{125} -LPS fue sonificado en las condiciones descritas, para obtener una población lo más homogénea posible.

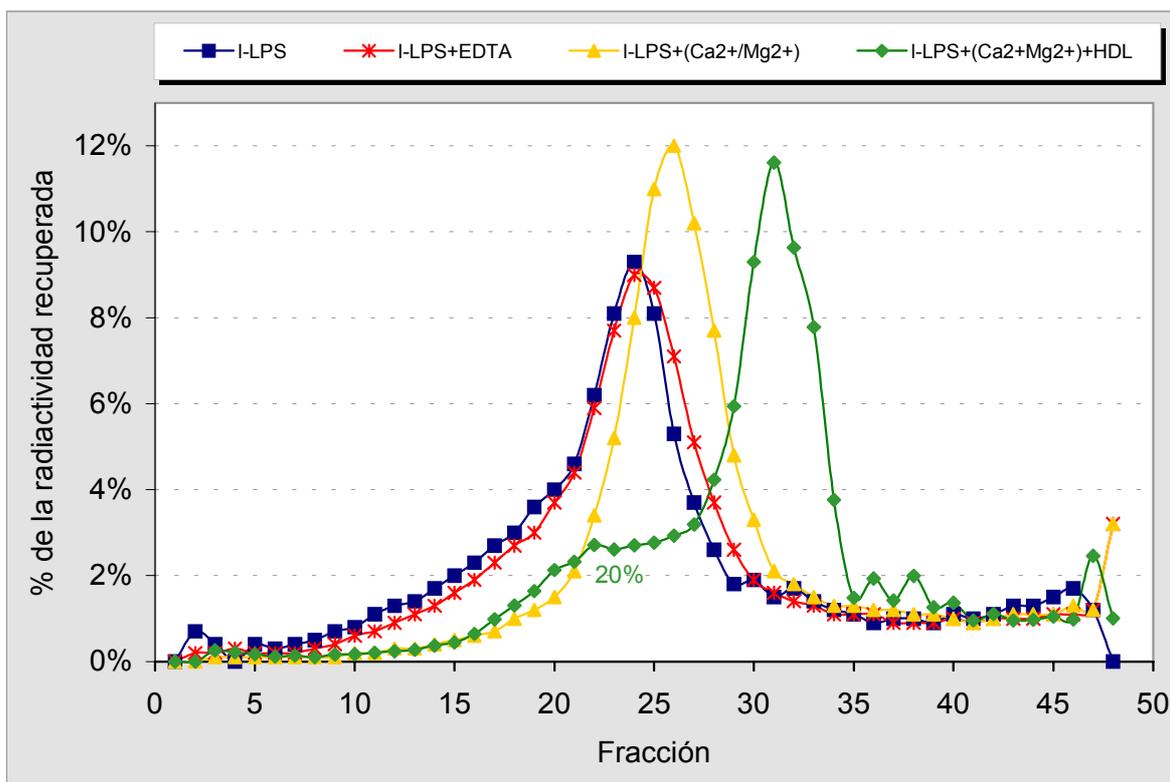


Figura IV-58: Gradiente de Redgrave de las muestras incubadas durante 30min a 37°C. Se ha representado el % de la radiactividad recuperada frente a la fracción, la densidad aumenta desde la fracción 0 a la 48

En la Figura IV-58 se observa cómo los cationes divalentes causan un aumento en la densidad de los agregados de LPS. Los agregados con las densidades menores desaparecen para dar formas más densas, lo que implica un cambio en la estructura de los mismos. Las HDL

tienen un doble efecto sobre la densidad del LPS: parte de la endotoxina conserva la densidad que correspondería a la HDL libre y el resto de la endotoxina aumenta su densidad y disminuye su homogeneidad ligeramente.

En resumen los cationes divalentes hacen disminuir la relación Q/V y aumentar la densidad (P/V), es decir existe una neutralización de la carga por los cationes que provocan un empaquetamiento más estrecho de los agregados de LPS. En presencia de HDL cierta cantidad de LPS presenta la misma densidad de las HDL (fracciones 18-25, 20%). El hecho de que la densidad de las estructuras HDL-LPS no aumente con Ca/Mg, cuando el LPS libre si lo hace, indica que posiblemente el LPS esté insertado en la lipoproteína y no adsorbido en su superficie.

IV.7.1.8. LIPOPROTEÍNAS DE MUY ALTA DENSIDAD (VHDL)

Se estimó interesante hacer un nuevo análisis en gradiente de densidad del suero deficiente en lipoproteínas (LPDS) y observar posteriormente la posible presencia de lipoproteínas. Para conseguir este objetivo se preparó un gradiente con tan sólo dos fracciones de densidad de KBr (densidades 1,063 y 1,21g/ml) para obtener una mejor separación. Los gradientes resultantes tras la ultracentrifugación fueron fraccionados en 24 alícuotas. En dichas fracciones se valoró tanto el contenido en colesterol como en proteínas.

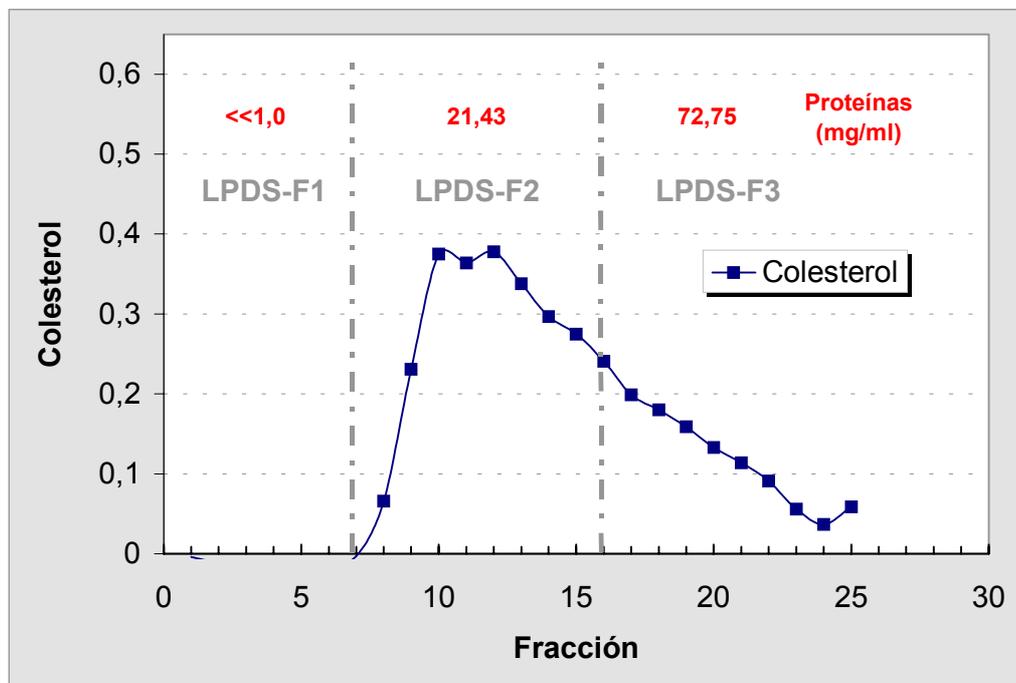


Figura IV-59: Contenido en colesterol y proteínas de las fracciones obtenidas tras la ultracentrifugación en gradiente de densidad de suero deficiente en lipoproteínas. La fracción 0 se corresponde con la menor densidad (parte superior del tubo) y la 25 con la de mayor densidad

En la Figura IV-59 se observa cómo todavía existen considerables cantidades de colesterol en el LPDS. Ateniéndose a las cantidades relativas de colesterol y proteínas se pueden separar tres grandes fracciones numeradas como F1, F2 y F3. Estas fracciones fueron incubadas durante 120min con LPS tal y como se describe en la Tabla III-7.

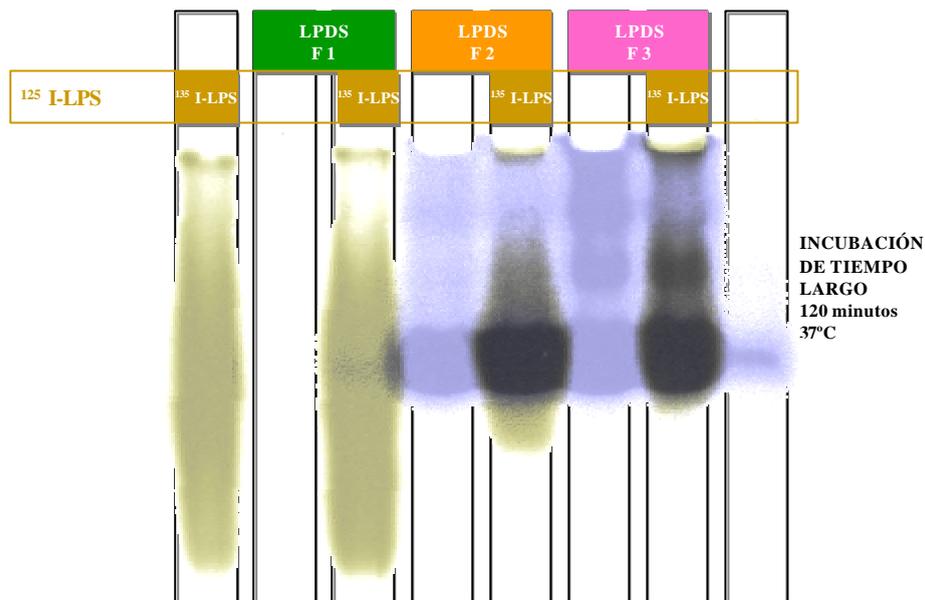


Figura IV - 60: Estudio de la interacción del ^{125}I -LPS con las diferentes fracciones del suero deficiente en lipoproteínas (120min 37°C). Superposición de las imágenes del gel de agarosa teñido con azul de Coomassie y de su propia autorradiografía

Se puede observar que la fracción F1 no contiene proteínas ni produce ningún efecto sobre el LPS. La fracción F2 contiene una concentración elevada de lipoproteínas que interacciona con el LPS en ausencia de suero. La fracción F3 presenta grandes cantidades de proteínas que migran en tres bandas bien definidas características del suero completo. El LPS también interacciona con los componentes de esta fracción, especialmente con la segunda y tercera banda, con un máximo a movilidades ligeramente superiores a las de la F2.

Wurfel y col³²⁰ probaron que las lipoproteínas plasmáticas de alta densidad poseen todos los factores necesarios para la neutralización del LPS. Sus resultados contradicen muchos estudios anteriores en los que las lipoproteínas aisladas por ultracentrifugación necesitaron de factores de la fracción del suero pobre en lipoproteínas^{304,430,431} para ejercer su acción. Wurfel y col³²⁰ proponen la posibilidad de que la ultracentrifugación sea un método demasiado energético que puede provocar la separación de estos factores de las HDL. Sin embargo las lipoproteínas de

la F2 de los ensayos presentados en este trabajo han sido ultracentrifugadas 2 veces secuenciales y no necesitan factores séricos para su asociación con el LPS.

Wurfel y col.³²⁰ discuten el papel ambiguo que tienen las HDL en la endotoxemia. A tiempos cortos la LBP que llevan asociada provoca la activación de las células macrofágicas, aunque, a tiempos largos produce su inactivación. Esto les lleva a pensar que han de existir otros factores que regulen el papel positivo o negativo de las HDL y que determinen el balance final del proceso. Blackburn y col.⁴³² describen que, durante la fase aguda, existen alteraciones en el metabolismo de la apolipoproteína AI y la HDL. En sus estudios la apoAI inhibe la degranulación y la producción de metabolitos de neutrófilos en más de un 60%. Afirman, por otro lado, que este efecto ha de estar mediado por los dominios anfipáticos helicoidales de la apoAI presentando características de procesos mediados por receptores.

Estos resultados conjuntamente con lo presentados en el presente trabajo permiten formular la hipótesis de que la interacción HDL-LPS ocurre en varias etapas y está autorregulada. La primera etapa es rápida y culmina tras 10 minutos de interacción, durante los cuales la actividad LBP/Septina presente en las VHDL provoca la transferencia de lípidos hacia los agregados de endotoxina induciendo una disminución en su tamaño y un aumento en la homogeneidad de los mismos. Este cambio en las propiedades biofísicas de la endotoxina tiene como resultado el aumento de su actividad biológica sobre macrófagos. El aumento del número de moléculas de LPS expuestas facilita la acción de transferencia de las LBP a los receptores CD14. Este aumento en la disponibilidad también inicia el proceso de inserción y neutralización de la endotoxina en las HDL, el metabolismo normal asegura una distribución entre las diferentes lipoproteínas, reteniendo el plasma más del 80% de la endotoxina en sangre⁴³³. La activación de la cascada inflamatoria instaura la fase aguda, con hiperlipidemia y síntesis aumentada de LBP, incrementando la capacidad neutralizadora del suero. Simultáneamente a la entrada de LPS en las HDL se produce la liberación de apoAI que regula negativamente el proceso inflamatorio inactivando a los macrófagos. El LPS es eliminado del plasma siguiendo la misma cinética que las HDL a lo largo de varios días. Este mecanismo coloca a las HDL como compuestos clave en el desarrollo del *shock* endotóxico, llegando ser protectora en modelos de bacteriemia^{313,316} y ensayos clínicos³¹⁵.

IV.7.2. EFECTO DE LA INTERACCIÓN LPS-HDL EN EL CONTENIDO EN GSH DE CÉLULAS PARENQUIMATOSAS CULTIVADAS

El objetivo final de los estudios descritos anteriormente fue hallar las condiciones óptimas de interacción para la obtención de complejos LPS-HDL con el fin de profundizar en el posible papel protector de las HDL frente a la endotoxina. Estas condiciones se han fijado en HDL(0,8mg/ml):LPS(0,4mg/ml):LPDS(1%) y un tiempo de incubación de 120min a 37°C. Dada la complejidad del ensayo se realizaron varios controles en los que se estudió el efecto independiente de HDL o LPDS, o de su combinación, sobre el GSH de las células parenquimatosas. En la Figura IV-61 se han representado los valores de GSH obtenidos tras la adición en las condiciones descritas de HDL, LPDS o ambos componentes del suero a los cultivos (en cada caso se sustituyeron el resto de los componentes por el volumen correspondiente de tampón).

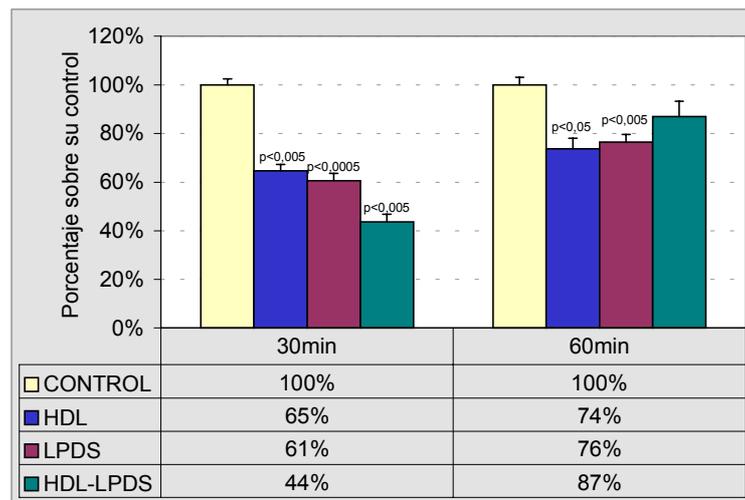


Figura IV-61: Efecto de HDL y LPDS sobre el contenido en tGSH de cultivos primarios de células parenquimatosas

Los valores de GSH intracelular en situación control se hallan representados en la Figura IV-33. Como se puede observar tanto las HDL como el suero deficiente en proteínas tienen un efecto significativo y de magnitud similar reduciendo el contenido intracelular de GSH de las células parenquimatosas cultivadas. Esta reducción es más pronunciada a tiempos cortos si bien sigue siendo significativa tras 60min. La adición de HDL y LPDS conjuntamente provoca a los 30min una disminución mayor que cada uno por separado, sin embargo este efecto deja de ser significativo a 60min.

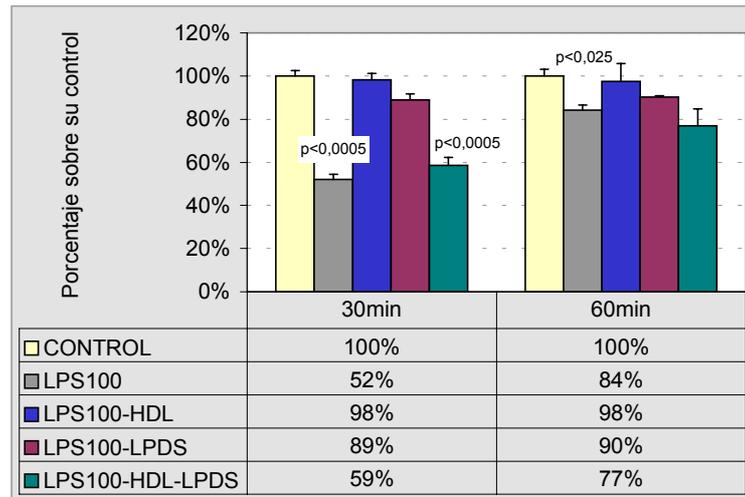


Figura IV-62: Efecto de complejos preparados con LPS y HDL/LPDS sobre el contenido en tGSH de cultivos primarios de células parenquimatosas, la dosis final de LPS en los cultivos es 100µgLPS/ml.

En la Figura IV-62 se observa que a los dos tiempos estudiados la incubación de las células con complejos LPS-HDL o LPS-LPDS no modifica los valores de GSH intracelular pero hace desaparecer los efectos directos del LPS. Sin embargo, la incubación del LPS con las HDL en presencia de LPDS provoca en las células a 30min una disminución significativa de los niveles de GSH similar a la producida por el LPS en solitario. A los 60min de incubación la disminución producida por el complejo LPS-HDL/LPDS también de la misma magnitud que la provocada por el LPS, ya no es significativa.

Independientemente, LPS, HDL y LPDS provocan una disminución en los niveles de GSH de similar magnitud. Tanto HDL como LPDS son capaces de neutralizar los efectos directos del LPS sobre el contenido en GSH de las células de forma continuada durante los 60min de cultivo. Sin embargo la presencia de LPDS conjuntamente con HDL anulan este efecto neutralizador, al menos en cuanto a los niveles intracelulares de GSH. Es evidente que las interacciones estudiadas son muy complejas y que todos los componentes estudiados influyen en los niveles de GSH intracelular. Una segunda conclusión se deriva del hecho de que los efectos biológicos de la interacción del LPS con las células parenquimatosas dependen de factores presentes tanto en las lipoproteínas como en el suero deficiente en proteínas.

IV.8. ESTUDIO *IN VITRO* DE LA UNIÓN DE LPS-FITC A CÉLULAS HEPÁTICAS

La cascada de procesos celulares desencadenados durante el *shock* endotóxico se inicia con la unión del LPS a la superficie celular. En estudios previos se han analizado las

características de la interacción del LPS con eritrocitos⁴³⁴⁻⁴³⁶, plaquetas^{25,437}, granulocitos⁵, linfocitos⁶⁴, células parenquimatosas hepáticas¹³⁹, células adrenocorticales⁵⁰ y pneumocitos alveolares tipo II⁵¹. Se ha descrito la unión del LPS a distintas proteínas de la superficie celular destacando la participación del receptor CD14 expresado por monocitos, macrófagos y leucocitos polimorfonucleares¹²⁵. La unión de la endotoxina a CD14, acelerada en presencia de LBP desencadena un gran número de respuestas celulares pero el mecanismo de transducción de la señal todavía no ha podido ser elucidado. Por otro lado numerosas células no poseen CD14 y responden a la presencia de LPS, bien por la presencia de CD14 soluble en suero añadido, o bien por otros mecanismos independientes de suero^{125,438}. Entre los tipos celulares que han demostrado responder al LPS en ausencia de componentes del suero se encuentran células parenquimatosas^{45,50}, plaquetas⁴³⁷, células endoteliales hepáticas y células de Kupffer¹¹⁰. Con el fin de profundizar en el estudio de la interacción de la endotoxina con las células sinusoidales hepáticas, principales implicadas en su captación y eliminación, uno de los objetivos del presente trabajo ha sido conocer las características de unión del LPS tanto a células endoteliales hepáticas como a células de Kupffer. Un aspecto a destacar es que las primeras carecen, en principio, de CD14 en su superficie y las segundas se caracterizan por ser los macrófagos con menor expresión constitutiva de CD14⁴³⁸.

IV.8.1. ESTUDIO DE LA INCORPORACIÓN SIMULTÁNEA DE LPS-FITC EN CÉLULAS DE KUPFFER Y ENDOTELIALES

Para realizar el estudio de las características de unión del LPS a estos tipos celulares se ha diseñado un nuevo método que permite detectar la unión del LPS a Ec o Kc en suspensiones celulares mixtas. De esta manera ambos tipos celulares compiten por la captación del LPS tal como ocurre *in vivo*. El método utilizado consiste en un doble marcaje fluorescente que permite medir simultáneamente la unión de endotoxina a Kc y Ec por citometría de flujo en suspensiones mixtas con una proporción celular relativa similar a la encontrada *in vivo*. La población de Kc se marca con el anticuerpo monoclonal específico para macrófagos de rata ED1 conjugado con R. Ficoeritrina (PE), evaluando a continuación la unión de LPS marcado con isotiocianato de fluoresceína (FITC- LPS) a Ec y Kc/ED1-PE simultáneamente por citometría de flujo.

El citómetro de flujo utilizado permite la medición simultánea de dos emisiones de fluorescencia a longitudes de onda distintas. De esta manera es posible evaluar simultáneamente la fluorescencia emitida por el LPS-FITC que interaccionara con las células y el ED1-PE del

marcaje específico de las células de Kupffer. La Figura IV-63 muestra la fluorescencia emitida en la longitud de onda del FITC (FL1) y de la PE (FL2) de suspensiones de células control (en ausencia de FITC-LPS).

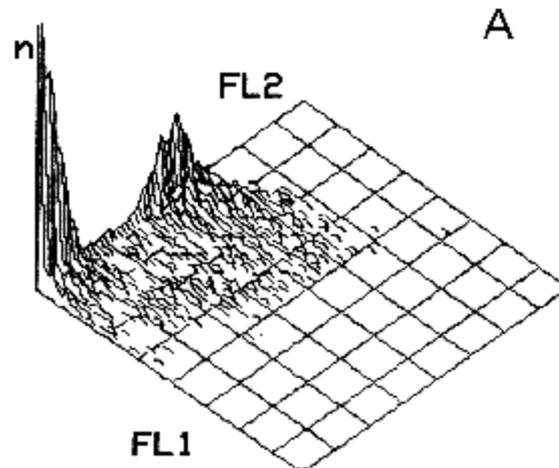


Figura IV-63: Análisis por citometría de flujo de células endoteliales y células de Kupffer marcadas con ED1-PE. La fluorescencia emitida por ficoeritrina (PE) se ha representado en el eje FL2. El eje FL1 corresponde a la emisión en la longitud de onda correspondiente a la fluorescencia del FITC.

En la Figura IV-63 se demuestra que ambas poblaciones, Ec y Kc, se pueden identificar claramente por la emisión fluorescente de la PE del anticuerpo monoclonal unido a las Kc (FL2). También se demuestra que las células estudiadas no emiten fluorescencia basal significativa en la longitud de onda de emisión del FITC, lo que permite reconocer específicamente el FITC-LPS unido a las células en ensayos posteriores.

Tras los análisis preliminares las suspensiones mixtas fueron tratadas durante 2 minutos con 10 y 100 μ gFITC-LPS/ml y se evaluó la fluorescencia emitida en los canales FL1 y FL2.

Como se puede observar en la Figura IV-64 y la Figura IV-65 el LPS-FITC se unió rápidamente a ambos tipos celulares, lo que incrementa su emisión en el canal FL1 de forma dependiente de la dosis. En la Figura IV-66 se ha representado el número de células frente a la fluorescencia emitida por el LPS-FITC, FL1, asociada a cada tipo celular tras 2min de tratamiento con 10 y 100 μ gFITC-LPS/ml. También se han representado en esta figura los porcentajes de Ec y Kc con valores de fluorescencia FL1 por encima de los valores basales.

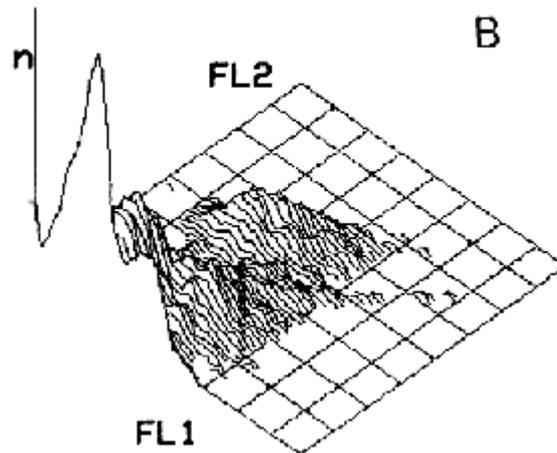


Figura IV-64: Análisis por citometría de flujo de la unión de 10µg LPS-FITC a células endoteliales y de Kupffer

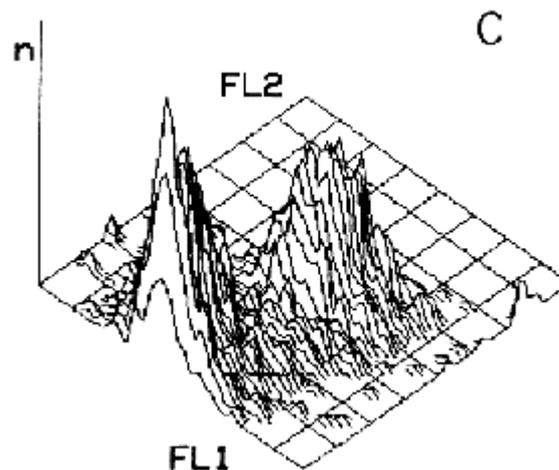


Figura IV-65: Análisis por citometría de flujo de la unión de 100µg LPS-FITC a células endoteliales y de Kupffer

Se puede concluir que la unión a ambos tipos celulares depende de la dosis y que es mayor en las células de Kupffer que en las endoteliales. Se demuestra que la unión es independiente de LBP del suero, lo que puede explicar, en parte, que tanto la liberación de citoquinas^{438,439} como el desarrollo del *shock* endotóxico *in vivo* sean independientes de suero y de CD14⁴³⁹. Este tipo de respuesta puede tener una significación biológica ya que se ha demostrado inmunohistoquímicamente que las Kc expresan muy bajos niveles de CD14 en estado basal^{440,441}. Se ha descrito, sin embargo, que las Kc de animales endotoxémicos son fenotípica y funcionalmente distintas respecto a su expresión de CD14⁴⁴².

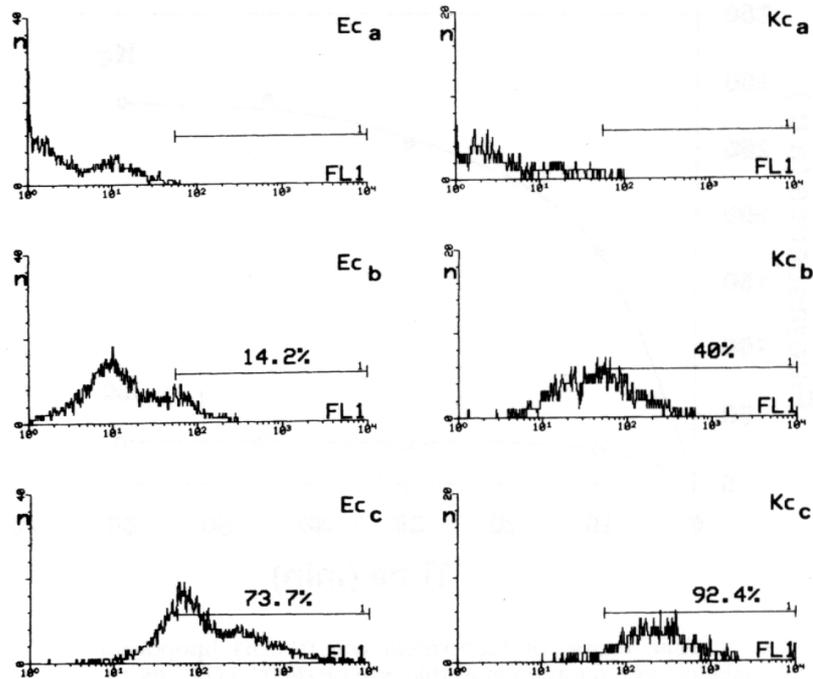


Figura IV-66: Análisis por citometría de flujo de la unión de FITC-LPS a células endoteliales y de Kupffer. Se ha representado el número de células (n) frente a la fluorescencia emitida por el FITC-LPS (FL1) asociada con cada tipo celular. (a) Control sin FITC-LPS. Las células fueron incubadas durante 2min con (b) 10 y (c) 100µgFITC-LPS/ml. Los porcentajes de Ec y Kc con FL1 superior al nivel basal fueron calculados con el programa LYSYS II. Se ha representado un experimento representativo de tres realizados.

IV.8.1.1. CINÉTICA DE INCORPORACIÓN DE FITC-LPS

Para conocer la diferente dependencia temporal de la unión del FITC-LPS a las células endoteliales y de Kupffer se incubó la suspensión celular con 100µg FITC-LPS/ml en ausencia de suero durante diferentes tiempos (10, 30, 45 y 60min), y se midió simultáneamente la fluorescencia emitida por el FITC unido al LPS y la fluorescencia correspondiente a la PE asociada a las Kc por medio del anticuerpo monoclonal ED1.

Como se puede observar en la Figura IV-67, la unión del FITC-LPS a las células endoteliales y de Kupffer aumenta con el tiempo hasta alcanzar una meseta entre 30 y 45min respectivamente. Tras 45min la contribución de las Kc a la eliminación de la endotoxina es diez veces superior que la de las células endoteliales, a pesar de que tan sólo constituyen el 30% de la población total.

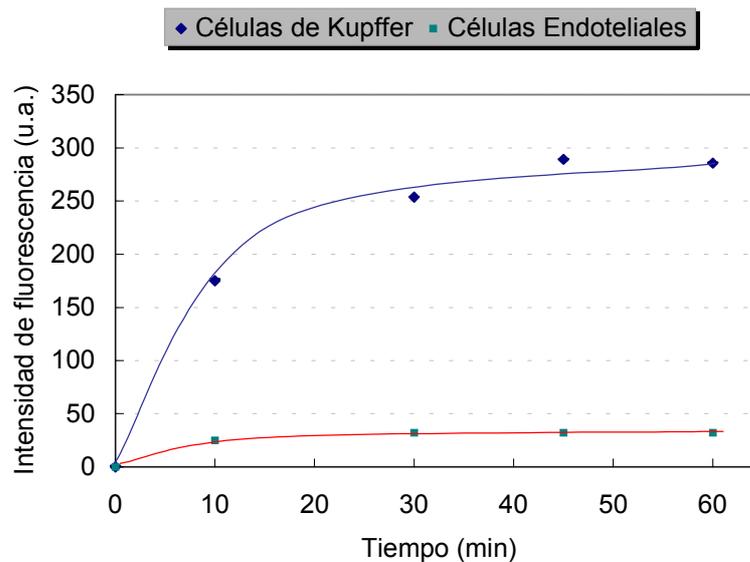


Figura IV-67: Cinética de incorporación de FITC-LPS a células endoteliales y de Kupffer marcadas con PE-ED1. Las suspensiones mixtas de células (70% Ec, 30% Kc) han sido tratadas con 100 μ gFITC-LPS/ml durante diferentes tiempos. Las intensidades de fluorescencia del FITC y de la PE fueron evaluadas por citometría de flujo. Los datos representados son la intensidad de fluorescencia media del FITC-LPS asociado con cada tipo celular frente el tiempo de incubación. Se ha representado los valores de un experimento representativo de tres similares.

Dado que la interacción de ambos tipos celulares con el LPS es rápida, también se ensayaron tiempos cortos de incubación (30s a 10min). La especificidad de la unión se evaluó incubando las células con FITC-LPS tanto en la ausencia (unión total) como en presencia de un exceso diez veces mayor de LPS no marcado (unión no específica) en medio libre suero. La unión específica del FITC-LPS se ha determinado como la diferencia entre la unión total e inespecífica. Las células endoteliales mostraron unión específica tras 2min de incubación que alcanzó el valor máximo tras 10min (Figura IV-68). Las células de Kupffer muestran unión específica tras 30s de incubación, aumentando gradualmente con el tiempo (Figura IV-69).

Los resultados muestran una unión rápida y específica del LPS a ambos tipos celulares, de forma concordante con su capacidad biológica *in vivo* de eliminación de una gran cantidad de sustancias de la circulación^{99,134,443}. A pesar de constituir tan sólo un 30% de la población total, las células de Kupffer muestran una mayor capacidad de unión de endotoxina. Estos resultados confirman el prominente papel que las células de Kupffer pueden tener como primera línea de defensa durante el *shock endotóxico*.

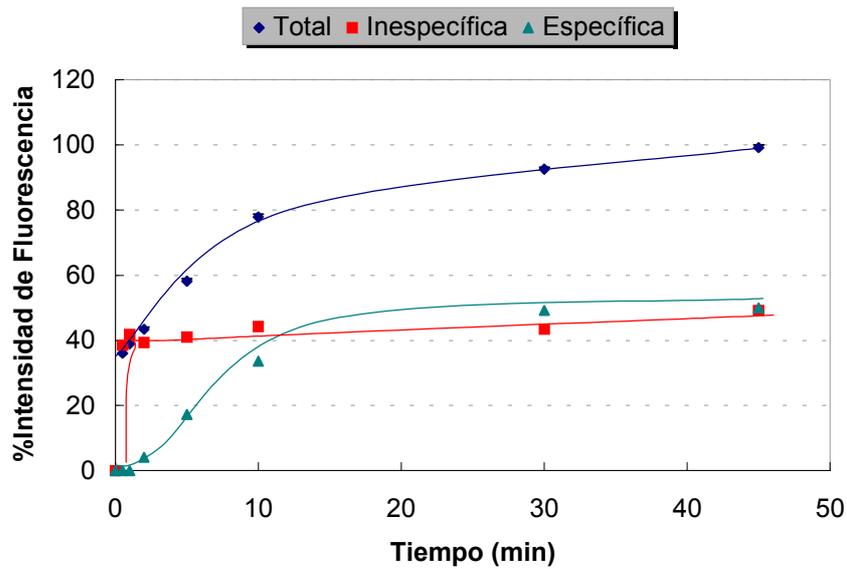


Figura IV-68: Cinética y especificidad de la unión de FITC-LPS a células endoteliales. Las suspensiones celulares fueron incubadas distintos tiempos en ausencia o presencia de LPS no marcado (1 mg/ml) para evaluar la unión total y no específica respectivamente. Los porcentajes están referidos a la máxima cantidad de LPS unido a cada tipo celular.

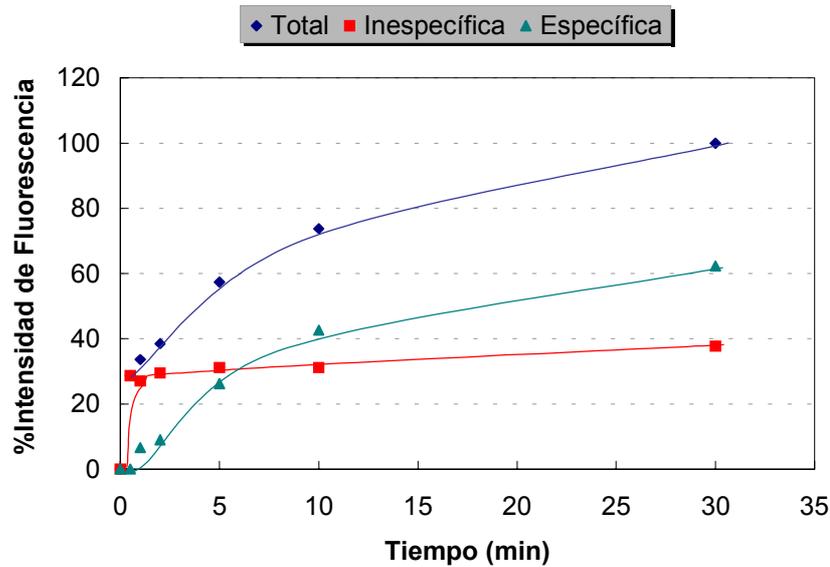


Figura IV-69: Cinética y especificidad de la unión de FITC-LPS a células de Kupffer. Las suspensiones celulares fueron incubadas distintos tiempos en ausencia o presencia de LPS no marcado (1 mg/ml) para evaluar la unión total y no específica respectivamente. Los porcentajes están referidos a la máxima cantidad de LPS unido a cada tipo celular.

IV.8.1.2. CURVA DE SATURACIÓN DE LA INCORPORACIÓN DE FITC-LPS

Se incubaron suspensiones de células endoteliales y de Kupffer marcadas con PE (30%) fueron incubadas durante una hora con dosis crecientes de FITC-LPS tanto en ausencia como en

presencia de LPS fresco (1mg/ml) para evaluar respectivamente la unión total e inespecífica. La unión específica se calculó por diferencia entre la unión total y la inespecífica.

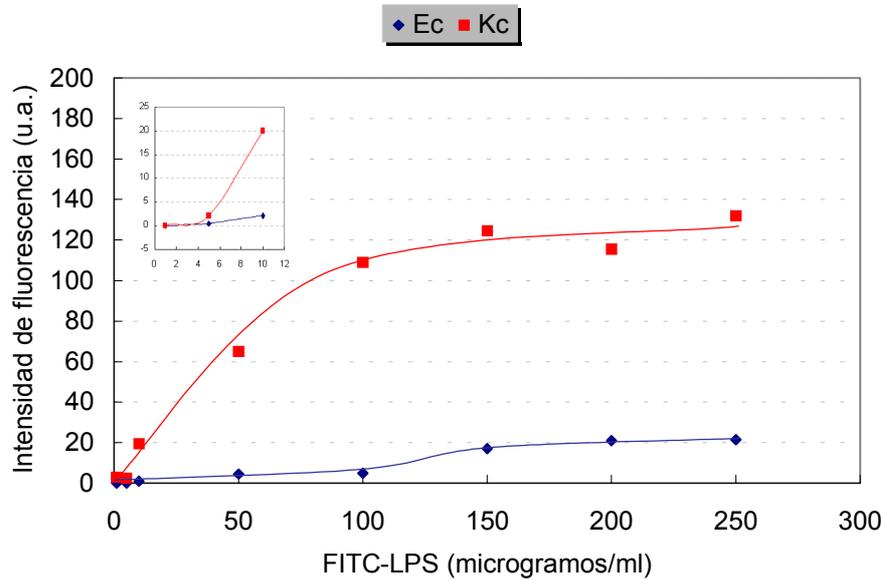


Figura IV-70: Curva de saturación de la unión específica de FITC-LPS a células endoteliales (Ec) y de Kupffer (Kc).

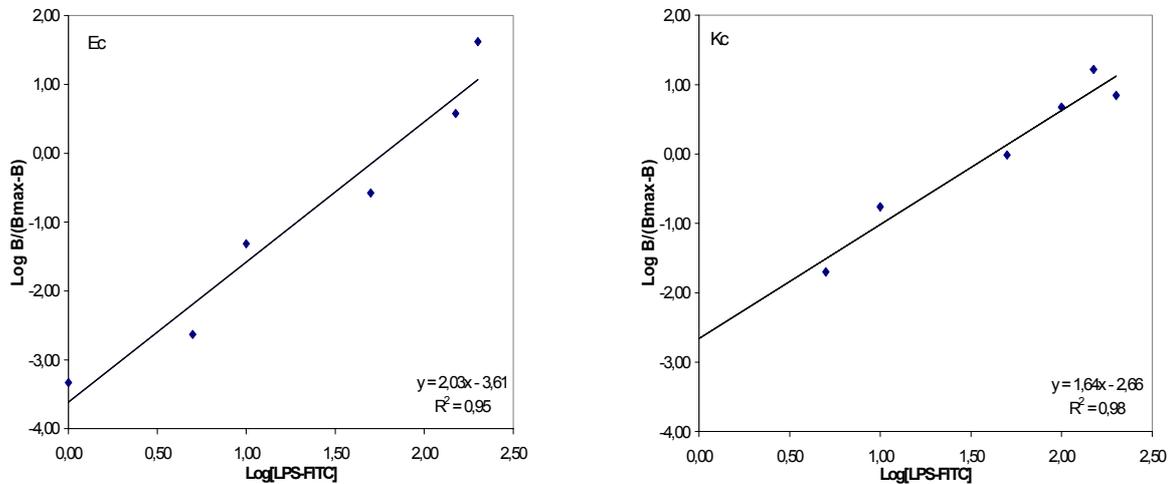


Figura IV-71: Representaciones de Hill de la unión del LPS-FITC a las células endoteliales (Ec) y de Kupffer (Kc). Los coeficientes de Hill se deducen de las pendientes de las rectas cuya ecuación se ha representado en el cuadrante inferior derecho de las gráficas.

Los resultados representados en el inserto de la Figura IV-70 muestran una unión específica de tipo sigmoideo lo que implica que la unión es cooperativa para ambos tipos celulares. De las representaciones de Hill (Figura IV-71) se pueden calcular las constantes de unión de Hill (K_D) como la abcisa cuando $\log B/(B_{max}-B)$ se iguala a cero, en este caso $60,0\mu M$ y $46,2\mu M$ para Ec y Kc respectivamente. Los coeficientes de Hill se deducen de las pendientes de las rectas, 2,0 para Ec y 1,6 para Kc, mostrando cooperatividad positiva en la interacción del

LPS con ambas poblaciones. Los resultados mostrados son una prueba evidente de que la unión específica de la endotoxina a las células endoteliales se produce en ausencia de suero, particularmente a dosis altas. Se han descrito numerosos receptores para el LPS en células endoteliales (73kDa, 220kD o SR-A) y macrófagos (CD14, CD11/CD18, 95kDa, 220kDa, 70kDa, 38kDa), si bien tan sólo algunos provocan una respuesta biológica en la célula^{5,25,64,125}. Sin embargo el número de estos receptores en la superficie celular no dan cuenta de la elevada cantidad de LPS unido⁴⁴⁴. Este hecho, junto con el fracaso en encontrar el mecanismo de transducción de señal de receptores como el CD14 plantean la posibilidad de que el LPS interactúe directamente con ciertos dominios de la membrana plasmática. Recientemente se ha sugerido un papel de la LBP y el CD14 en la aceleración del proceso de transferencia hacia zonas específicas de la bicapa lipídica⁴⁴⁵. El LPS es componente único de las membranas externas de las bacterias Gram negativas y la interacción de una nueva molécula con una zona de la membrana plasmática enriquecida en LPS es por tanto muy favorable. Esta preferencia por unirse a zonas ya portadoras de moléculas idénticas podría explicar la cooperatividad del proceso. La presencia del punto de inflexión a bajas concentraciones en el caso de las células de Kupffer puede estar relacionado con su papel como primera línea de defensa.

IV.8.2. EFECTO DE LAS HDL EN LA CINÉTICA DE INCORPORACIÓN DE FITC-LPS EN CÉLULAS PARENQUIMATOSAS Y SINUSOIDALES

Aunque es bien conocida la acción inhibitoria de las HDL sobre la activación que ejerce el LPS sobre diversos tipos celulares, no se conoce en profundidad su efecto sobre la unión de la endotoxina. En el apartado IV.7 se demuestra que las lipoproteínas modifican las propiedades biofísicas de los agregados de LPS en una primera etapa, para después integrar en su estructura grandes cantidades de estas moléculas enmascarando su toxicidad. Sin embargo los ensayos sobre la influencia de los complejos de LPS - HDL en el contenido de GSH (Apartado IV.7.2) muestran que, en presencia de suero, las HDL no modifican el efecto que la endotoxina ejerce sobre las células parenquimatosas respecto de este parámetro (Figura IV-62). Estos hechos nos sugieren la posibilidad de que la asociación del LPS a las HDL no elimine totalmente su unión a diversos tipos celulares sino que modifique sus características, redirigiéndolo, por ejemplo, hacia diferentes receptores como se ha demostrado con la apolipoproteína E⁴⁴⁶, que es capaz de cambiar el destino final de la endotoxina, de las células de Kupffer hacia las células parenquimatosas.

Con el fin de conocer el efecto de las HDL sobre la interacción de la endotoxina con los distintos tipos celulares hepáticos, se realizaron ensayos de unión de FITC-LPS a células parenquimatosas, células de Kupffer y endoteliales habiendo preincubado la endotoxina con HDL y/o suero pobre en lipoproteínas (LPDS).

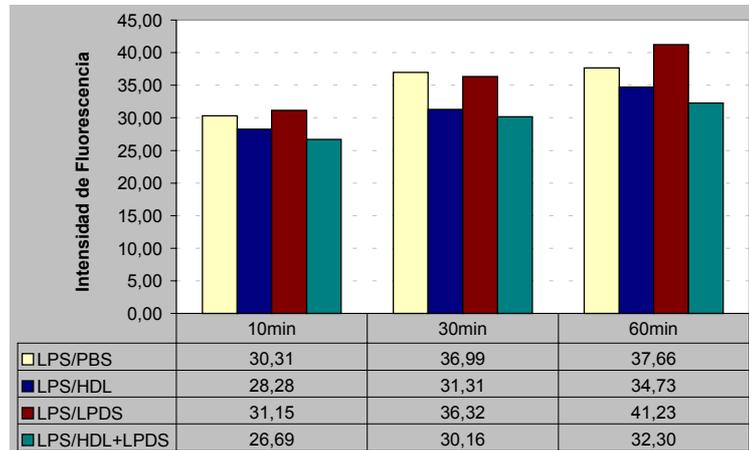


Figura IV-72: Unión total a células parenquimatosas de LPS-FITC preincubado con HDL y/o LPDS

En la Figura IV-72 se observa cómo las HDL provocan un ligero descenso en la unión a todos los tiempos estudiados, un poco más intenso cuando el LPS está preincubado en presencia de HDL y LPDS. Sin embargo el suero pobre en lipoproteínas por si sólo parece activar levemente la unión a 60min. Se ha realizado el desplazamiento de la unión por un exceso de LPS sin marcar.

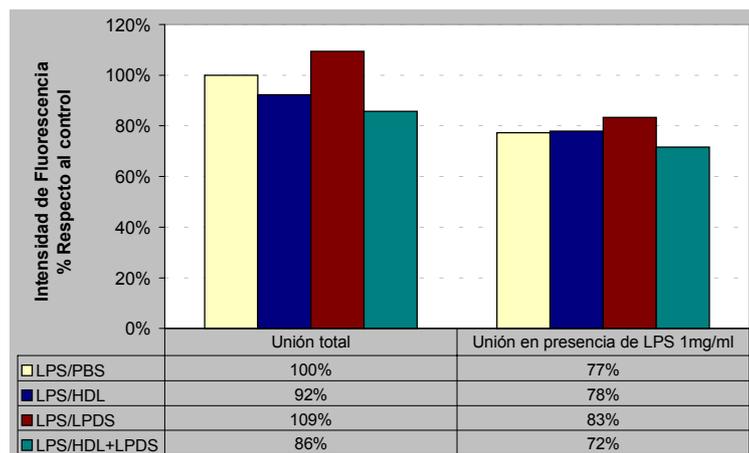


Figura IV-73: Unión total/inespecífica de LPS a células parenquimatosas tras 60min de incubación

Preparación	Unión específica
LPS/PBS	23%
LPS/HDL	15%
LPS/LPDS	24%
LPS/HDL+LPDS	16%

Tabla IV-3: Unión específica de LPS a células parenquimatosas tras 60min de incubación calculada a partir de las uniones total e inespecífica

En la Figura IV-73 se aprecia que el LPS fresco desplaza la unión del LPS-FITC en un 23% para el LPS/PBS y un 24% para el LPS/LPDS, mientras que los valores están entre un 15-16% para las mezclas de LPS en presencia de HDL (LPS/HDL y el LPS/HDL+LPDS). Estas diferencias podrían indicar una modificación en las características de unión por la presencia de las HDL.

La Figura IV-74 recoge los valores obtenidos en el estudio de unión de LPS-FITC a células de Kupffer habiendo preincubado la endotoxina con HDL y/o LPDS.

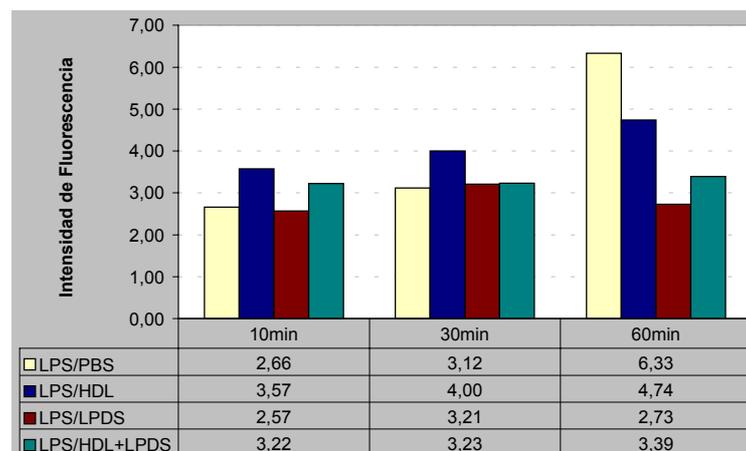


Figura IV-74: Unión total a células de Kupffer de LPS-FITC preincubado con HDL y/o LPDS

Durante los 10 primeros minutos la unión de los complejos LPS-HDL a las células de Kupffer es más rápida que la del LPS sólo o incubado con LPDS. Sin embargo se observa que tanto las HDL como los otros componentes del suero inhiben la unión del LPS a los macrófagos a tiempos superiores a 30min. Estos resultados se correlacionan con el papel del suero en la activación biológica de macrófagos durante los 10 primeros minutos de incubación con LPS para luego inhibir a estas células³²⁰. Se ha comprobado que la utilización de concentraciones saturantes de LPS no marcado apenas modifica la unión del LPS incubado con HDL y/o LPDS.

Resultados similares se encuentran al analizar de forma simultánea la unión a las células endoteliales presentes en la suspensión.

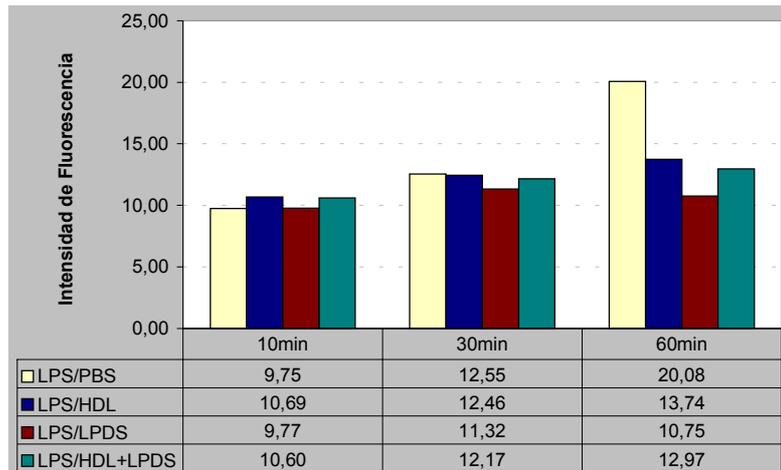


Figura IV-75: Unión total a células endoteliales de LPS-FITC preincubado con HDL y/o LPDS

Si bien las diferencias son mucho menos patentes que en las células de Kupffer durante los primeros minutos a tiempos más largos (60min), la unión del LPS pretratado con HDL y/u otros componentes del suero, se ve significativamente reducida.

Estos resultados apoyan la complejidad del proceso de captación del LPS-FITC que se va a ver afectado tanto por factores relacionados con su estado físico, tales como ultraestructura de los agregados, asociación a lipoproteínas o factores del suero, como por factores relacionados con el tipo y función celular. Parte de los efectos observados pueden estar relacionados con el diferente mecanismo de captación en los distintos tipos celulares⁴⁴⁷.

V. CONCLUSIONES

El estudio de la respuesta hepática al estrés oxidativo desencadenado por la endotoxina de *E.coli* 0111:B4 (LPS) se ha llevado a cabo en el presente trabajo utilizando distintos modelos experimentales con el fin de caracterizar la acción del LPS *in vivo* sobre sistemas antioxidantes hepáticos y séricos y poder diferenciar *in vitro* los efectos directos del LPS de los efectos producidos por distintos mediadores de la acción endotóxica. El posible papel protector de las HDL ha sido también evaluado en este estudio.

Los resultados obtenidos *in vivo* con el modelo de **shock endotóxico reversible** en rata e *in vitro* con la utilización de distintas poblaciones celulares hepáticas, conducen a las conclusiones que se detallan a continuación en cada apartado.

A. Acción del LPS *in vivo* sobre sistemas antioxidantes hepáticos y séricos:

- A.1. Los niveles de glutatión aumentan en el hígado durante la fase aguda el **shock endotóxico** como mecanismo de compensación el gasto de glutatión reducido ante el estrés oxidativo provocado por la endotoxina durante la fase aguda.
- A.2. La actividad de la enzima superóxido dismutasa mitocondrial (Mn-SOD) hepática aumenta durante la fase aguda en paralelo con el glutatión oxidado intrahepático demostrando una pronuncada modulación de la Mn-SOD en respuesta al estado redox de la célula.
- A.3. La actividad de la enzima catalasa hepática está disminuida a todos los tiempos estudiados apoyando la posible formación de complejos catalasa-H₂O₂.
- A.4. El estudio de los niveles de glutatión reducido en plasma permite observar: un aumento durante la fase aguda procedente del hígado para su distribución a los tejidos periféricos que induce una pronunciada disminución en la relación GSSG/GSH en la fase de recuperación temprana, volviendo a los niveles normales a las 48h. Estos resultados ponen de manifiesto el papel principal del sistema glutatión en la respuesta antioxidante ante la endotoxina.

Todo ello demuestra la importancia de los mecanismos de defensa antioxidante del hígado durante el **shock endotóxico** e indica la posible utilidad de los niveles de glutatión plasmático como indicador de la fase aguda del proceso. Los experimentos *in*

vivo no permiten diferenciar entre el efecto directo o debido a mediadores de la acción endotóxica, por lo que se analizó la acción del LPS *in vitro* con el objeto de profundizar en sus mecanismos de acción sobre el tejido hepático y el suero.

B. Acción directa del LPS sobre distintos tipos celulares hepáticos:

B.1. El LPS aumenta directamente el glutatión en células parenquimatosas cultivadas, manteniendo el índice GSSG/tGSH extremadamente bajo. El aumento en la capacidad reductora intracelular observada *in vivo* parece ser una acción directa del LPS sobre los hepatocitos. El índice GSSG/tGSH y los niveles de glutatión oxidado no se correlacionan con la generación de radicales libres demostrada por la peroxidación lipídica existente en el modelo utilizado.

B.2. El LPS provoca descensos en la actividad glutatión peroxidasa de las células parenquimatosas que justifican la peroxidación lipídica inducida por el LPS. La actividad glutatión reductasa es modulada de manera transitoria por efecto directo del LPS a tiempos cortos pero no a tiempos superiores a 1h.

B.3. Tanto las HDL como el LPDS son capaces de neutralizar los efectos directos del LPS sobre el contenido de GSH de las células parenquimatosas. Se ha comprobado que, sin embargo, la presencia del LPDS conjuntamente con las HDL anula este efecto neutralizador. Como se ha demostrado en el presente trabajo, la interacción HDL-LPS ocurre en varias etapas y está autorregulada. La primera etapa es rápida y culmina tras 10 minutos de interacción, durante los cuales probablemente la actividad LBP/Septina presente en las HDL provoca la transferencia de lípidos hacia los agregados de endotoxina induciendo una disminución en su tamaño y un aumento en la homogeneidad de los mismos. La interacción del LPS con las HDL y sus efectos biológicos dependen de factores presentes tanto en las propias lipoproteínas como en el suero deficiente en proteínas. Los resultados apuntan a la implicación de las VHDL presentes en la fracción de alta densidad del suero.

B.4. El diseño de experimentos de doble marcaje con anticuerpos monoclonales frente a células de Kupffer marcados con ficoeritrina y LPS marcado con FITC ha permitido evaluar por primera vez mediante citometría de flujo la unión simultánea de la endotoxina a las células de Kupffer y endoteliales en

suspensiones mixtas. En estos estudios se ha comprobado que las células de Kupffer tienen un papel prominente en la captación del LPS frente a las células endoteliales, en consonancia con su papel como primera línea de defensa. La unión de LPS a las células sinusoidales es independiente de suero, es decir de LPB y del receptor CD14, y es cooperativa. La cooperatividad de esta unión se debe, probablemente, a que la inserción de la endotoxina en zonas de la membrana donde ya se encuentran otras moléculas de LPS unidas está muy favorecida por las características fisicoquímicas de la endotoxina. La formación de complejos LPS-HDL modifica la unión del LPS a los tres tipos celulares estudiados implicando probablemente a receptores o zonas de unión diferentes.

C. Efectos de mediadores de la acción endotóxica sobre células parenquimatosas:

C.1. El factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y la interleuquina 1 β (IL-1 β) modulan el sistema glutatión de las células parenquimatosas disminuyendo el contenido intracelular del tripéptido.

C.2. La actividad glutatión peroxidasa se reduce por acción de ambas citoquinas contribuyendo a la peroxidación lipídica presente en el **shock endotóxico**. La inhibición de la GPx producida por LPS y citoquinas no permite la utilización intracelular normal del GSH.

C.3. La activación de las células sinusoidales intensifica la modulación del contenido intracelular de glutatión de las células parenquimatosas haciendo disminuir sus niveles. Además existe una retroalimentación por parte de éstas últimas que refuerza la modulación ejercida por las células sinusoidales. Los mediadores de las células sinusoidales implicados son de liberación rápida, menos de 15min, y relativamente lábiles, sus efectos sobre los hepatocitos han remitido tras 60min. Los agentes más probables son derivados del ácido araquidónico y/o radicales libres.

En el presente trabajo se demuestra *in vitro* que la relación GSSG/tGSH no se correlaciona con la existencia de estrés oxidativo producido *in vivo* por LPS o TNF- α . Este hecho sugiere un papel diferente para el índice GSSG/tGSH en células parenquimatosas, independiente del estado redox de la célula, pudiendo estar implicado en la regulación de la homeostasis de la glucosa como tercer mensajero.

VI. BIBLIOGRAFÍA

1. Hinshaw, L. B. y Crankshaw, D. L., (1972) *The fundamental Mechanisms of Shock*. Hinshaw, L. B. y Cox, B. G. Eds. (Plenum Press, New York).
2. *Neurohormonal and Metabolic Aspects of Injury*, (1973) Kovach, A. G. B., Stoner, H. B., y Spitzer, J. J. Eds. (Plenum Press, New York).
3. Hinshaw, L. B., Beller-Tood, B. K., Archer, L. T., Peyton, M. D., (1983) en *Handbook of shock and trauma*, Altura, B. M., Ed. (Raven Press, New York) .
4. Berry, L. J. (1977) Bacterial toxins, *CRC Crit Rev.Toxicol.* **5**: 239-318 .
5. Springer, G. F. y Adye, J. C. (1975) Endotoxin-binding substances from human leukocytes and platelets, *Infect.Immun.* **12**: 978-986 .
6. Bone, R. C. (1991) The pathogenesis of sepsis, *Ann.Intern.Med.* **115**: 457-469 .
7. Bone, R. C. (1993) Why new definitions of sepsis are needed, *Am.J.Med.* **95**: 348-350 .
8. Natanson, C., Danner, R. L., Elin, R. J., Hosseini, J. M., Peart, K. W., Banks, S. M., MacVittie, T. J., Walker, R. I., Parrillo, J. E. (1989) Role of endotoxemia in cardiovascular dysfunction and mortality. Escherichia coli and Staphylococcus aureus challenges in a canine model of human septic shock, *J.Clin.Invest* **83**: 243-251 .
9. Fink, M. P. y Heard, S. O. (1990) Laboratory models of sepsis and septic shock, *J.Surg.Res.* **49**: 186-196 .
10. Ravin, H. A., Rowley, D., Jenkins, C., Fine, J. (1960) On the absorption of bacterial endotoxin from the gastro-intestinal tract of the normal and shocked animal, *J.Exp.Med.* **112**: 789-90 .
11. Center for Disease Control (1998) Clinical Sepsis and death in a newborn nursery associated with contaminated parenteral medications. Brazil, 1996, *MMWR* **47**: 610-2 .

12. Cavanagh, D., Rao, P. S., y Comas, M. R., (1977) *Major Problems in Obstetrics and Gynecology*. Saunders, W. B. Philadelphia), pp. 1-129.
13. Oettinger, W., Berger, D., Beger, H. G. (1987) The clinical significance of prostaglandins and thromboxane as mediators of septic shock, *Klin.Wochenschr.* **65**: 61-68 .
14. Burrell, R. (1994) Human responses to bacterial endotoxin, *Circ.Shock* **43**: 137-153 .
15. Danner, R. L., Elin, R. J., Hosseini, J. M., Wesley, R. A., Reilly, J. M., Parillo, J. E. (1991) Endotoxemia in human septic shock, *Chest* **99**: 169-175 .
16. Beisel, W. R. (1975) Metabolic response to infection, *Annu.Rev.Med.* **26**: 9-20 .
17. Hinshaw, L. B., Archer, L. T., Greenfield, L. J., Miller, J. A., Guenter, C. A. (1972) Effect of endotoxin on myocardial performance, *J.Trauma* **12**: 1056-1062 .
18. Hinshaw, L. B., Brackett, D. J., Archer, L. T., Beller, B. K., Wilson, M. F. (1983) Detection of the 'hyperdynamic state' of sepsis in the baboon during lethal E. coli infusion, *J.Trauma* **23**: 361-365 .
19. Nishijima, H., Weil, M. H., Shubin, H., Cavanilles, J. (1973) Hemodynamic and metabolic studies on shock associated with gram negative bacteremia, *Medicine (Baltimore)* **52**: 287-294 .
20. Weil, P. H. y Steichen, F. M. (1972) The management of shock due to penetrating wounds, *Bull.Soc.Int.Chir* **31**: 356-364 .
21. Hinshaw, L. B., Beller-Tood, B. K., Archer, L. T., Peyton, M. D., (1983) en *Handbook of shock and trauma*, Altura, B. M., Ed. (Raven Press, New York) .
22. Majerus, T. C. (1984) Overview of shock, *Arch.Int.Physiol Biochim.* **92**: S1-S4 .
23. Hale, D. J., Robinson, J. A., Loeb, H. S., y Gunnar, R. M., (1986) *Handbook of Endotoxin*. Proctor, R. A. Eds. (Elsevier Science Publications, Amsterdam), pp. 1-17.
24. Zimmerman, J. J. y Dietrich, K. A. (1987) Current perspectives on septic shock, *Pediatr.Clin.North Am.* **34**: 131-163 .

25. Morrison, D. C. y Oades, Z. G. (1979) Mechanisms of lipopolysaccharide-initiated rabbit platelet responses. II. Evidence that lipid A is responsible for binding of lipopolysaccharide to the platelet, *J.Immunol.* **122**: 753-758 .
26. Waisbren, B. A. (1951) *Arch.Intern.Med.* **88**: 784-789 .
27. McCabe, W. R. (1974) Gram-negative bacteremia, *Adv.Intern.Med.* **19**: 135-158 .
28. Schumer, W. (1979) Septic shock, *JAMA* **242**: 1906-1907 .
29. Veterans Administration Cooperative Study, "Evaluation of corticosteroid therapy in severe sepsis" *Informe N.º. 209* (Veterans Administration, Washington D.C., 1983).
30. Leading Causes of Death (2000), *National Vital Statistics Reports* **48**: 6-9 .
31. Martin, C., Viviani, X., Leone, M., Thirion, X. (2000) Effect of norepinephrine on the outcome of septic shock, *Crit Care Med.* **28**: 2758-2765 .
32. Annane, D., Sebille, V., Troche, G., Raphael, J. C., Gajdos, P., Bellissant, E. (2000) A 3-level prognostic classification in septic shock based on cortisol levels and cortisol response to corticotropin, *JAMA* **283**: 1038-1045 .
33. Honore, P. M., Jamez, J., Wauthier, M., Lee, P. A., Dugernier, T., Pirenne, B., Hanique, G., Matson, J. R. (2000) Prospective evaluation of short-term, high-volume isovolemic hemofiltration on the hemodynamic course and outcome in patients with intractable circulatory failure resulting from septic shock, *Crit Care Med.* **28**: 3581-3587 .
34. Brauner, J. S., Rohde, L. E., Clausell, N. (2000) Circulating endothelin-1 and tumor necrosis factor-alpha: early predictors of mortality in patients with septic shock, *Intensive Care Med.* **26**: 305-313 .
35. Wichmann, M. W., Inthorn, D., Andress, H. J., Schildberg, F. W. (2000) Incidence and mortality of severe sepsis in surgical intensive care patients: the influence of patient gender on disease process and outcome, *Intensive Care Med.* **26**: 167-172 .

36. Venet, C., Zeni, F., Viallon, A., Ross, A., Pain, P., Gery, P., Page, D., Vermesch, R., Bertrand, M., Rancon, F., Bertrand, J. C. (2000) Endotoxaemia in patients with severe sepsis or septic shock, *Intensive Care Med.* **26**: 538-544 .
37. Flores, J. M., Jimenez, P. I., Rincon, M. D., Marquez, J. A., Navarro, H., Arteta, D., Murillo, F. (2001) Early risk factors for sepsis in patients with severe blunt trauma, *Injury* **32**: 5-12 .
38. Garcia-Barreno, P., Balibrea, J. L., Aparicio, P. (1978) Blood coagulation changes in shock, *Surg.Gynecol.Obstet.* **147**: 6-12 .
39. Garcia-Barreno, P. y Balibrea, J. L. (1978) Metabolic response in shock, *Surg.Gynecol.Obstet.* **146**: 182-189 .
40. 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 .
41. Traber, D. L. (2000) Animal models: the sheep, *Crit Care Med.* **28**: 591-592 .
42. Vergani, G., Portoles, M. T., Pagani, R. (1999) Escherichia coli lipopolysaccharide effects on proliferating rat liver cells in culture: a morphological and functional study, *Tissue Cell* **31**: 1-7 .
43. Pagani, R., Portoles, M. T., Arahuetes, R., Ainaga, M. J., Machin, C., Rua, C. (1996) Comparative in vivo and in vitro models to approach the cellular basis of endotoxic shock. The role of sinusoidal liver cells, *Histol.Histopathol.* **11**: 597-606 .
44. Kielian, T. L., Ross, C. R., McVey, D. S., Chapes, S. K., Blecha, F. (1995) Lipopolysaccharide modulation of a CD14-like molecule on porcine alveolar macrophages, *J.Leukoc.Biol.* **57**: 581-586 .
45. Portoles, M. T., Ainaga, M. J., Pagani, R. (1993) The induction of lipid peroxidation by E. coli lipopolysaccharide on rat hepatocytes as an important factor in the etiology of endotoxic liver damage, *Biochim.Biophys.Acta* **1158**: 287-292 .

46. Luderitz, T., Brandenburg, K., Seydel, U., Roth, A., Galanos, C., Rietschel, E. T. (1989) Structural and physicochemical requirements of endotoxins for the activation of arachidonic acid metabolism in mouse peritoneal macrophages in vitro, *Eur.J.Biochem.* **179**: 11-16 .
47. Morel, D. W., DiCorleto, P. E., Chisolm, G. M. (1986) Modulation of endotoxin-induced endothelial cell toxicity by low density lipoprotein, *Lab Invest* **55**: 419-426 .
48. Enriquez de Salamanca, A., Portoles, M. T., Garcia, R. (2000) Binding of Escherichia coli lipopolysaccharide to fasciculata- reticularis and glomerulosa cells evaluated by flow cytometry, *J.Cell Biochem.* **79**: 386-394 .
49. Garcia, R., Enriquez de Salamanca, A., Portoles, M. T. (1999) Calcium and reactive oxygen species as messengers in endotoxin action on adrenocortical cells, *Biochim.Biophys.Acta* **1454**: 1-10 .
50. Garcia, R., Vilorio, M. D., Municio, A. M. (1985) Influence of E. coli endotoxin on ACTH induced adrenal cell steroidogenesis, *J.Steroid Biochem.* **22**: 377-385 .
51. Aracil, F. M., Bosch, M. A., Municio, A. M. (1985) Influence of E. coli lipopolysaccharide binding to rat alveolar type II cells on their functional properties, *Mol.Cell Biochem.* **68**: 59-66 .
52. Benito, E., Portoles, M. T., Bosch, M. A. (2000) Involvement of calcium in the stimulation of phosphatidylcholine secretion in primary cultures of rat type II pneumocytes by Escherichia coli lipopolysaccharide, *Mol.Cell Biochem.* **205**: 39-44 .
53. Boivin, A., Mesrobian, I., Mesrobian, L. (1933) Technic of the preparation of the specific polysaccharides of bacteria, *C.R.Soc.Biol.* **113**: 490-492 .
54. Tesh, V. L., Duncan, R. L., Jr., Morrison, D. C. (1986) The interaction of Escherichia coli with normal human serum: the kinetics of serum-mediated lipopolysaccharide release and its dissociation from bacterial killing, *J.Immunol.* **137**: 1329-1335.

55. Hitchcock, P. J., Leive, L., Makela, P. H., Rietschel, E. T., Strittmatter, W., Morrison, D. C. (1986) Lipopolysaccharide nomenclature--past, present, and future, *J.Bacteriol.* **166**: 699-705 .
56. Berry, L. J. (1982) Pathogenesis of atoxinogenic strains of gram--negative bacteria--a hypothesis, *Klin.Wochenschr.* **60**: 693-695 .
57. Rietschel, E. T., Schade, U., Jensen, M., Wollenweber, H. W., Luderitz, O., Greisman, S. G. (1982) Bacterial endotoxins: chemical structure, biological activity and role in septicaemia, *Scand.J.Infect.Dis.Suppl* **31**: 8-21 .
58. Bladen, H. A. y Hampp, E. G. (1964) Ultrastructure of *Treponema microdentium* and *Borrelia vincentii*, *J.Bacteriol.* **87**: 1180-1191 .
59. Westphal, O., Luderitz, O., Bister, F. (1952) Extraction of bacteria with phenol/water, *Naturforsch.* **7b**: 148-155 .
60. Luderitz, O., Freudenberg, M., Galanos, C., Lehmann, V., Rietschel, E. T., y Shaw, D. H., (1982) *Membrane lipids of prokaryotes. Current topics in membranes and transport.* Razin, S. y Rottem, S. Eds. (Academic Press Inc., New York), p. 79.
61. Rietschel, E. T., Brade, L., Brandenburg, K., Flad, H. D., Jong-Leuveninck, J., Kawahara, K., Lindner, B., Loppnow, H., Luderitz, T., Schade, U., . (1987) Chemical structure and biologic activity of bacterial and synthetic lipid A, *Rev.Infect.Dis.* **9 Suppl 5**: S527-S536 .
62. Brade, H., Brade, L., Schade, U., Zähringer, U., Holst, O., Kuhn, H. M., Rozalski, A., Rohrscheidt, E., y Rietschel, E. T., (1988) *Bacterial Endotoxins: Pathophysiological Effects, Clinical Significance and Pharmacological Control, Progress in Clinical Biological Research.* Levin, J., van Deventer, S. J. H., y Sturk Eds. (Alan R. Liss, New York, ed. 1), pp. 17-45.
63. Fox, E. S., Broitman, S. A., Thomas, P. (1990) Bacterial endotoxins and the liver, *Lab Invest* **63**: 733-741 .
64. Kabir, S. y Rosenstreich, D. L. (1977) Binding of bacterial endotoxin to murine spleen lymphocytes, *Infect.Immun.* **15**: 156-164 .

65. Richardson, E. C. y Alving, C. R. (1984) Mitogenic response of lymphocytes from C3H/HeJ mice in the presence of lipid A and lipid A fractions, *Rev.Infect.Dis.* **6**: 532-534 .
66. Rietschel, E. T., Brade, H., Brade, L., Brandenburg, K., Schade, U., Seydel, U., Zahringer, U., Galanos, C., Luderitz, O., Westphal, O. (1987) Lipid A, the endotoxic center of bacterial lipopolysaccharides: relation of chemical structure to biological activity, *Prog.Clin.Biol.Res.* **231**: 25-53 .
67. Yoshida, M., Hirata, M., Inada, K., Tsunoda, N., Kirikae, T., Onodera, T., Ishikawa, Y., Sasaki, O., Shiba, T., Kusumoto, S. (1989) Endotoxic properties of chemically synthesized lipid A analogs. Studies on six inflammatory reactions in vivo, and one reaction in vitro, *Microbiol.Immunol.* **33**: 797-810 .
68. Fox, E. S., Thomas, P., Broitman, S. A. (1988) Uptake and modification of ¹²⁵I-lipopolysaccharide by isolated rat Kupffer cells, *Hepatology* **8**: 1550-1554 .
69. Takakuwa, T., Endo, S., Nakae, H., Kukuchi, M., Baba, N., Inada, K., Yoshida, M. (1994) Blood cytokine and complement levels in patients with sepsis, *Res.Commun.Chem.Pathol.Pharmacol.* 291-300 .
70. Vogel, S. N. y Hogan, M. M., (1990) Role of cytokines in endotoxin-mediated host responses, en *Immunophysiology. The role of cells and cytokines in immunity and inflammation*, Oppenheim, J. J. y Shevach, E. M., Eds. (Oxford University Press, Oxford) .
71. Westphal, O., (1993) An old-timer's reflections on endotoxin, en *Bacterial endotoxin: recognition and effector mechanisms*, Levin, J., Alving, C. R., Munford, R. S., Stutz, P., Eds. (Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam) .
72. Morrison, D. C. y Ulevitch, R. J. (1978) The effects of bacterial endotoxins on host mediation systems. A review, *Am.J.Pathol.* **93**: 526-617 .
73. Van Lenten, B. J., Fogelman, A. M., Haberland, M. E., Edwards, P. A. (1986) The role of lipoproteins and receptor-mediated endocytosis in the transport of bacterial lipopolysaccharide, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **83**: 2704-2708 .

74. Hayter, J. B., Rivera, M., McGroarty, E. J. (1987) Neutron scattering analysis of bacterial lipopolysaccharide phase structure. Changes at high pH, *J.Biol.Chem.* **262**: 5100-5105 .
75. Naumann, D., Schultz, C., Born, J., Labischinski, H., Brandenburg, K., von Busse, G., Brade, H., Seydel, U. (1987) Investigations into the polymorphism of lipid A from lipopolysaccharides of *Escherichia coli* and *Salmonella minnesota* by Fourier-transform infrared spectroscopy, *Eur.J.Biochem.* **164**: 159-169 .
76. Brandenburg, K. y Seydel, U. (1988) Orientation measurements on membrane systems made from lipopolysaccharides and free lipid A by FT-IR spectroscopy, *Eur.Biophys.J.* **16**: 83-94 .
77. Labischinski, H., Naumann, D., Schultz, C., Kusumoto, S., Shiba, T., Rietschel, E. T., Giesbrecht, P. (1989) Comparative X-ray and Fourier-transform-infrared investigations of conformational properties of bacterial and synthetic lipid A of *Escherichia coli* and *Salmonella minnesota* as well as partial structures and analogues thereof, *Eur.J.Biochem.* **179**: 659-665 .
78. Seydel, U., Brandenburg, K., Koch, M. H., Rietschel, E. T. (1989) Supramolecular structure of lipopolysaccharide and free lipid A under physiological conditions as determined by synchrotron small-angle X-ray diffraction, *Eur.J.Biochem.* **186**: 325-332 .
79. Westphal, O. y Jann, K., (1965) *Methods in carbohydrate chemistry*. Whistler, R. L. Eds. (Academic Press, Inc., New York), pp. 83-91.
80. Kato, N., Ohta, M., Kido, N., Naito, S., Kuno, T. (1984) Ultrastructure of *Klebsiella O3* lipopolysaccharide isolated from culture supernatant: comparison with other lipopolysaccharides, *Microbiol.Immunol.* **28**: 545-557 .
81. Kato, N., Ohta, M., Kido, N., Naito, S., Kuno, T. (1984) Ultrastructure of *Klebsiella O3* lipopolysaccharide isolated from culture supernatant: structure of various uniform salt forms, *Microbiol.Immunol.* **28**: 559-567 .
82. Morrison, D. C., (1985) *Handbook of Endotoxin*. Berry, L. J. Eds. (Elsevier Science Publishers, New York), pp. 25-55.

83. Brandenburg, K., Lindner, B., Schromm, A., Koch, M. H., Bauer, J., Merkli, A., Zbaeren, C., Davies, J. G., Seydel, U. (2000) Physicochemical characteristics of triacyl lipid A partial structure OM- 174 in relation to biological activity, *Eur.J.Biochem.* **267**: 3370-3377 .
84. Brade, L., Brandenburg, K., Kuhn, H. M., Kusumoto, S., Macher, I., Rietschel, E. T., Brade, H. (1987) The immunogenicity and antigenicity of lipid A are influenced by its physicochemical state and environment, *Infect.Immun.* **55**: 2636-2644 .
85. Chiller, J. M., Skidmore, B. J., Morrison, D. C., Weigle, W. O. (1973) Relationship of the structure of bacterial lipopolysaccharides to its function in mitogenesis and adjuvanticity, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **70**: 2129-2133 .
86. Rietschel, E. T., Brade, L., Schade, U., Seydel, U., Zahringer, U., Brandenburg, K., Helander, I., Holst, O., Kondo, S., Kuhn, H. M., . (1990) Bacterial lipopolysaccharides: relationship of structure and conformation to endotoxic activity, serological specificity and biological function, *Adv.Exp.Med.Biol.* **256**: 81-99 .
87. Seydel, U., Schromm, A. B., Blunck, R., Brandenburg, K. (2000) Chemical structure, molecular conformation, and bioactivity of endotoxins, *Chem.Immunol.* **74**: 5-24 .
88. Brandenburg, K., Mayer, H., Koch, M. H., Weckesser, J., Rietschel, E. T., Seydel, U. (1993) Influence of the supramolecular structure of free lipid A on its biological activity, *Eur.J.Biochem.* **218**: 555-563 .
89. Brandenburg, K., Koch, M. H., Seydel, U. (1990) Phase diagram of lipid A from *Salmonella minnesota* and *Escherichia coli* rough mutant lipopolysaccharide, *J.Struct.Biol.* **105**: 11-21 .
90. Komuro, T., Murai, T., Kawasaki, H. (1987) Effect of sonication on the dispersion state of lipopolysaccharide and its pyrogenicity in rabbits, *Chem.Pharm.Bull.(Tokyo)* **35**: 4946-4952 .
91. Kessel, D. y Kardon, R. H., (1979) *Tissues and organs*. Freeman, W. H. San Francisco).

92. Wisse, E., van Dierendonck, J. H., Zanger, R. B. D., Fraser, R., y McCuskey, R. S., (1979) *Communication of liver cells*. Popper, H., Bianchi, L., Gudat, F., y Reutter, W. Eds. (Int. Med. Publ., Ginebra), pp. 195-200.
93. Bouwens, L., Remels, L., Baekeland, M., Van Bossuyt, H., Wisse, E. (1987) Large granular lymphocytes or "pit cells" from rat liver: isolation, ultrastructural characterization and natural killer activity, *Eur.J.Immunol.* **17**: 37-42 .
94. Marshal, W. J., (1988) Lipids and lipoproteins, en *Clinical Chemistry*, Lippincott, J. B., Ed. (Gower Med. Pub. London, New York) .
95. van Leeuwen, P. A. M., Boermeester, M. A., Houdijk, A. P. J., Ferwerda, Ch. C., Cuesta, M. A., Meyer, S., Wesdorp, R. I. C. (1994) Clinical significance of translocation, *Gut Supplement 1*: S28-S34 .
96. Zlydaszyk, J. C. y Moon, R. J. (1976) Fate of ⁵¹Cr-labeled lipopolysaccharide in tissue culture cells and livers of normal mice, *Infect.Immun.* **14**: 100-105 .
97. Snyder, S. L., Walker, R. I., MacVittie, T. J., Sheil, J. M. (1978) Biologic properties of bacterial lipopolysaccharides treated with chromium chloride, *Can.J.Microbiol.* **24**: 495-501 .
98. Kuttner, R. E., (1983) en *Handbook of shock and trauma*, Altura, B. M., Ed. (Raven Press, New York) .
99. Mathison, J. C. y Ulevitch, R. J. (1979) The clearance, tissue distribution, and cellular localization of intravenously injected lipopolysaccharide in rabbits, *J.Immunol.* **123**: 2133-2143 .
100. Freudenberg, M. A., Bog-Hansen, T. C., Back, U., Galanos, C. (1980) Interaction of lipopolysaccharides with plasma high-density lipoprotein in rats, *Infect.Immun.* **28**: 373-380 .
101. Ulevitch, R. J., Johnston, A. R., Weinstein, D. B. (1981) New function for high density lipoproteins. Isolation and characterization of a bacterial lipopolysaccharide-high density lipoprotein complex formed in rabbit plasma, *J.Clin.Invest* **67**: 827-837 .

102. Siegel, J. H., Cerra, F. B., Border, J. R., Coleman, B., y McMenemy, R. H., (1982) *Pathophysiology of shock, anoxia and ischemia*. Cowley, R. A. y Trump, B. F. Eds. (Williams & Wilkins, Baltimore), pp. 235-253.
103. Pagani, R., Portoles, M. T., Diaz-Laviada, I., Municio, A. M. (1988) Morphological damage induced by *Escherichia coli* lipopolysaccharide in cultured hepatocytes: localization and binding properties, *Br.J.Exp.Pathol.* **69**: 537-549 .
104. Portoles, M. T., Pagani, R., Diaz-Laviada, I., Municio, A. M. (1987) Effect of *Escherichia coli* lipopolysaccharide on the microviscosity of liver plasma membranes and hepatocyte suspensions and monolayers, *Cell Biochem.Funct.* **5**: 55-61 .
105. Portoles, M. T., Pagani, R., Ainaga, M. J., Diaz-Laviada, I., Municio, A. M. (1989) Lipopolysaccharide-induced insulin resistance in monolayers of cultured hepatocytes, *Br.J.Exp.Pathol.* **70**: 199-205 .
106. Pagani, R., Portoles, M. T., Municio, A. M. (1985) Effect of *Escherichia coli* lipopolysaccharide on the glucagon and insulin binding to isolated rat hepatocytes, *Mol.Cell Biochem.* **65**: 37-44 .
107. Portoles, M. T., Ainaga, M. J., Municio, A. M., Pagani, R. (1991) Intracellular calcium and pH alterations induced by *Escherichia coli* endotoxin in rat hepatocytes, *Biochim.Biophys.Acta* **1092**: 1-6 .
108. Blunck, R., Scheel, O., Muller, M., Brandenburg, K., Seitzer, U., Seydel, U. (2001) New insights into endotoxin-induced activation of macrophages: involvement of a K⁺ channel in transmembrane signaling, *J.Immunol.* **166**: 1009-1015 .
109. Morrison, D. C., Oades, Z. G., Di Pietro, D. (1981) Endotoxin-initiated membrane changes in rabbit platelets, *Prog.Clin.Biol.Res.* **62**: 47-64 .
110. Portoles, M. T., Arahuetes, R. M., Pagani, R. (1994) Intracellular calcium alterations and free radical formation evaluated by flow cytometry in endotoxin-treated rat liver Kupffer and endothelial cells, *Eur.J.Cell Biol.* **65**: 200-205 .

111. Mellors, A., Tappel, A. L., Sawant, P. L., Desai, I. D. (1967) Mitochondrial swelling and uncoupling of oxidative phosphorylation by lysosomes, *Biochim.Biophys.Acta* **143**: 299-309 .
112. Mela, L., Miller, L. D., Bacalzo, L. V., Jr., Olofsson, K., White, R. R. (1973) Role of intracellular variations of lysosomal enzyme activity and oxygen tension in mitochondrial impairment in endotoxemia and hemorrhage in the rat, *Ann.Surg.* **178**: 727-735 .
113. White, R. R., Mela, L., Bacalzo, L. V., Jr., Olofsson, K., Miller, L. D. (1973) Hepatic ultrastructure in endotoxemia, hemorrhage, and hypoxia: emphasis on mitochondrial changes, *Surgery* **73**: 525-534 .
114. Frayn, K. N. (1985) Substrate turnover after injury, *Br.Med.Bull.* **41**: 232-239 .
115. Smith-Erichsen, N., Aasen, A. O., Amundsen, E. (1984) Changes in components of the plasma protease systems related to course and outcome of surgical sepsis, *Adv.Exp.Med.Biol.* **167**: 455-462 .
116. Bosch, M. A., Garcia, R., Pagani, R., Portoles, M. T., Diaz-Laviada, I., Abarca, S., Ainaga, M. J., Risco, C., Municio, A. M. (1988) Induction of reversible shock by Escherichia coli lipopolysaccharide in rats. Changes in serum and cell membrane parameters, *Br.J.Exp.Pathol.* **69**: 805-812 .
117. Koj, A., Gauldie, J., Sweeney, G. D., Regoeczi, E., Sauder, D. N. (1985) A simple bioassay for monocyte-derived hepatocyte stimulating factor: increased synthesis of alpha 2-macroglobulin and reduced synthesis of albumin by cultured rat hepatocytes, *J.Immunol.Methods* **76**: 317-327 .
118. Pagani, R., Portoles, M. T., Bosch, M. A., Diaz-Laviada, I., Municio, A. M. (1987) Direct and mediated Escherichia coli lipopolysaccharide action in primary hepatocyte cultures, *Eur.J.Cell Biol.* **43**: 243-246 .
119. Kaufmann, R. L., Matson, C. F., Beisel, W. R. (1976) Hypertriglyceridemia produced by endotoxin: role of impaired triglyceride disposal mechanisms, *J.Infect.Dis.* **133**: 548-555 .

120. Printen, K. J., Keefe, W. E., Foster, E., Brown, W. (1974) Fluxes in serum glucose and free fatty acid in early endotoxemia and hemorrhage, *Surg.Gynecol.Obstet.* **138**: 686-688 .
121. Spitzer, J. J. (1979) Lipid metabolism in endotoxic shock, *Circ.Shock Suppl* **1**: 69-79 .
122. Spitzer, J. J. y Spitzer, J. A. (1982) Alterations in carbohydrate and lipid metabolism following administration of endotoxin, *Klin.Wochenschr.* **60**: 717-719 .
123. Sato, R. y Omura, T., (1978) *Cytochrome P450*. Kodansha Eds. (Scientific Books, Tokyo).
124. Wright, S. D. y Jong, M. T. (1986) Adhesion-promoting receptors on human macrophages recognize Escherichia coli by binding to lipopolysaccharide, *J.Exp.Med.* **164**: 1876-1888 .
125. Wright, S. D., Ramos, R. A., Tobias, P. S., Ulevitch, R. J., Mathison, J. C. (1990) CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein, *Science* **249**: 1431-1433 .
126. Hampton, R. Y., Golenbock, D. T., Raetz, C. R. (1988) Lipid A binding sites in membranes of macrophage tumor cells, *J.Biol.Chem.* **263**: 14802-14807 .
127. Hampton, R. Y., Golenbock, D. T., Penman, M., Krieger, M., Raetz, C. R. (1991) Recognition and plasma clearance of endotoxin by scavenger receptors, *Nature* **352**: 342-344 .
128. Lei, M. G. y Morrison, D. C. (1988) Specific endotoxic lipopolysaccharide-binding proteins on murine splenocytes. II. Membrane localization and binding characteristics, *J.Immunol.* **141**: 1006-1011 .
129. Lei, M. G. y Morrison, D. C. (1988) Specific endotoxic lipopolysaccharide-binding proteins on murine splenocytes. I. Detection of lipopolysaccharide-binding sites on splenocytes and splenocyte subpopulations, *J.Immunol.* **141**: 996-1005 .
130. Dziarski, R. (1991) Demonstration of peptidoglycan-binding sites on lymphocytes and macrophages by photoaffinity cross-linking, *J.Biol.Chem.* **266**: 4713-4718 .

131. Hara-Kuge, S., Amano, F., Nishijima, M., Akamatsu, Y. (1990) Isolation of a lipopolysaccharide (LPS)-resistant mutant, with defective LPS binding, of cultured macrophage-like cells, *J.Biol.Chem.* **265**: 6606-6610 .
132. Lei, M. G. y Morrison, D. C. (1991) Identification of an LPS binding protein with specificity for inner core region (KDO) determinant, *FASEB J.* **5**: A1363 .
133. Mori, K., Matsumoto, K., Gans, H. (1973) On the in vivo clearance and detoxification of endotoxin by lung and liver, *Ann.Surg.* **177**: 159-163 .
134. Praaning-van Dalen, D. P., Brouwer, A., Knook, D. L. (1981) Clearance capacity of rat liver Kupffer, Endothelial, and parenchymal cells, *Gastroenterology* **81**: 1036-1044 .
135. Freudenberg, M. A., Kleine, B., Galanos, C. (1984) The fate of lipopolysaccharide in rats: evidence for chemical alteration in the molecule, *Rev.Infect.Dis.* **6**: 483-487 .
136. Schildt, B., Gertz, I., Wide, L. (1974) Differentiated reticuloendothelial system (res) function in some critical surgical conditions, *Acta Chir Scand.* **140**: 611-617 .
137. Richards, P. S. y Saba, T. M. (1985) Effect of endotoxin on fibronectin and Kupffer cell activity, *Hepatology* **5**: 32-37 .
138. Ainaga, M. J., Tesis doctoral, Universidad Complutense de Madrid (1991).
139. Pagani, R., Portoles, M. T., Municio, A. M. (1981) The binding of Escherichia coli endotoxin to isolated rat hepatocytes, *FEBS Lett.* **131**: 103-107 .
140. Munford, R. S. y Hall, C. L. (1986) Detoxification of bacterial lipopolysaccharides (endotoxins) by a human neutrophil enzyme, *Science* **234**: 203-205 .
141. Munford, R. S. (1986) Deacylation of bacterial endotoxins by neutrophils and macrophages: early observations and hypotheses, *Methods Find.Exp.Clin.Pharmacol.* **8**: 63-65 .

142. Darlington, G. J., Wilson, D. R., Lachman, L. B. (1986) Monocyte-conditioned medium, interleukin-1, and tumor necrosis factor stimulate the acute phase response in human hepatoma cells in vitro, *J.Cell Biol.* **103**: 787-793 .
143. Koj, A. (1985) Cytokines regulating acute inflammation and synthesis of acute phase proteins, *Blut* **51**: 267-274 .
144. Kuiper, J., Casteleyn, E., van Berkel, T. J. (1988) Regulation of liver metabolism by intercellular communication, *Adv.Enzyme Regul.* **27**: 193-208 .
145. Bucklin, S. E., Silverstein, R., Morrison, D. C. (1993) An interleukin-6-induced acute-phase response does not confer protection against lipopolysaccharide lethality, *Infect.Immun.* **61**: 3184-3189 .
146. Grube, B. J., Cochane, C. G., Ye, R. D., Green, C. E., McPhail, M. E., Ulevitch, R. J., Tobias, P. S. (1994) Lipopolysaccharide binding protein expression in primary human hepatocytes and HepG2 hepatoma cells, *J.Biol.Chem.* **269**: 8477-8482 .
147. Schumann, R. R., Kirschning, C. J., Unbehau, A., Aberle, H. P., Knope, H. P., Lamping, N., Ulevitch, R. J., Herrmann, F. (1996) The lipopolysaccharide-binding protein is a secretory class 1 acute- phase protein whose gene is transcriptionally activated by APRF/STAT/3 and other cytokine-inducible nuclear proteins, *Mol.Cell Biol.* **16**: 3490-3503 .
148. Schumann, R. R., Leong, S. R., Flaggs, G. W., Gray, P. W., Wright, S. D., Mathison, J. C., Tobias, P. S., Ulevitch, R. J. (1990) Structure and function of lipopolysaccharide binding protein, *Science* **249**: 1429-1431 .
149. Tracey, K. J., Fong, Y., Hesse, D. G., Manogue, K. R., Lee, A. T., Kuo, G. C., Lowry, S. F., Cerami, A. (1987) Anti-cachectin/TNF monoclonal antibodies prevent septic shock during lethal bacteraemia, *Nature* **330**: 662-664 .
150. Tracey, K. J., Lowry, S. F., Fahey, T. J., III, Albert, J. D., Fong, Y., Hesse, D., Beutler, B., Manogue, K. R., Calvano, S., Wei, H., . (1987) Cachectin/tumor necrosis factor induces lethal shock and stress hormone responses in the dog, *Surg.Gynecol.Obstet.* **164**: 415-422 .

151. Calandra, T., Baumgartner, J. D., Grau, G. E., Wu, M. M., Lambert, P. H., Schellekens, J., Verhoef, J., Glauser, M. P. (1990) Prognostic values of tumor necrosis factor/cachectin, interleukin-1, interferon-alpha, and interferon-gamma in the serum of patients with septic shock. Swiss-Dutch J5 Immunoglobulin Study Group, *J.Infect.Dis.* **161**: 982-987 .
152. Calandra, T. y Glauser, M. P. (1990) Cytokines and septic shock, *Diagn.Microbiol.Infect.Dis.* **13**: 377-381 .
153. Offner, F., Philippe, J., Vogelaers, D., Colardyn, F., Baele, G., Baudrihay, M., Vermeulen, A., Leroux-Roels, G. (1990) Serum tumor necrosis factor levels in patients with infectious disease and septic shock, *J.Lab Clin.Med.* **116**: 100-105 .
154. Okusawa, S., Gelfand, J. A., Ikejima, T., Connolly, R. J., Dinarello, C. A. (1988) Interleukin 1 induces a shock-like state in rabbits. Synergism with tumor necrosis factor and the effect of cyclooxygenase inhibition, *J.Clin.Invest* **81**: 1162-1172 .
155. Everaerd, B., Brouckaert, P., Shaw, A., Fiers, W. (1989) Four different interleukin-1 species sensitize to the lethal action of tumour necrosis factor, *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **163**: 378-385 .
156. Waage, A., Brandtzaeg, P., Halstensen, A., Kierulf, P., Espevik, T. (1989) The complex pattern of cytokines in serum from patients with meningococcal septic shock. Association between interleukin 6, interleukin 1, and fatal outcome, *J.Exp.Med.* **169**: 333-338 .
157. Ulich, T. R., del Castillo, J., Keys, M., Granger, G. A., Ni, R. X. (1987) Kinetics and mechanisms of recombinant human interleukin 1 and tumor necrosis factor-alpha-induced changes in circulating numbers of neutrophils and lymphocytes, *J.Immunol.* **139**: 3406-3415 .
158. Munker, R., Gasson, J., Ogawa, M., Koeffler, H. P. (1986) Recombinant human TNF induces production of granulocyte-monocyte colony- stimulating factor, *Nature* **323**: 79-82 .
159. Lee, M. D., Zentella, A., Vine, W., Pekala, P. H., Cerami, A. (1987) Effect of endotoxin-induced monokines on glucose metabolism in the muscle cell line L6, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **84**: 2590-2594 .

160. van der, P. T. y Sauerwein, H. P. (1993) Tumour necrosis factor-alpha: its role in the metabolic response to sepsis, *Clin.Sci.(Colch.)* **84**: 247-256 .
161. Feingold, K. R. y Grunfeld, C. (1987) Tumor necrosis factor-alpha stimulates hepatic lipogenesis in the rat in vivo, *J.Clin.Invest* **80**: 184-190 .
162. Fong, Y., Moldawer, L. L., Marano, M., Wei, H., Tatter, S. B., Clarick, R. H., Santhanam, U., Sherris, D., May, L. T., Sehgal, P. B., . (1989) Endotoxemia elicits increased circulating beta 2-IFN/IL-6 in man, *J.Immunol.* **142**: 2321-2324 .
163. Fong, Y., Moldawer, L. L., Marano, M., Wei, H., Barber, A., Manogue, K., Tracey, K. J., Kuo, G., Fischman, D. A., Cerami, A., . (1989) Cachectin/TNF or IL-1 alpha induces cachexia with redistribution of body proteins, *Am.J.Physiol* **256**: R659-R665 .
164. Dinarello, C. A., Cannon, J. G., Wolff, S. M., Bernheim, H. A., Beutler, B., Cerami, A., Figari, I. S., Palladino, M. A., Jr., O'Connor, J. V. (1986) Tumor necrosis factor (cachectin) is an endogenous pyrogen and induces production of interleukin 1, *J.Exp.Med.* **163**: 1433-1450 .
165. Cybulsky, M. I., Chan, M. K., Movat, H. Z. (1988) Acute inflammation and microthrombosis induced by endotoxin, interleukin-1, and tumor necrosis factor and their implication in gram- negative infection, *Lab Invest* **58**: 365-378 .
166. Sugarman, B. J., Aggarwal, B. B., Hass, P. E., Figari, I. S., Palladino, M. A., Jr., Shepard, H. M. (1985) Recombinant human tumor necrosis factor-alpha: effects on proliferation of normal and transformed cells in vitro, *Science* **230**: 943-945 .
167. Kasahara, T., Mukaida, N., Hatake, K., Motoyoshi, K., Kawai, T., Shiori-Nakano, K. (1985) Interleukin 1 (IL 1)-dependent lymphokine production by human leukemic T cell line HSB.2 subclones, *J.Immunol.* **134**: 1682-1689 .
168. Zucali, J. R., Dinarello, C. A., Oblon, D. J., Gross, M. A., Anderson, L., Weiner, R. S. (1986) Interleukin 1 stimulates fibroblasts to produce granulocyte-macrophage colony-stimulating activity and prostaglandin E2, *J.Clin.Invest* **77**: 1857-1863 .

169. Cybulsky, M. I., Colditz, I. G., Movat, H. Z. (1986) The role of interleukin-1 in neutrophil leukocyte emigration induced by endotoxin, *Am.J.Pathol.* **124**: 367-372 .
170. Watson, M. L., Lewis, G. P., Westwick, J. (1989) Increased vascular permeability and polymorphonuclear leucocyte accumulation in vivo in response to recombinant cytokines and supernatant from cultures of human synovial cells treated with interleukin 1, *Br.J.Exp.Pathol.* **70**: 93-101 .
171. Walter, J. S., Meyers, P., Krueger, J. M. (1989) Microinjection of interleukin-1 into brain: separation of sleep and fever responses, *Physiol Behav.* **45**: 169-176 .
172. Beach, J. E., Smallridge, R. C., Kinzer, C. A., Bernton, E. W., Holaday, J. W., Fein, H. G. (1989) Rapid release of multiple hormones from rat pituitaries perfused with recombinant interleukin-1, *Life Sci.* **44**: 1-7 .
173. Le, J. y Vilcek, J. (1987) Tumor necrosis factor and interleukin 1: cytokines with multiple overlapping biological activities, *Lab Invest* **56**: 234-248 .
174. Bevilacqua, M. P., Pober, J. S., Majeau, G. R., Fiers, W., Cotran, R. S., Gimbrone, M. A., Jr. (1986) Recombinant tumor necrosis factor induces procoagulant activity in cultured human vascular endothelium: characterization and comparison with the actions of interleukin 1, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **83**: 4533-4537 .
175. Filkins, J. P. (1985) Monokines and the metabolic pathophysiology of septic shock, *Fed.Proc.* **44**: 300-304 .
176. Kishimoto, T. (1985) Factors affecting B-cell growth and differentiation, *Annu.Rev.Immunol.* **3**: 133-157 .
177. Castell, J. V., Gomez-Lechon, M. J., David, M., Andus, T., Geiger, T., Trullenque, R., Fabra, R., Heinrich, P. C. (1989) Interleukin-6 is the major regulator of acute phase protein synthesis in adult human hepatocytes, *FEBS Lett.* **242**: 237-239 .
178. Benito, E., Tesis de Licenciatura, Universidad Complutense de Madrid (1993).

179. Stuehr, D. J. y Nathan, C. F. (1989) Nitric oxide. A macrophage product responsible for cytostasis and respiratory inhibition in tumor target cells, *J.Exp.Med.* **169**: 1543-1555 .
180. Stuehr, D. J. y Marletta, M. A. (1985) Mammalian nitrate biosynthesis: mouse macrophages produce nitrite and nitrate in response to Escherichia coli lipopolysaccharide, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **82**: 7738-7742 .
181. Gaillard, T., Mulsch, A., Busse, R., Klein, H., Decker, K. (1991) Regulation of nitric oxide production by stimulated rat Kupffer cells, *Pathobiology* **59**: 280-283 .
182. Kitade, H., Sakitani, K., Inoue, K., Masu, Y., Kawada, N., Hiramatsu, Y., Kamiyama, Y., Okumura, T., Ito, S. (1996) Interleukin 1 beta markedly stimulates nitric oxide formation in the absence of other cytokines or lipopolysaccharide in primary cultured rat hepatocytes but not in Kupffer cells, *Hepatology* **23**: 797-802 .
183. Chesrown, S. E., Monnier, J., Visner, G., Nick, H. S. (1994) Regulation of inducible nitric oxide synthase mRNA levels by LPS, INF- gamma, TGF-beta, and IL-10 in murine macrophage cell lines and rat peritoneal macrophages, *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **200**: 126-134 .
184. Curran, R. D., Billiar, T. R., Stuehr, D. J., Hofmann, K., Simmons, R. L. (1989) Hepatocytes produce nitrogen oxides from L-arginine in response to inflammatory products of Kupffer cells, *J.Exp.Med.* **170**: 1769-1774 .
185. Curran, R. D., Billiar, T. R., Stuehr, D. J., Ochoa, J. B., Harbrecht, B. G., Flint, S. G., Simmons, R. L. (1990) Multiple cytokines are required to induce hepatocyte nitric oxide production and inhibit total protein synthesis, *Ann.Surg.* **212**: 462-469 .
186. Knowles, R. G., Merrett, M., Salter, M., Moncada, S. (1990) Differential induction of brain, lung and liver nitric oxide synthase by endotoxin in the rat, *Biochem.J.* **270**: 833-836 .
187. Curran, R. D., Ferrari, F. K., Kispert, P. H., Stadler, J., Stuehr, D. J., Simmons, R. L., Billiar, T. R. (1991) Nitric oxide and nitric oxide-generating compounds inhibit hepatocyte protein synthesis, *FASEB J.* **5**: 2085-2092 .

188. Frederick, J. A., Hasselgren, P. O., Davis, S., Higashiguchi, T., Jacob, T. D., Fischer, J. E. (1993) Nitric oxide may upregulate in vivo hepatic protein synthesis during endotoxemia, *Arch.Surg.* **128**: 152-156 .
189. Brass, E. P. y Vetter, W. H. (1993) Inhibition of glucagon-stimulated glycogenolysis by S-nitroso-N- acetylpenicillamine, *Pharmacol.Toxicol.* **72**: 369-372 .
190. Horton, R. A., Ceppi, E. D., Knowles, R. G., Titheradge, M. A. (1994) Inhibition of hepatic gluconeogenesis by nitric oxide: a comparison with endotoxic shock, *Biochem.J.* **299 (Pt 3)**: 735-739 .
191. Molina-y-Vedia, L., McDonald, B., Reep, B., Brune, B., Di Silvio, M., Billiar, T. R., Lapetina, E. G. (1992) Nitric oxide-induced S-nitrosylation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase inhibits enzymatic activity and increases endogenous ADP- ribosylation, *J.Biol.Chem.* **267**: 24929-24932 .
192. Billiar, T. R., Curran, R. D., Harbrecht, B. G., Stadler, J., Williams, D. L., Ochoa, J. B., Di Silvio, M., Simmons, R. L., Murray, S. A. (1992) Association between synthesis and release of cGMP and nitric oxide biosynthesis by hepatocytes, *Am.J.Physiol* **262**: C1077-C1082 .
193. Stadler, J., Trockfeld, J., Schmalix, W. A., Brill, T., Siewert, J. R., Greim, H., Doehmer, J. (1994) Inhibition of cytochromes P4501A by nitric oxide, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **91**: 3559-3563 .
194. Brune, B. y Lapetina, E. G. (1989) Activation of a cytosolic ADP-ribosyltransferase by nitric oxide- generating agents, *J.Biol.Chem.* **264**: 8455-8458 .
195. Richter, C. (1997) Reactive oxygen and nitrogen species regulate mitochondrial Ca²⁺ homeostasis and respiration, *Biosci.Rep.* **17**: 53-66 .
196. Wright, S. D., Detmers, P. A., Aida, Y., Adamowski, R., Anderson, D. C., Chad, Z., Kabbash, L. G., Pabst, M. J. (1990) CD18-deficient cells respond to lipopolysaccharide in vitro, *J.Immunol.* **144**: 2566-2571 .

197. Nussler, A., Drapier, J. C., Renia, L., Pied, S., Miltgen, F., Gentilini, M., Mazier, D. (1991) L-arginine-dependent destruction of intrahepatic malaria parasites in response to tumor necrosis factor and/or interleukin 6 stimulation, *Eur.J.Immunol.* **21**: 227-230 .
198. Harbrecht, B. G., Billiar, T. R., Stadler, J., Demetris, A. J., Ochoa, J. B., Curran, R. D., Simmons, R. L. (1992) Nitric oxide synthesis serves to reduce hepatic damage during acute murine endotoxemia, *Crit Care Med.* **20**: 1568-1574 .
199. Harbrecht, B. G., Billiar, T. R., Stadler, J., Demetris, A. J., Ochoa, J., Curran, R. D., Simmons, R. L. (1992) Inhibition of nitric oxide synthesis during endotoxemia promotes intrahepatic thrombosis and an oxygen radical-mediated hepatic injury, *J.Leukoc.Biol.* **52**: 390-394 .
200. Knolle, P., Lohr, H., Treichel, U., Dienes, H. P., Lohse, A., Schlaack, J., Gerken, G. (1995) Parenchymal and nonparenchymal liver cells and their interaction in the local immune response, *Z.Gastroenterol.* **33**: 613-620 .
201. Bankey, P., Prager, M., Geldon, D., Taylor, S., McIntyre, K. (1994) Acute-phase hepatocytes regulate liver sinusoidal cell mediator production, *Arch.Surg.* **129**: 1166-1171 .
202. Kox, W. J., Volk, T., Kox, S. N., Volk, H. D. (2000) Immunomodulatory therapies in sepsis, *Intensive Care Med.* **26 Suppl 1**: S124-S128 .
203. Curnutte, J. T. y Babior, B. M. (1987) Chronic granulomatous disease, *Adv.Hum.Genet.* **16**: 229-297 .
204. Halliwell, B. y Gutteridge, J. M. (1984) Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease, *Biochem.J.* **219**: 1-14 .
205. Chance, B., Sies, H., Boveris, A. (1979) Hydroperoxide metabolism in mammalian organs, *Physiol Rev.* **59**: 527-605 .
206. Cadenas, E. (1989) Biochemistry of oxygen toxicity, *Annu.Rev.Biochem.* **58**: 79-110 .
207. Halliwell, B. (1987) Oxidants and human disease: some new concepts, *FASEB J.* **1**: 358-364 .

208. Del Maestro, R. F. (1980) An approach to free radicals in medicine and biology, *Acta Physiol Scand. Suppl* **492**: 153-168 .
209. Saran, M. y Bors, W. (1990) Radical reactions in vivo--an overview, *Radiat. Environ. Biophys.* **29**: 249-262 .
210. Sies, H. y Cadenas, E., (1983) *Biological basis of detoxification*. Cadwell, J. y Jacobi, W. B. Eds. (Acad. Press, San Diego), p. 181.
211. Link, E. M. y Riley, P. A. (1988) Role of hydrogen peroxide in the cytotoxicity of the xanthine/xanthine oxidase system, *Biochem.J.* **249**: 391-399 .
212. Walling, C., (1982) *Oxidases and related redox systems*. King, T. E. y Mason, M. Eds. (Pergamon Press,), pp. 85-97.
213. Aruoma, O. I., Halliwell, B., Laughton, M. J., Quinlan, G. J., Gutteridge, J. M. (1989) The mechanism of initiation of lipid peroxidation. Evidence against a requirement for an iron(II)-iron(III) complex, *Biochem.J.* **258**: 617-620 .
214. Murphy, M. E. y Sies, H. (1991) Reversible conversion of nitroxyl anion to nitric oxide by superoxide dismutase, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **88**: 10860-10864 .
215. Lin, K. T., Xue, J. Y., Nomen, M., Spur, B., Wong, P. Y. (1995) Peroxynitrite-induced apoptosis in HL-60 cells, *J. Biol. Chem.* **270**: 16487-16490 .
216. Schweizer, M. y Richter, C. (1996) Peroxynitrite stimulates the pyridine nucleotide-linked Ca²⁺ release from intact rat liver mitochondria, *Biochemistry* **35**: 4524-4528 .
217. Esterbauer, H., Jurgens, G., Quehenberger, O. (1988) Modification of human low density lipoprotein by lipid peroxidation, *Basic Life Sci.* **49**: 369-373 .
218. Dean, R. T., Thomas, S. M., Garner, A. (1986) Free-radical-mediated fragmentation of monoamine oxidase in the mitochondrial membrane. Roles for lipid radicals, *Biochem.J.* **240**: 489-494 .

219. Fernandez-Checa, J. C., Kaplowitz, N., Garcia-Ruiz, C., Colell, A., Miranda, M., Mari, M., Ardite, E., Morales, A. (1997) GSH transport in mitochondria: defense against TNF-induced oxidative stress and alcohol-induced defect, *Am.J.Physiol* **273**: G7-17 .
220. Meister, A. y Anderson, M. E. (1983) Glutathione, *Annu.Rev.Biochem.* **52**: 711-760 .
221. Forman, H. J. y Fisher, A. B., (1981) *Oxygen and living process*. Gilbert, D. L. Eds. (Springer-Verlag, New York), p. 65.
222. Chung, H., Fried, J., Jarabak, J. (1987) Irreversible inhibition of the human placental NADP-linked 15- hydroxyprostaglandin dehydrogenase/9-ketoprostaglandin reductase by glutathione thiosulfonate, *Prostaglandins* **33**: 391-402 .
223. Rubin, D. B., Reznik, G., Weiss, E. A., Young, P. R. (2000) Non-protein thiols flux to S-nitrosothiols in endothelial cells: an LPS redox signal, *Shock* **14**: 200-207 .
224. Hiranruengchok, R. y Harris, C. (1995) Diamide-induced alterations of intracellular thiol status and the regulation of glucose metabolism in the developing rat conceptus in vitro, *Teratology* **52**: 205-214 .
225. Mieyal, J. J., Starke, D. W., Gravina, S. A., Dothey, C., Chung, J. S. (1991) Thioltransferase in human red blood cells: purification and properties, *Biochemistry* **30**: 6088-6097 .
226. Nakajima, Y. y Nakamura, K. (1991) Chemical modification of the most reactive thiol group of rabbit skeletal muscle phosphofructokinase, to reduce its affinity toward substrate ATP and activating monovalent cations, *J.Biochem.(Tokyo)* **109**: 251-255 .
227. Luther, M. A., Gilbert, H. F., Lee, J. C. (1983) Self-association of rabbit muscle phosphofructokinase: role of subunit interaction in regulation of enzymatic activity, *Biochemistry* **22**: 5494-5500 .
228. Ames, B. N., Cathcart, R., Schwiers, E., Hochstein, P. (1981) Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant- and radical-caused aging and cancer: a hypothesis, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **78**: 6858-6862 .

229. Niki, E. (1987) Antioxidants in relation to lipid peroxidation, *Chem.Phys.Lipids* **44**: 227-253 .
230. Fritsma, G. A. (1983) Vitamin E and autoxidation, *Am.J.Med.Technol.* **49**: 453-456 .
231. Burton, G. W., Joyce, A., Ingold, K. U. (1983) Is vitamin E the only lipid-soluble, chain-breaking antioxidant in human blood plasma and erythrocyte membranes?, *Arch.Biochem.Biophys.* **221**: 281-290 .
232. Tappel, A. L. (1962) *Vitamin.Hormon.* **20**: 493-510 .
233. McCord, J. M. y Fridovich, I. (1969) Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein), *J.Biol.Chem.* **244**: 6049-6055 .
234. Tyler, D. D. (1975) Polarographic assay and intracellular distribution of superoxide dismutase in rat liver, *Biochem.J.* **147**: 493-504 .
235. Weisiger, R. A. y Fridovich, I. (1973) Mitochondrial superoxide simutase. Site of synthesis and intramitochondrial localization, *J.Biol.Chem.* **248**: 4793-4796 .
236. Mills, G. C. (1957) Hemoglobin catabolism I. Glutathione peroxidase, an erithrocyte enzyme which protects hemoglobin from oxidative breakdown, *J.Biol.Chem.* **229**: 189 .
237. Galeotti, T., Borrello, S., y Masoti, L., (1990) *Oxygen radicals: systemic events and disease processes*. Das, E. Eds. (Karger, Basel), pp. 129-148.
238. Aebi, H. (1984) Catalase in vitro, *Methods Enzymol.* **105**: 121-126 .
239. Kirkman, H. N., Galiano, S., Gaetani, G. F. (1987) The function of catalase-bound NADPH, *J.Biol.Chem.* **262**: 660-666 .
240. Yusa, T., Beckman, J. S., Crapo, J. D., Freeman, B. A. (1987) Hyperoxia increases H₂O₂ production by brain in vivo, *J.Appl.Physiol* **63**: 353-358 .
241. Frank, L., Summerville, J., Massaro, D. (1980) Potection from oxygen toxicity with endotoxin. Role of the endogenous antioxidant enzymes of the lung, *J.Clin.Invest* **65**: 1104-1110 .

242. Barja, d. Q., Gil, P., Lopez-Torres, M. (1988) Physiological significance of catalase and glutathione peroxidases, and in vivo peroxidation, in selected tissues of the toad *Discoglossus pictus* (Amphibia) during acclimation to normobaric hyperoxia, *J.Comp Physiol [B]* **158**: 583-590 .
243. Rackow, E. C. y Astiz, M. E. (1991) Pathophysiology and treatment of septic shock, *JAMA* **266**: 548-554 .
244. Cohen, J. y Glauser, M. P. (1991) Septic shock: treatment, *Lancet* **338**: 736-739 .
245. Crosby, H. A., Bion, J. F., Penn, C. W., Elliott, T. S. (1994) Antibiotic-induced release of endotoxin from bacteria in vitro, *J.Med.Microbiol.* **40**: 23-30 .
246. van Amersfoort, E. S., Tesis doctoral, Division of Biopharmaceutics, LACDR (1995).
247. Adye, J. C. y Springer, G. F. (1977) Binding of endotoxin (LPS) by glycerophosphatides from human platelets and leukocytes, *Naturwissenschaften* **64**: 150-151 .
248. Moller, K., Kronborg, G., Pedersen, B. K. (2000) [Non-antibiotic treatment of sepsis], *Ugeskr.Laeger* **162**: 2872-2875 .
249. Baumgartner, J. D., Glauser, M. P., McCutchan, J. A., Ziegler, E. J., van Melle, G., Klauber, M. R., Vogt, M., Muehlen, E., Luethy, R., Chioloro, R., . (1985) Prevention of gram-negative shock and death in surgical patients by antibody to endotoxin core glycolipid, *Lancet* **2**: 59-63 .
250. Ziegler, E. J., McCutchan, J. A., Fierer, J., Glauser, M. P., Sadoff, J. C., Douglas, H., Braude, A. I. (1982) Treatment of gram-negative bacteremia and shock with human antiserum to a mutant *Escherichia coli*, *N.Engl.J.Med.* **307**: 1225-1230 .
251. Baumgartner, J. D. (1990) Monoclonal anti-endotoxin antibodies for the treatment of gram-negative bacteremia and septic shock, *Eur.J.Clin.Microbiol.Infect.Dis.* **9**: 711-716 .
252. Greenman, R. L., Schein, R. M., Martin, M. A., Wenzel, R. P., MacIntyre, N. R., Emmanuel, G., Chmel, H., Kohler, R. B., McCarthy, M., Plouffe, J., . (1991) A controlled

- clinical trial of E5 murine monoclonal IgM antibody to endotoxin in the treatment of gram-negative sepsis. The XOMA Sepsis Study Group, *JAMA* **266**: 1097-1102 .
253. Lynn, W. A. y Golenbock, D. T. (1992) Lipopolysaccharide antagonists, *Immunol.Today* **13**: 271-276 .
254. Lamping, N., Dettmer, R., Schroder, N. W., Pfeil, D., Hallatschek, W., Burger, R., Schumann, R. R. (1998) LPS-binding protein protects mice from septic shock caused by LPS or gram-negative bacteria, *J.Clin.Invest* **101**: 2065-2071 .
255. Su, G. L., Rahemtulla, A., Thomas, P., Klein, R. D., Wang, S. C., Nanji, A. A. (1998) CD14 and lipopolysaccharide binding protein expression in a rat model of alcoholic liver disease, *Am.J.Pathol.* **152**: 841-849 .
256. Usui, M. y Kawarada, Y. (1998) [Endotoxin and its binding protein in organ failure], *Nippon Geka Gakkai Zasshi* **99**: 504-509 .
257. Lin, Y., Kohn, F. R., Kung, A. H., Ammons, W. S. (1994) Protective effect of a recombinant fragment of bactericidal/permeability increasing protein against carbohydrate dyshomeostasis and tumor necrosis factor-alpha elevation in rat endotoxemia, *Biochem.Pharmacol.* **47**: 1553-1559 .
258. Opal, S. M., Palardy, J. E., Jhung, J. W., Donsky, C., Romulo, R. L., Parejo, N., Marra, M. N. (1995) Activity of lipopolysaccharide-binding protein- bactericidal/permeability-increasing protein fusion peptide in an experimental model of Pseudomonas sepsis, *Antimicrob.Agents Chemother.* **39**: 2813-2815 .
259. Golenbock, D. T., Leggett, J. E., Rasmussen, P., Craig, W. A., Raetz, C. R., Proctor, R. A. (1988) Lipid X protects mice against fatal Escherichia coli infection, *Infect.Immun.* **56**: 779-784 .
260. Golenbock, D. T., Hampton, R. Y., Qureshi, N., Takayama, K., Raetz, C. R. (1991) Lipid A-like molecules that antagonize the effects of endotoxins on human monocytes, *J.Biol.Chem.* **266**: 19490-19498 .

261. Ogawa, T., Uchida, H., Amino, K. (1994) Immunobiological activities of chemically defined lipid A from lipopolysaccharides of *Porphyromonas gingivalis*, *Microbiology* **140** (Pt 5): 1209-1216 .
262. Tadros, T., Traber, D. L., Herndon, D. N. (2000) Trauma- and sepsis-induced hepatic ischemia and reperfusion injury: role of angiotensin II, *Arch.Surg.* **135**: 766-772 .
263. Takala, J. (2000) Non-conventional vasopressors in septic shock: effects on hepatosplanchnic blood flow, *Schweiz.Med.Wochenschr.* **130**: 1937-1941 .
264. Wang, Y., Lawson, J. A., Jaeschke, H. (1998) Differential effect of 2-aminoethylisothiourea, an inhibitor of the inducible nitric oxide synthase, on microvascular blood flow and organ injury in models of hepatic ischemia-reperfusion and endotoxemia, *Shock* **10**: 20-25 .
265. Privalle, C., Talarico, T., Keng, T., DeAngelo, J. (2000) Pyridoxalated hemoglobin polyoxyethylene: a nitric oxide scavenger with antioxidant activity for the treatment of nitric oxide-induced shock, *Free Radic.Biol.Med.* **28**: 1507-1517 .
266. Lee, W. L. y Downey, G. P. (2000) Coagulation inhibitors in sepsis and disseminated intravascular coagulation, *Intensive Care Med.* **26**: 1701-1706 .
267. Opal, S. M., Palardy, J. E., Parejo, N. A., Creasey, A. A. (2001) The activity of tissue factor pathway inhibitor in experimental models of superantigen-induced shock and polymicrobial intra-abdominal sepsis, *Crit Care Med.* **29**: 13-17 .
268. Thijs, L. G. (2000) Coagulation inhibitor replacement in sepsis is a potentially useful clinical approach, *Crit Care Med.* **28**: S68-S73 .
269. Fourrier, F., Jourdain, M., Tournoys, A. (2000) Clinical trial results with antithrombin III in sepsis, *Crit Care Med.* **28**: S38-S43 .
270. Abraham, E. (2000) Tissue factor inhibition and clinical trial results of tissue factor pathway inhibitor in sepsis, *Crit Care Med.* **28**: S31-S33 .

271. Santangelo, S., Shoup, M., Gamelli, R. L., Shankar, R. (2000) Prostaglandin E2 receptor antagonist (SC-19220) treatment restores the balance to bone marrow myelopoiesis after burn sepsis, *J.Trauma* **48**: 826-830 .
272. Suitters, A. J., Foulkes, R., Opal, S. M., Palardy, J. E., Emtage, J. S., Rolfe, M., Stephens, S., Morgan, A., Holt, A. R., Chaplin, L. C., . (1994) Differential effect of isotype on efficacy of anti-tumor necrosis factor alpha chimeric antibodies in experimental septic shock, *J.Exp.Med.* **179**: 849-856 .
273. Raza, A. (2000) Anti-TNF therapies in rheumatoid arthritis, Crohn's disease, sepsis, and myelodysplastic syndromes, *Microsc.Res.Tech.* **50**: 229-235 .
274. Huber, T. S., Gaines, G. C., Welborn, M. B., III, Rosenberg, J. J., Seeger, J. M., Moldawer, L. L. (2000) Anticytokine therapies for acute inflammation and the systemic inflammatory response syndrome: IL-10 and ischemia/reperfusion injury as a new paradigm, *Shock* **13**: 425-434 .
275. Marshall, J. C. (2000) Clinical trials of mediator-directed therapy in sepsis: what have we learned?, *Intensive Care Med.* **26 Suppl 1**: S75-S83 .
276. Opal, S. M., Cross, A. S., Jhung, J. W., Young, L. D., Palardy, J. E., Parejo, N. A., Donsky, C. (1996) Potential hazards of combination immunotherapy in the treatment of experimental septic shock, *J.Infect.Dis.* **173**: 1415-1421 .
277. Wiedermann, F. J., Mittermayr, M., Hoffmann, G., Schobersberger, W. (2001) Recombinant granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) in infectious diseases: still a debate, *Wien.Klin.Wochenschr.* **113**: 90-96 .
278. Kumar, A. y Creery, W. D. (2000) The therapeutic potential of interleukin 10 in infection and inflammation, *Arch.Immunol.Ther.Exp.(Warsz.)* **48**: 529-538 .
279. Opal, S. M., Jhung, J. W., Keith, J. C., Jr., Palardy, J. E., Parejo, N. A., Young, L. D., Bhattacharjee, A. (1998) Recombinant human interleukin-11 in experimental *Pseudomonas aeruginosa* sepsis in immunocompromised animals, *J.Infect.Dis.* **178**: 1205-1208 .
280. Keusch, G. T. (1993) Antioxidants in infection, *J.Nutr.Sci.Vitaminol Tokyo* **39**: S23-S33 .

281. Conner, B. D. y Bernard, G. R. (2000) Acute respiratory distress syndrome. Potential pharmacologic interventions, *Clin.Chest Med.* **21**: 563-587 .
282. Weikert, L. F. y Bernard, G. R. (1996) Pharmacotherapy of sepsis, *Clin.Chest Med.* **17**: 289-305 .
283. Imai, M. (1985) [The effect of reduced glutathione on the changes of lipid-peroxide concentration in shock states--clinical and experimental studies], *Hokkaido Igaku Zasshi* **60**: 170-182 .
284. Blackwell, T. S., Blackwell, T. R., Holden, E. P., Christman, B. W., Christman, J. W. (1996) In vivo antioxidant treatment suppresses nuclear factor-kappa B activation and neutrophilic lung inflammation, *J.Immunol.* **157**: 1630-1637 .
285. Bakker, J., Zhang, H., Depierreux, M., van Asbeck, S., Vincent, J. L. (1994) Effects of N-acetylcysteine in endotoxic shock, *J.Crit Care* **9**: 236-243 .
286. Peristeris, P., Clark, B. D., Gatti, S., Faggioni, R., Mantovani, A., Mengozzi, M., Orencole, S. F., Sironi, M., Ghezzi, P. (1992) N-acetylcysteine and glutathione as inhibitors of tumor necrosis factor production, *Cell Immunol.* **140**: 390-399 .
287. Rojas, C., Cadenas, S., Herrero, A., Mendez, J., Barja, G. (1996) Endotoxin depletes ascorbate in the guinea pig heart. Protective effects of vitamins C and E against oxidative stress, *Life Sci.* **59**: 649-657 .
288. Suntres, Z. E. y Shek, P. N. (1996) Alpha-tocopherol liposomes alleviate LPS-induced hepatotoxicities, *J.Endotoxin.Res.* **3**: 505-512 .
289. Oberholzer, C., Oberholzer, A., Clare-Salzler, M., Moldawer, L. L. (2001) Apoptosis in sepsis: a new target for therapeutic exploration, *FASEB J.* **15**: 879-892 .
290. Oberholzer, A., Oberholzer, C., Minter, R. M., Moldawer, L. L. (2001) Considering immunomodulatory therapies in the septic patient: should apoptosis be a potential therapeutic target?, *Immunol.Lett.* **75**: 221-224 .

291. Oberbeck, R., Dahlweid, M., Koch, R., van Griensven, M., Emmendorfer, A., Tscherne, H., Pape, H. C. (2001) Dehydroepiandrosterone decreases mortality rate and improves cellular immune function during polymicrobial sepsis, *Crit Care Med.* **29**: 380-384 .
292. Ming, M. J., Hu, D. Y., Chen, H. S., Liu, L. M., Nan, X., Lu, R. Q. (2000) Effects of MCI-154, a calcium sensitizer, on cardiac dysfunction in endotoxic shock in rabbits, *Shock* **13**: 459-463 .
293. Schneider, H. y Atkinson, S. W. (2000) Immunonutrition - fact or fad, *J.Nutr.Health Aging* **4**: 120-123 .
294. Connolly, A. B. y Vernon, D. R. (2000) Manipulations of the metabolic response for management of patients with severe surgical illness: review, *World J.Surg.* **24**: 696-704 .
295. Suchner, U., Kuhn, K. S., Furst, P. (2000) The scientific basis of immunonutrition, *Proc.Nutr.Soc.* **59**: 553-563 .
296. Cadenas, S., Rojas, C., Barja, G. (1998) Endotoxin increases oxidative injury to proteins in guinea pig liver: protection by dietary vitamin C, *Pharmacol.Toxicol.* **82**: 11-18 .
297. Taniguchi, T., Yamamoto, K., Ohmoto, N., Ohta, K., Kobayashi, T. (2000) Effects of propofol on hemodynamic and inflammatory responses to endotoxemia in rats, *Crit Care Med.* **28**: 1101-1106 .
298. Rudbach, J. A. y Johnson, A. G. (1964) Restoration of endotoxin activity following alteration by plasma, *Nature* **202**: 811-812 .
299. Levin, J., Tomasulo, P. A., Oser, R. S. (1970) Detection of endotoxin in human blood and demonstration of an inhibitor, *J.Lab Clin.Med.* **75**: 903-911 .
300. Berger, D., Schleich, S., Seidelmann, M., Beger, H. G. (1990) Correlation between endotoxin-neutralizing capacity of human plasma as tested by the limulus-amebocyte-lysate-test and plasma protein levels, *FEBS Lett.* **277**: 33-36 .
301. Emancipator, K., Csako, G., Elin, R. J. (1992) In vitro inactivation of bacterial endotoxin by human lipoproteins and apolipoproteins, *Infect.Immun.* **60**: 596-601 .

302. Parker, T. S., Levine, D. M., Chang, J. C., Laxer, J., Coffin, C. C., Rubin, A. L. (1995) Reconstituted high-density lipoprotein neutralizes gram-negative bacterial lipopolysaccharides in human whole blood, *Infect.Immun.* **63**: 253-258 .
303. Harris, H. W., Eichbaum, E. B., Kane, J. P., Rapp, J. H. (1991) Detection of endotoxin in triglyceride-rich lipoproteins in vitro, *J.Lab Clin.Med.* **118**: 186-193 .
304. Ulevitch, R. J., Johnston, A. R., Weinstein, D. B. (1979) New function for high density lipoproteins. Their participation in intravascular reactions of bacterial lipopolysaccharides, *J.Clin.Invest* **64**: 1516-1524 .
305. Warren, H. S., Riveau, G. R., de Deckker, F. A., Chedid, L. A. (1988) Control of endotoxin activity and interleukin-1 production through regulation of lipopolysaccharide-lipoprotein binding by a macrophage factor, *Infect.Immun.* **56**: 204-212 .
306. Ulevitch, R. J. y Johnston, A. R. (1978) The modification of biophysical and endotoxic properties of bacterial lipopolysaccharides by serum, *J.Clin.Invest* **62**: 1313-1324 .
307. Weinstock, C., Ullrich, H., Hohe, R., Berg, A., Baumstark, M. W., Frey, I., Northoff, H., Flegel, W. A. (1992) Low density lipoproteins inhibit endotoxin activation of monocytes, *Arterioscler.Thromb.* **12**: 341-347 .
308. Mathison, J. C., Wolfson, E., Ulevitch, R. J. (1988) Participation of tumor necrosis factor in the mediation of gram negative bacterial lipopolysaccharide-induced injury in rabbits, *J.Clin.Invest* **81**: 1925-1937 .
309. Baumberger, C., Ulevitch, R. J., Dayer, J. M. (1991) Modulation of endotoxic activity of lipopolysaccharide by high-density lipoprotein, *Pathobiology* **59**: 378-383 .
310. Navab, M., Hough, G. P., Van Lenten, B. J., Berliner, J. A., Fogelman, A. M. (1988) Low density lipoproteins transfer bacterial lipopolysaccharides across endothelial monolayers in a biologically active form, *J.Clin.Invest* **81**: 601-605 .
311. Harris, H. W., Grunfeld, C., Feingold, K. R., Rapp, J. H. (1990) Human very low density lipoproteins and chylomicrons can protect against endotoxin-induced death in mice, *J.Clin.Invest* **86**: 696-702 .

312. Gordon, B. R., Parker, T. S., Levine, D. M., Saal, S. D., Wang, J. C., Sloan, B. J., Barie, P. S., Rubin, A. L. (1996) Low lipid concentrations in critical illness: implications for preventing and treating endotoxemia, *Crit Care Med.* **24**: 584-589 .
313. Feingold, K. R., Funk, J. L., Moser, A. H., Shigenaga, J. K., Rapp, J. H., Grunfeld, C. (1995) Role for circulating lipoproteins in protection from endotoxin toxicity, *Infect.Immun.* **63**: 2041-2046 .
314. Hardardottir, I., Grunfeld, C., Feingold, K. R. (1995) Effects of endotoxin on lipid metabolism, *Biochem.Soc.Trans.* **23**: 1013-1018 .
315. Hubsch, A. P., Casas, A. T., Doran, J. E. (1995) Protective effects of reconstituted high-density lipoprotein in rabbit gram-negative bacteremia models, *J.Lab Clin.Med.* **126**: 548-558 .
316. Quezado, Z. M., Natanson, C., Banks, S. M., Alling, D. W., Koev, C. A., Danner, R. L., Elin, R. J., Hosseini, J. M., Parker, T. S., Levine, D. M., . (1995) Therapeutic trial of reconstituted human high-density lipoprotein in a canine model of gram-negative septic shock, *J.Pharmacol.Exp.Ther.* **272**: 604-611 .
317. Pajkrt, D., Doran, J. E., Koster, F., Lerch, P. G., Arnet, B., van der, P. T., ten Cate, J. W., van Deventer, S. J. (1996) Antiinflammatory effects of reconstituted high-density lipoprotein during human endotoxemia, *J.Exp.Med.* **184**: 1601-1608 .
318. Pajkrt, D., Lerch, P. G., van der, P. T., Levi, M., Illi, M., Doran, J. E., Arnet, B., van den, E. A., ten Cate, J. W., van Deventer, S. J. (1997) Differential effects of reconstituted high-density lipoprotein on coagulation, fibrinolysis and platelet activation during human endotoxemia, *Thromb.Haemost.* **77**: 303-307 .
319. Opal, S. M. y Yu, R. L., Jr. (1998) Antiendotoxin strategies for the prevention and treatment of septic shock. New approaches and future directions, *Drugs* **55**: 497-508 .
320. Wurfel, M. M., Kunitake, S. T., Lichenstein, H., Kane, J. P., Wright, S. D. (1994) Lipopolysaccharide (LPS)-binding protein is carried on lipoproteins and acts as a cofactor in the neutralization of LPS, *J.Exp.Med.* **180**: 1025-1035 .

321. Brandtzaeg, P., Kierulf, P., Gaustad, P., Skulberg, A., Bruun, J. N., Halvorsen, S., Sorensen, E. (1989) Plasma endotoxin as a predictor of multiple organ failure and death in systemic meningococcal disease, *J.Infect.Dis.* **159**: 195-204 .
322. Benito, E. y Bosch, M. A. (1997) Impaired phosphatidylcholine biosynthesis and ascorbic acid depletion in lung during lipopolysaccharide-induced endotoxaemia in guinea pigs, *Mol.Cell Biochem.* **175**: 117-123 .
323. Berry, M. N. y Friend, D. S. (1969) High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells: a biochemical and fine structural study, *J.Cell Biol.* **43**: 506-520 .
324. Seglen, P. O. (1973) Preparation of rat liver cells. 3. Enzymatic requirements for tissue dispersion, *Exp.Cell Res.* **82**: 391-398 .
325. Seglen, P. O. (1973) Preparation of rat liver cells. II. Effects of ions and chelators on tissue dispersion, *Exp.Cell Res.* **76**: 25-30 .
326. Seglen, P. O. (1972) Preparation of rat liver cells. I. Effect of Ca²⁺ on enzymatic dispersion of isolated, perfused liver, *Exp.Cell Res.* **74**: 450-454 .
327. Van Bossuyt, H. y Wisse, E. (1988) Cultured Kupffer cells, isolated from human and rat liver biopsies, ingest endotoxin, *J.Hepatol.* **7**: 45-56 .
328. Figdor, C. G., Leemans, J. M., Bont, W. S., de Vries, J. E. (1983) Theory and practice of centrifugal elutriation (CE). Factors influencing the separation of human blood cells, *Cell Biophys.* **5**: 105-118 .
329. Bradford, J. P. (1986) *Biotechnol.Bioeng.* **28**: 570-577 .
330. Bertoncello, I., Bartelmez, S. H., Bradley, T. R., Hodgson, G. S. (1987) Increased Qa-m7 antigen expression is characteristic of primitive hemopoietic progenitors in regenerating marrow, *J.Immunol.* **139**: 1096-1103 .
331. Gressner, A. M. y Zerbe, O. (1987) Kupffer cell-mediated induction of synthesis and secretion of proteoglycans by rat liver fat-storing cells in culture, *J.Hepatol.* **5**: 299-310 .

332. Griffith, O. W. (1980) Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine, *Anal.Biochem.* **106**: 207-212 .
333. Tietze, F. (1969) Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues, *Anal.Biochem.* **27**: 502-522 .
334. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J.Biol.Chem.* **193**: 265-275 .
335. Massey, V. y Williams, C. H., Jr. (1965) On the reaction mechanism of yeast glutathione reductase, *J.Biol.Chem.* **240**: 4470-4480 .
336. Flohe, L. y Gunzler, W. A. (1984) Assays of glutathione peroxidase, *Methods Enzymol.* **105**: 114-121 .
337. Marklund, S. y Marklund, G. (1974) Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase, *Eur.J.Biochem.* **47**: 469-474 .
338. Beers, R. F. y Sizer, W. I. (1952) A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase, *J.Biol.Chem.* **195**: 133-140 .
339. Lück, H., (1965) en *Methods of enzymatic analysis*, Bergmeyer, H. U., Ed. (Verlag Chemie, Weinheim-Bersstrasse, Germany) .
340. Redgrave, T. G., Roberts, D. C., West, C. E. (1975) Separation of plasma lipoproteins by density-gradient ultracentrifugation, *Anal.Biochem.* **65**: 42-49 .
341. Ulevitch, R. J. (1978) The preparation and characterization of a radioiodinated bacterial lipopolysaccharide, *Immunochemistry.* **15**: 157-164 .
342. Garcia, R., Diaz-Laviada, I., Bosch, M. A., Abarca, S., Portoles, M. T., Risco, C., Ainaga, M. J., Pagani, R., Municio, A. M., Escalona, J. (1990) Morphological studies of cytotoxic lesions in reversible endotoxic shock, *Histol.Histopathol.* **5**: 43-48 .

343. Morgan, R. A., Manning, P. B., Coran, A. G., Drongowski, R. A., Till, G. O., Ward, P. D., Oldham, K. T. (1988) Oxygen free radical activity during live E. coli septic shock in the dog, *Circ.Shock* **25**: 319-323 .
344. Yoshikawa, T., Yoshida, N., Miyagawa, H., Tanigawa, T., Takemura, T., Morita, Y., Sugino, S., Kondo, M. (1988) Role of oxygen radicals in endotoxin shock and disseminated intravascular coagulation, *Basic Life Sci.* **49**: 933-940 .
345. Yoshikawa, T., Takemura, T., Tanigawa, T., Miyagawa, H., Yoshida, N., Sugino, S., Kondo, M. (1987) Role of lipid peroxidation and free radical scavengers on endotoxin shock, *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* **232**: 295-300 .
346. Kehrer, J. P. (1993) Free radicals as mediators of tissue injury and disease, *Crit Rev.Toxicol.* **23**: 21-48 .
347. Kunimoto, F., Morita, T., Ogawa, R., Fujita, T. (1987) Inhibition of lipid peroxidation improves survival rate of endotoxemic rats, *Circ.Shock* **21**: 15-22 .
348. Cadenas, E. y Garland, P. B. (1979) Synthesis of cytoplasmic membrane during growth and division of Escherichia coli. Dispersive behaviour of respiratory nitrate reductase, *Biochem.J.* **184**: 45-50 .
349. Wohaieb, S. A. y Godin, D. V. (1987) Alterations in tissue antioxidant systems in the spontaneously diabetic (BB Wistar) rat, *Can.J.Physiol Pharmacol.* **65**: 2191-2195 .
350. Taylor, D. E. y Piantadosi, C. A. (1995) Oxidative metabolism in sepsis and sepsis syndrome, *J.Crit Care* **10**: 122-135 .
351. Halliwell, B. (1994) Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence?, *Lancet* **344**: 721-724 .
352. Isaacs, J. T. y Binkley, F. (1977) Cyclic AMP-dependent control of the rat hepatic glutathione disulfide- sulfhydryl ratio, *Biochim.Biophys.Acta* **498**: 29-38 .
353. Lu, S. C., Garcia-Ruiz, C., Kuhlenkamp, J., Ookhtens, M., Salas-Prato, M., Kaplowitz, N. (1990) Hormonal regulation of glutathione efflux, *J.Biol.Chem.* **265**: 16088-16095 .

354. Hinshaw, L. B., Beller-Tood, B. K., Archer, L. T., y Schumer, W., (1985) *The reversible step toward death*. Hardaway, R. M. Eds. (J.Wright PSG Inc.,).
355. Lang, C. H., Bagby, G. J., Spitzer, J. J. (1985) Glucose kinetics and body temperature after lethal and nonlethal doses of endotoxin, *Am.J.Physiol* **248**: R471-R478 .
356. Inaba, H. y Filkins, J. P. (1991) Augmentation of endotoxic lethality and glucose dyshomeostasis by phorbol ester, *Am.J.Physiol* **260**: R494-R502 .
357. Keele, B. B., Jr., McCord, J. M., Fridovich, I. (1970) Superoxide dismutase from escherichia coli B. A new manganese- containing enzyme, *J.Biol.Chem.* **245**: 6176-6181 .
358. Masuda, A., Longo, D. L., Kobayashi, Y., Appella, E., Oppenheim, J. J., Matsushima, K. (1988) Induction of mitochondrial manganese superoxide dismutase by interleukin 1, *FASEB J.* **2**: 3087-3091 .
359. Wong, G. H. y Goeddel, D. V. (1988) Induction of manganous superoxide dismutase by tumor necrosis factor: possible protective mechanism, *Science* **242**: 941-944 .
360. Asayama, K., Janco, R. L., Burr, I. M. (1985) Selective induction of manganous superoxide dismutase in human monocytes, *Am.J.Physiol* **249**: C393-C397 .
361. Shiki, Y., Meyrick, B. O., Brigham, K. L., Burr, I. M. (1987) Endotoxin increases superoxide dismutase in cultured bovine pulmonary endothelial cells, *Am.J.Physiol* **252**: C436-C440 .
362. Wong, G. H. (1995) Protective roles of cytokines against radiation: induction of mitochondrial MnSOD, *Biochim.Biophys.Acta* **1271**: 205-209 .
363. Demple, B. y Amabile-Cuevas, C. F. (1991) Redox redux: the control of oxidative stress responses, *Cell* **67**: 837-839 .
364. Kaplan, J. H. y Groves, J. N. (1972) Liver and blood cell catalase activity of tumor-bearing mice, *Cancer Res.* **32**: 1190-1194 .

365. Gulati, S., Singh, A. K., Irazu, C., Orak, J., Rajagopalan, P. R., Fitts, C. T., Singh, I. (1992) Ischemia-reperfusion injury: biochemical alterations in peroxisomes of rat kidney, *Arch.Biochem.Biophys.* **295**: 90-100 .
366. Kono, Y. y Fridovich, I. (1982) Superoxide radical inhibits catalase, *J.Biol.Chem.* **257**: 5751-5754 .
367. Nelson, D. W., Brown, J. M., Banerjee, A., Bensard, D. D., Rogers, K. B., Locke-Winter, C. R., Anderson, B. O., Harken, A. H. (1991) Pretreatment with a nontoxic derivative of endotoxin induces functional protection against cardiac ischemia/reperfusion injury, *Surgery* **110**: 365-369 .
368. Frank, L., Yam, J., Roberts, R. J. (1978) The role of endotoxin in protection of adult rats from oxygen-induced lung toxicity, *J.Clin.Invest* **61**: 269-275 .
369. Ghosh, B., Hanevold, C. D., Dobashi, K., Orak, J. K., Singh, I. (1996) Tissue differences in antioxidant enzyme gene expression in response to endotoxin, *Free Radic.Biol.Med.* **21**: 533-540 .
370. Gerard-Monnier, D. y Chaudiere, J. (1996) [Metabolism and antioxidant function of glutathione], *Pathol.Biol.(Paris)* **44**: 77-85 .
371. Horbach, M. E., Sies, H., Akerboom, T. P. (1993) Identification of a hepatic plasma membrane glutathione S-transferase activated by N-ethylmaleimide, *Biochim.Biophys.Acta* **1148**: 61-66 .
372. Kaplowitz, N., Fernandez-Checa, J. C., Ookhtens, M., (1989) Hepatic glutathione transport, en *Glutathione Centennial, molecular perspectives and clinical implications*, Taniguchi, N., Ed. (Academic Press.
373. Jaeschke, H., Bautista, A. P., Spolarics, Z., Spitzer, J. J. (1991) Superoxide generation by Kupffer cells and priming of neutrophils during reperfusion after hepatic ischemia, *Free Radic.Res.Comm.* **15**: 277-284 .

374. Fernandez-Checa, J. C., Ookhtens, M., Kaplowitz, N. (1987) Effect of chronic ethanol feeding on rat hepatocytic glutathione. Compartmentation, efflux, and response to incubation with ethanol, *J.Clin.Invest* **80**: 57-62 .
375. Jaeschke, H. (1991) Vascular oxidant stress and hepatic ischemia/reperfusion injury, *Free Radic.Res.Comm.* **12-13 Pt 2**: 737-743 .
376. Jaeschke, H. (1992) Enhanced sinusoidal glutathione efflux during endotoxin-induced oxidant stress in vivo, *Am.J.Physiol* **263**: G60-G68 .
377. Meredith, M. J. (1991) Glutathione and glutathione conjugate efflux from cultured liver cells, *Cell Biol.Toxicol.* **7**: 15-33 .
378. Lu, S. C., Ge, J. L., Huang, H. Y., Kuhlenkamp, J., Kaplowitz, N. (1993) Thiol-disulfide effects on hepatic glutathione transport. Studies in cultured rat hepatocytes and perfused livers, *J.Clin.Invest* **92**: 1188-1197 .
379. Diaz-Laviada, I., Ainaga, J., Portoles, M. T., Carrascosa, J. L., Muncio, A. M., Pagani, R. (1991) Binding studies and localization of Escherichia coli lipopolysaccharide in cultured hepatocytes by an immunocolloidal-gold technique, *Histochem.J.* **23**: 221-228 .
380. Portoles, M. T., Diaz-Laviada, I., Ainaga, M. J., Pagani, R., Muncio, A. M. (1989) Involvement of cytochrome b5 in the cytotoxic response to Escherichia coli lipopolysaccharide, *Mol.Cell Biochem.* **87**: 79-84 .
381. Spolarics, Z., Stein, D. S., Garcia, Z. C. (1996) Endotoxin stimulates hydrogen peroxide detoxifying activity in rat hepatic endothelial cells, *Hepatology* **24**: 691-696 .
382. Spolarics, Z. (1998) Endotoxemia, pentose cycle, and the oxidant/antioxidant balance in the hepatic sinusoid, *J.Leukoc.Biol.* **63**: 534-541 .
383. Spolarics, Z. (1996) Endotoxin stimulates gene expression of ROS-eliminating pathways in rat hepatic endothelial and Kupffer cells, *Am.J.Physiol* **270**: G660-G666 .
384. Harbrecht, B. G. y Billiar, T. R. (1995) The role of nitric oxide in Kupffer cell-hepatocyte interactions, *Shock* **3**: 79-87 .

385. Monden, K., Arai, S., Itai, S., Sasaoki, T., Adachi, Y., Funaki, N., Tobe, T. (1991) Enhancement of hepatic macrophages in septic rats and their inhibitory effect on hepatocyte function, *J.Surg.Res.* **50**: 72-76 .
386. Harbrecht, B. G., Di Silvio, M., Chough, V., Kim, Y. M., Simmons, R. L., Billiar, T. R. (1997) Glutathione regulates nitric oxide synthase in cultured hepatocytes, *Ann.Surg.* **225**: 76-87 .
387. Clemens, M. G., Bauer, M., Gingalewski, C., Miescher, E., Zhang, J. (1994) Hepatic intercellular communication in shock and inflammation, *Shock* **2**: 1-9 .
388. Catala, M., Tesis de Licenciatura, Universidad Complutense (1993).
389. Spitzer, J. A. y Zhang, P. (1995) Hepatic cellular interactions in endotoxaemia and sepsis, *Biochem.Soc.Trans.* **23**: 993-998 .
390. Tian, L., Shi, M. M., Forman, H. J. (1997) Increased transcription of the regulatory subunit of gamma- glutamylcysteine synthetase in rat lung epithelial L2 cells exposed to oxidative stress or glutathione depletion, *Arch.Biochem.Biophys.* **342**: 126-133 .
391. Scholz, R. W., Saini, A. K., Reddy, P. C., Reddy, C. C. (1994) Dietary vitamin E and selenium effects on resistance to oxidative stress in rat liver mitochondria, *Biochem.Mol.Biol.Int.* **34**: 1215-1225 .
392. Garcia-Ruiz, C., Colell, A., Morales, A., Kaplowitz, N., Fernandez-Checa, J. C. (1995) Role of oxidative stress generated from the mitochondrial electron transport chain and mitochondrial glutathione status in loss of mitochondrial function and activation of transcription factor nuclear factor-kappa B: studies with isolated mitochondria and rat hepatocytes, *Mol.Pharmacol.* **48**: 825-834 .
393. Gutteridge, J. M. y Halliwell, B. (1989) Iron toxicity and oxygen radicals, *Baillieres Clin.Haematol.* **2**: 195-256 .
394. Alvarez, J. G. y Storey, B. T. (1989) Role of glutathione peroxidase in protecting mammalian spermatozoa from loss of motility caused by spontaneous lipid peroxidation, *Gamete Res.* **23**: 77-90 .

395. Simmons, T. W. y Jamall, I. S. (1988) Significance of alterations in hepatic antioxidant enzymes. Primacy of glutathione peroxidase, *Biochem.J.* **251**: 913-917 .
396. Popkova, N. I., Kernitskii, B. S., Sorochinskaia, E. P., Iurkov, V. A., Kucherenko, N. E. (1984) [Early manifestations of the effect of Salmonella endotoxin on the antioxidizing enzyme systems of the liver and intestines in the rat], *Biull.Eksp.Biol.Med.* **98**: 525-527 .
397. Sies, H. y Cadenas, E. (1985) Oxidative stress: damage to intact cells and organs, *Philos.Trans.R.Soc.Lond B Biol.Sci.* **311**: 617-631 .
398. Sakaguchi, S., Kanda, N., Hsu, C. C., Sakaguchi, O. (1981) Lipid peroxide formation and membrane damage in endotoxin-poisoned mice, *Microbiol.Immunol.* **25**: 229-244 .
399. Nishida, K., Ohta, Y., Kongo, M., Ishiguro, I. (1996) Response of endogenous reduced glutathione through hepatic glutathione redox cycle to enhancement of hepatic lipid peroxidation with the development of acute liver injury in mice intoxicated with carbon tetrachloride, *Res.Commun.Mol.Pathol.Pharmacol.* **93**: 198-218 .
400. van der, P. T., Buller, H. R., ten Cate, H., Wortel, C. H., Bauer, K. A., van Deventer, S. J., Hack, C. E., Sauerwein, H. P., Rosenberg, R. D., ten Cate, J. W. (1990) Activation of coagulation after administration of tumor necrosis factor to normal subjects, *N.Engl.J.Med.* **322**: 1622-1627 .
401. Tracey, K. J., Beutler, B., Lowry, S. F., Merryweather, J., Wolpe, S., Milsark, I. W., Hariri, R. J., Fahey, T. J., III, Zentella, A., Albert, J. D., . (1986) Shock and tissue injury induced by recombinant human cachectin, *Science* **234**: 470-474 .
402. Remick, D. G., Kunkel, R. G., Larrick, J. W., Kunkel, S. L. (1987) Acute in vivo effects of human recombinant tumor necrosis factor, *Lab Invest* **56**: 583-590 .
403. Eichacker, P. Q., Hoffman, W. D., Farese, A., Banks, S. M., Kuo, G. C., MacVittie, T. J., Natanson, C. (1991) TNF but not IL-1 in dogs causes lethal lung injury and multiple organ dysfunction similar to human sepsis, *J.Appl.Physiol* **71**: 1979-1989 .
404. Pettipher, E. R. y Wimberly, D. J. (1994) Cyclooxygenase inhibitors enhance tumour necrosis factor production and mortality in murine endotoxic shock, *Cytokine* **6**: 500-503 .

405. Koopmans, R., Hoek, F. J., van Deventer, S. J., van der, P. T. (1994) Model for whole body production of tumour necrosis factor-alpha in experimental endotoxaemia in healthy subjects, *Clin.Sci.(Colch.)* **87**: 459-465 .
406. Witthaut, R., Farhood, A., Smith, C. W., Jaeschke, H. (1994) Complement and tumor necrosis factor-alpha contribute to Mac-1 (CD11b/CD18) up-regulation and systemic neutrophil activation during endotoxemia in vivo, *J.Leukoc.Biol.* **55**: 105-111 .
407. Netea, M. G., Kullberg, B. J., Blok, W. L., Netea, R. T., van der Meer, J. W. (1997) The role of hyperuricemia in the increased cytokine production after lipopolysaccharide challenge in neutropenic mice, *Blood* **89**: 577-582 .
408. Wakabayashi, G., Gelfand, J. A., Burke, J. F., Thompson, R. C., Dinarello, C. A. (1991) A specific receptor antagonist for interleukin 1 prevents Escherichia coli-induced shock in rabbits, *FASEB J.* **5**: 338-343 .
409. Schade, F. U., Schlegel, J., Hofmann, D., Brade, H., Flach (1996) Endotoxin-tolerant mice produce an inhibitor of tumor necrosis factor synthesis, *J.Endotoxin.Res.* **3**: 455-562 .
410. Van Zee, K. J., DeForge, L. E., Fischer, E., Marano, M. A., Kenney, J. S., Remick, D. G., Lowry, S. F., Moldawer, L. L. (1991) IL-8 in septic shock, endotoxemia, and after IL-1 administration, *J.Immunol.* **146**: 3478-3482 .
411. Morales, A., Garcia-Ruiz, C., Miranda, M., Mari, M., Colell, A., Ardite, E., Fernandez-Checa, J. C. (1997) Tumor necrosis factor increases hepatocellular glutathione by transcriptional regulation of the heavy subunit chain of gamma- glutamylcysteine synthetase, *J.Biol.Chem.* **272**: 30371-30379 .
412. Adamson, G. M. y Billings, R. E. (1992) Tumor necrosis factor induced oxidative stress in isolated mouse hepatocytes, *Arch.Biochem.Biophys.* **294**: 223-229 .
413. Kuo, P. C. y Abe, K. Y. (1996) Nitric oxide-associated regulation of hepatocyte glutathione synthesis is a guanylyl cyclase-independent event, *Surgery* **120**: 309-314 .

414. Ceppi, E. D. y Titheradge, M. A. (1998) The importance of nitric oxide in the cytokine-induced inhibition of glucose formation by cultured hepatocytes incubated with insulin, dexamethasone, and glucagon, *Arch.Biochem.Biophys.* **349**: 167-174 .
415. Maier, R. V. y Ulevitch, R. J. (1981) The induction of a unique procoagulant activity in rabbit hepatic macrophages by bacterial lipopolysaccharides, *J.Immunol.* **127**: 1596-1600 .
416. Maitra, S. K., Rachmilewitz, D., Eberle, D., Kaplowitz, N. (1981) The hepatocellular uptake and biliary excretion of endotoxin in the rat, *Hepatology* **1**: 401-407 .
417. Nolan, J. P. (1981) Endotoxin, reticuloendothelial function, and liver injury, *Hepatology* **1**: 458-465 .
418. Ma, X. L., Lopez, B. L., Liu, G. L., Christopher, T. A., Gao, F., Guo, Y., Feuerstein, G. Z., Ruffolo, R. R., Jr., Barone, F. C., Yue, T. L. (1997) Hypercholesterolemia impairs a detoxification mechanism against peroxynitrite and renders the vascular tissue more susceptible to oxidative injury, *Circ.Res.* **80**: 894-901 .
419. Adamson, G. M. y Billings, R. E. (1993) Cytokine toxicity and induction of NO synthase activity in cultured mouse hepatocytes, *Toxicol.Appl.Pharmacol.* **119**: 100-107 .
420. Duval, D. L., Sieg, D. J., Billings, R. E. (1995) Regulation of hepatic nitric oxide synthase by reactive oxygen intermediates and glutathione, *Arch.Biochem.Biophys.* **316**: 699-706 .
421. Kuo, P. C., Abe, K. Y., Schroeder, R. A. (1996) Interleukin-1-induced nitric oxide production modulates glutathione synthesis in cultured rat hepatocytes, *Am.J.Physiol* **271**: C851-C862 .
422. Trauner, M., Nathanson, M. H., Mennone, A., Rydberg, S. A., Boyer, J. L. (1997) Nitric oxide donors stimulate bile flow and glutathione disulfide excretion independent of guanosine 3',5'-cyclic [corrected] monophosphate in the isolated perfused rat liver, *Hepatology* **25**: 263-269 .
423. Padgett, C. M. y Whorton, A. R. (1997) Glutathione redox cycle regulates nitric oxide-mediated glyceraldehyde- 3-phosphate dehydrogenase inhibition, *Am.J.Physiol* **272**: C99-108 .

424. Kuo, P. C. y Slivka, A. (1994) Nitric oxide decreases oxidant-mediated hepatocyte injury, *J.Surg.Res.* **56**: 594-600 .
425. Cook, J. A., Olanoff, L. S., Wise, W. C., Tempel, G. E., Reines, H. C., Halushka, P. V., (1985) Basic and clinical implications, en *Circulatory Shock*, (Academic Press, Inc..
426. Cutrin, J. C., Llesuy, S., Boveris, A. (1998) Primary role of Kupffer cell-hepatocyte communication in the expression of oxidative stress in the post-ischaemic liver, *Cell Biochem.Funct.* **16**: 65-72 .
427. Risco, C., Carrascosa, J. L., Bosch, M. A. (1991) Uptake and subcellular distribution of Escherichia coli lipopolysaccharide by isolated rat type II pneumocytes, *J.Histochem.Cytochem.* **39**: 607-615 .
428. Tobias, P. S., Gegner, J., Tapping, R., Orr, S., Mathison, J., Lee, J. D., Kravchenko, V., Han, J., Ulevitch, R. J. (1997) Lipopolysaccharide dependent cellular activation, *J.Periodontal Res.* **32**: 99-103 .
429. Day, J. R., Albers, J. J., Lofton-Day, C. E., Gilbert, T. L., Ching, A. F., Grant, F. J., O'Hara, P. J., Marcovina, S. M., Adolphson, J. L. (1994) Complete cDNA encoding human phospholipid transfer protein from human endothelial cells, *J.Biol.Chem.* **269**: 9388-9391 .
430. Munford, R. S., Hall, C. L., Dietschy, J. M. (1981) Binding of Salmonella typhimurium lipopolysaccharides to rat high- density lipoproteins, *Infect.Immun.* **34**: 835-843 .
431. Tobias, P. S. y Ulevitch, R. J. (1983) Control of lipopolysaccharide-high density lipoprotein binding by acute phase protein(s), *J.Immunol.* **131**: 1913-1916 .
432. Blackburn, W. D., Jr., Dohlman, J. G., Venkatachalapathi, Y. V., Pillion, D. J., Koopman, W. J., Segrest, J. P., Anantharamaiah, G. M. (1991) Apolipoprotein A-I decreases neutrophil degranulation and superoxide production, *J.Lipid Res.* **32**: 1911-1918 .
433. Roth, R. I., Levin, F. C., Levin, J. (1993) Distribution of bacterial endotoxin in human and rabbit blood and effects of stroma-free hemoglobin, *Infect.Immun.* **61**: 3209-3215 .

434. Adye, J. C., Springer, G. F., Murthy, J. R. (1973) On the nature and function of the lipopolysaccharide receptor from human erythrocytes, *Z.Immunitatsforsch.Exp.Klin.Immunol.* **144**: 491-496 .
435. Springer, G. F., Adye, J. C., Bezkorovainy, A., Murthy, J. R. (1973) Functional aspects and nature of the lipopolysaccharide-receptor of human erythrocytes, *J.Infect.Dis.* **128**: Suppl-12 .
436. Springer, G. F., Adye, J. C., Bezkorovainy, A., Jirgensons, B. (1974) Properties and activity of the lipopolysaccharide-receptor from human erythrocytes, *Biochemistry* **13**: 1379-1389 .
437. Morrison, D. C., Kline, L. F., Oades, Z. G., Henson, P. M. (1978) Mechanisms of lipopolysaccharide-initiated rabbit platelet responses: alternative complement pathway dependence of the lytic response, *Infect.Immun.* **20**: 744-751 .
438. Lichtman, S. N., Wang, J., Lemasters, J. J. (1998) LPS receptor CD14 participates in release of TNF-alpha in RAW 264.7 and peritoneal cells but not in kupffer cells, *Am.J.Physiol* **275**: G39-G46 .
439. Wurfel, M. M., Monks, B. G., Ingalls, R. R., Dedrick, R. L., Delude, R., Zhou, D., Lamping, N., Schumann, R. R., Thieringer, R., Fenton, M. J., Wright, S. D., Golenbock, D. (1997) Targeted deletion of the lipopolysaccharide (LPS)-binding protein gene leads to profound suppression of LPS responses ex vivo, whereas in vivo responses remain intact, *J.Exp.Med.* **186**: 2051-2056 .
440. Tomita, M., Yamamoto, K., Kobashi, H., Ohmoto, M., Tsuji, T. (1994) Immunohistochemical phenotyping of liver macrophages in normal and diseased human liver, *Hepatology* **20**: 317-325 .
441. Matsuura, K., Ishida, T., Setoguchi, M., Higuchi, Y., Akizuki, S., Yamamoto, S. (1994) Upregulation of mouse CD14 expression in Kupffer cells by lipopolysaccharide, *J.Exp.Med.* **179**: 1671-1676 .
442. Tracy, T. F., Jr. y Fox, E. S. (1995) CD14-lipopolysaccharide receptor activity in hepatic macrophages after cholestatic liver injury, *Surgery* **118**: 371-377 .

443. Maier, R. V., Mathison, J. C., Ulevitch, R. J. (1981) Interactions of bacterial lipopolysaccharides with tissue macrophages and plasma lipoproteins, *Prog.Clin.Biol.Res.* **62**: 133-155 .
444. van Oosten, M., van de, B. E., van Berkel, T. J., Kuiper, J. (1998) New scavenger receptor-like receptors for the binding of lipopolysaccharide to liver endothelial and Kupffer cells, *Infect.Immun.* **66**: 5107-5112 .
445. Wurfel, M. M. y Wright, S. D. (1997) Lipopolysaccharide-binding protein and soluble CD14 transfer lipopolysaccharide to phospholipid bilayers: preferential interaction with particular classes of lipid, *J.Immunol.* **158**: 3925-3934 .
446. Rensen, P. C., Oosten, M., Bilt, E., Eck, M., Kuiper, J., Berkel, T. J. (1997) Human recombinant apolipoprotein E redirects lipopolysaccharide from Kupffer cells to liver parenchymal cells in rats In vivo, *J.Clin.Invest* **99**: 2438-2445 .
447. Le Bail, B., Bioulac-Sage, P., Boulard, A., Boussarie, L., Quinton, A., Saric, J., Balabaud, C., (1989) Modifications of endothelial sinusoidal cells in liver pathology, en *Cells of the Hepatic Sinusoid*, Wisse, E., Knook, D. L., Decker, K., Eds. (Kupffer Cell Foundation, Rijswijk), vol. 2 .
448. Freeman, B. D. y Natanson, C. (2000) Anti-inflammatory therapies in sepsis and septic shock, *Expert.Opin.Investig.Drugs* **9**: 1651-1663 .