

BASES CELULARES Y MOLECULARES DE LA REACCIÓN INFLAMATORIA

*Mariano Sánchez Crespo
Instituto de Biología y Genética Molecular
CSIC-Universidad de Valladolid
Facultad de Medicina
47005-Valladolid, España*

- 1. La reacción inflamatoria: generalidades**
- 2. El sistema del complemento**
- 3. Los mecanismos de señalización bioquímica en la reacción inflamatoria**
- 4. La quimiotaxis de leucocitos**
- 5. Las citocinas y su mecanismo de acción**
- 6. Receptores para la porción Fc de las moléculas de inmunoglobulina**
- 7. Las moléculas de adhesión vascular**
- 8. Mediadores y mensajeros de naturaleza lipídica**
- 9. La explosión oxidativa en fagocitos y el sistema de la NADPH oxidasa**
- 10. El sistema del óxido nítrico**
- 11. La inflamación como mecanismo patogénico en la producción de enfermedad:
las reacciones de hipersensibilidad**
- 12. Repercusión sistémica de la reacción inflamatoria**

1. LA REACCION INFLAMATORIA: GENERALIDADES

La reacción inflamatoria

Es la respuesta del organismo al daño producido por agentes físicos, químicos o biológicos. Es generalmente beneficiosa, puesto que su evolución habitual es a la destrucción del agente nocivo y del tejido dañado, y a la reparación del daño. Se realiza a través de mecanismos celulares y moleculares redundantes. La importancia de la reacción inflamatoria en Patología se justifica porque en casi dos tercios de la totalidad de las enfermedades intervienen los mecanismos patogénicos propios de la respuesta inflamatoria.

Elementos que intervienen en la reacción inflamatoria

- i) El plasma sanguíneo aporta los anticuerpos y las proteínas de los sistemas de activación: *coagulación, complemento, cininas y fibrinolítico*.
- ii) El endotelio vascular aporta moléculas que regulan la reactividad vascular y el intercambio de plasma y elementos celulares de la sangre. Asimismo es capaz de expresar en su superficie las moléculas de adhesión responsables de los patrones de reclutamiento de los elementos celulares al intersticio celular.
- iii) Las células sanguíneas.
- iv) Las células del tejido conectivo: fibroblastos, mastocitos y macrófagos.

Los sistemas de activación en la reacción inflamatoria

Los sistemas de activación son un conjunto de proteínas, coordinadas en sus funciones, que se encuentran en el plasma y funcionan de acuerdo con unas propiedades funcionales comunes: secuencia de activación definida, activación rápida y amplificación. Por su importancia en la reacción inflamatoria deben mencionarse:

- i) *El sistema de la coagulación* se encarga de bloquear los vasos eferentes del foco inflamatorio para evitar la difusión del agente nocivo.
- ii) *El sistema fibrinolítico* se encarga de repermeabilizar los vasos, una vez pasado el episodio inflamatorio.
- iii) *El sistema de las cininas* se encarga de aumentar la luz vascular para aumentar el aporte sanguíneo y de contraer el músculo liso para evitar la difusión del agente pro-inflamatorio.
- iv) *El sistema del complemento* se encarga de destruir agentes patógenos y células infectadas.

2. EL SISTEMA DEL COMPLEMENTO

El complemento constituye un componente integral de la defensa frente a la infección y de la respuesta inflamatoria. Las actividades generadas para su utilización en ambos procesos, se derivan de proteínas precursoras y de la fusión de múltiples proteínas en una organización supramolecular. Estas proteínas son en muchos casos serina-proteasas que se activan por proteólisis de forma secuencial. El sistema se compone de unas treinta proteínas plasmáticas. Además, existen varios receptores de membrana expresados en las superficies externas de las células del sistema inmuno-inflamatorio encargadas de ligar de forma selectiva los productos generados durante la activación del

sistema del complemento. El sistema se completa con una serie de proteínas reguladoras que protegen a las células del ataque por activación accidental del sistema del complemento. El papel del sistema del complemento en la defensa frente a la infección se ha hecho evidente a partir de distintas fuentes de información: i) La existencia de infecciones recurrentes y severas en los individuos con deficiencias genéticas de proteínas del complemento. ii) La demostración de que el daño tisular es dependiente de la activación del sistema del complemento en modelos experimentales de daño tisular por mecanismo inmune. iii) Los estudios funcionales en animales con destrucción selectiva de genes que codifican receptores para proteínas del complemento mediante técnicas de biología molecular.

El sistema del complemento está organizado en dos vías de activación que conducen a una vía común de ataque a la membrana: La llamada vía clásica se activa por complejos antígeno-anticuerpo. La vía alternativa se activa cuando un componente activado del complemento (C3b) se une a la superficie de un patógeno, donde escapa a la acción de las moléculas reguladoras.

La vía clásica de activación del complemento

La vía clásica se pone en marcha cuando una molécula de C1 se une a un complejo antígeno anticuerpo. El C1 es un complejo de una subunidad de C1q, dos subunidades de C1r y dos subunidades de C1s. El C1q tiene seis sitios de unión para la porción Fc de la molécula de anticuerpo. La afinidad de una subunidad aislada de C1q para cada porción Fc es baja, de tal manera que se requieren al menos dos sitios para la unión estable de C1q y la consiguiente activación de C1r. Por esta razón se requieren dos moléculas de IgG yuxtapuestas o una molécula de IgM modificada, de tal manera que la IgG y la IgM libres no activan el complemento. El C1r activado hidroliza al C1s para generar la proteasas activa C1s, que a su vez hidroliza C4 para formar C4a y C4b, y después que el C2 se ha unido al C4b, se genera **C4bC2a**: la C3-convertasa de la vía clásica.

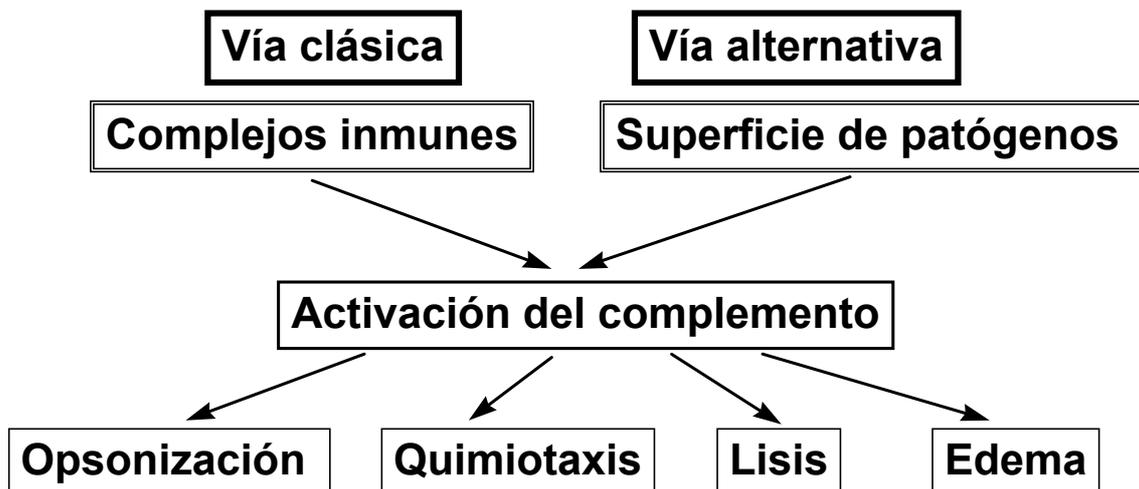
La vía alternativa de activación del complemento

La vía alternativa depende de la generación de C3 activado. Posteriormente, el ataque espontáneo por el agua del enlace éster-tiol del C3 en solución, genera una forma activa: C3(H₂O), que es equivalente al C3b. Este proceso ocurre de manera constitutiva a un ritmo lento (*C3 tickover*). El C3b puede ser también proporcionado por la vía clásica, de tal manera que la vía alternativa es un mecanismo positivo de autoregulación, incluso cuando existe una activación prototípica de la vía clásica por complejos inmunes. El enlace éster-tiol activado normalmente decae en solución, sin embargo, cuando se une a una superficie celular o a los complejos inmunes recluta secuencialmente a los factores B y D para generar la convertasa de la vía alternativa: **C3bBb**.

Este complejo es de corta duración pero puede estabilizarse en algunas superficies microbianas mediante la unión de otra proteína sérica: la properdina.

Los efectos biológicos de la activación del complemento

- i) *Opsonización*. El C3b y, en menor grado, el C4b son opsoninas, es decir, revisten a las partículas extrañas para que puedan ser fagocitadas mediante la unión a receptores específicos del complemento.
- ii) *Inflamación*. Las anafilatoxinas C5a, y en menor medida, C4a y C3a son verdaderos mediadores inflamatorios que producen aumento de la permeabilidad vascular, reclutamiento y activación de fagocitos.
- iii) *Lisis*. El C5b une y recluta C6 y C7 a la superficie blanco. C7 y, subsiguientemente, C8 cambian su conformación para exponer los dominios hidrofóbicos e insertarlos en la bicapa lipídica. El complejo C5b678 cataliza la polimerización del componente final C9, el cual forma un poro transmembrana de, aproximadamente, 10 nm de diámetro y produce la lisis de la célula. Este complejo macromolecular se conoce con el nombre de complejo de ataque a la membrana (*membrane attack complex*, MAC).
- iv) *Aclaramiento de complejos inmunes*. El complemento tiene un importante papel en la solubilización y la remoción de la circulación de los complejos inmunes. Esta función se efectúa por la interacción de las moléculas de C4b y C3b unidas covalentemente al complejo inmune con los receptores de complemento expresados en los hematíes, denominados CR1. Esta interacción permite transportar los complejos al hígado y al bazo para que sean eliminados por fagocitosis por las células del sistema mononuclear fagocitario presentes en esos órganos.



Esquema de las vías de activación del sistema del complemento y de la generación de actividades proinflamatorias.

Regulación de la activación del complemento

Existen tres niveles principales de regulación del sistema del complemento

- i) *C1*. El inhibidor de C1 (C1 INH) actúa de dos maneras. En primer lugar se une al C1 libre en el suero e impide su activación espontánea. Se libera al producirse la activación por los complejos inmunes. También limita la activación de C4 y C2 al inhibir las proteasas C1r y C1s.
- ii) *C3 convertasas*. La vida media de las convertasas de C3 se limita por dos mecanismos. La vida media de los complejos se reduce por los denominados factores aceleradores del decaimiento (*decay accelerating factors*). Algunos de estos factores se encuentran en las superficies de las células, por ejemplo el DAF y el CR1, que actúan sobre las convertasas de la vía clásica y de la vía alternativa. Otros son proteínas del suero, como C4-binding protein (C4bp) y factor H, que actúan respectivamente sobre C4b2b y C3bBb. Estas moléculas promueven la disociación de las C3 convertasas mediante unión al componente unido covalentemente (C4b o C3b) y desplazando al cofactor asociado.
- iii) *C9*. La unión de C9 a C5b678 se inhibe por dos proteínas de superficie CD59 y HRF (*homologous restriction factor*).

Receptores del complemento

El denominado receptor de complemento 1 (CR1) une C3b y C4b. El CR1 se encuentra en los hematíes, donde, como se ha mencionado, juega un papel fundamental en la remoción de los complejos inmunes de la circulación. También se encuentra en los macrófagos y neutrófilos donde coopera en la inducción de la fagocitosis. El denominado receptor de complemento 2 (CR2) une iC3b, y se encuentra en las células B, donde juega un papel en el cambio de la clase de anticuerpos sintetizados y en la memoria inmune. CR3 y CR4 son receptores relacionados que unen iC3b (C3b hidrolizado en su cadena α por la acción de los factores H y I) y se encuentran en monocitos/macrófagos y neutrófilos. Desencadenan la fagocitosis de partículas opsonizadas en cooperación con los receptores para la porción Fc o, incluso, de forma independiente. La fagocitosis de microorganismos vía CR3, y vía CR1 en combinación con Fc γ R, es el principal mecanismo de defensa contra las infecciones fúngicas y bacterianas.

Deficiencias de factores del complemento

Se han descrito deficiencias de prácticamente todos los componentes del sistema del complemento en el humano. Las deficiencias de los componentes C1, C2 y C4 bloquean la activación por la vía clásica y se asocian con enfermedades por depósito tisular de inmunocomplejos. La deficiencia del inhibidor de C1 se manifiesta por la aparición de episodios de edema angioneurótico. El déficit de C3 se asocia con episodios recurrentes de infecciones bacterianas. Las deficiencias de C5, C6, C7, C8, properdina y factor D se asocian con incremento de las infecciones por gérmenes del género *Neisseria*. Mutaciones en el factor H se han asociado recientemente con formas atípicas o no

diarreicas del síndrome hemolítico urémico y con glomerulonefritis membranoproliferativas de tipo II. El mecanismo patogénico subyacente en esas deficiencias sería la activación no controlada del sistema del complemento sobre el endotelio o en la membrana basal glomerular tras un daño inicial que sería autolimitado en ausencia de esa mutación.

3. LOS MECANISMOS DE SEÑALIZACIÓN BIOQUÍMICA EN LA REACCIÓN INFLAMATORIA

Análisis molecular de la reacción inflamatoria

El estudio molecular de la reacción inflamatoria requiere estudiar:

- i) Los mecanismos de la transducción de señales y la comunicación intercelular: movimientos de iones, activación de kinasas y activación de la expresión génica.
- ii) Las enzimas de los sistemas de activación, de la señalización intracelular y de la producción de mediadores químicos
- iii) Las interacciones moleculares entre citocinas, mediadores y mensajeros lipídicos, y moléculas de adhesión.

Transducción de señales

Conjunto de mecanismos moleculares que permiten el paso de una información desde el exterior al interior de la célula. Aunque el concepto se aplica el conjunto de la biología celular, en la respuesta inmuno-inflamatoria tiene especial relevancia puesto que la reacción defensiva depende de una adecuada detección y respuesta celular a los agentes proinflamatorios.

Existen dos tipos de comunicación celular principales en el sistema inmunitario:

- i) Mediante interacción de moléculas solubles con receptores. Ejemplos: interleucinas/receptores de interleucinas, agentes quimiotácticos/receptores de 7 dominios transmembrana.
- ii) Mediante interacción de dos receptores de superficie. Ejemplos: TCR (receptor de células T)-CMH (complejo mayor de histocompatibilidad)/péptido antigénico, interacción leucocito/célula endotelial a través de moléculas de adhesión vascular.

La señalización celular pone en marcha dos vías de respuesta:

- i) Precoz o citoplásmica, por ejemplo, la degranulación de los mastocitos y la contracción del músculo liso bronquial en una reacción anafiláctica.
- ii) Tardía o nuclear, dependiente de la expresión génica y de cambios fenotípicos, por ejemplo, la síntesis de citocinas, proliferación celular o apoptosis.

Receptores principales en el sistema inmunitario implicados en la reacción inflamatoria

Receptores acoplados a proteínas G heterotriméricas:

Su estudio detallado tiene un interés especial, puesto que la quimiotaxis se realiza en su conjunto a través de quimiotrayentes que actúan sobre receptores acoplados a proteínas G.

Se distinguen proteínas G de alto peso molecular, heterotriméricas compuestas de tres sub-unidades: α , β y γ . Existen también proteínas G de bajo peso molecular agrupadas en varias familias: Ras, Rho, ...

Todas las proteínas G poseen dos funciones ligadas al metabolismo del GTP, lo que explica que se conozcan como proteínas G: capacidad para unir GTP, y capacidad de hidrolizarlo a GDP. La ocupación de los receptores acoplados a proteínas cambia el nucleótido unido a la subunidad α de la proteína G de tal manera que intercambia GDP por GTP y se produce la disociación de esta unidad de las subunidades $\beta\gamma$.

Receptores ligados a actividad kinasa:

Receptores con actividad proteína tirosina kinasa (PTK), serina/treonina kinasa, o con especificidad kinasa dual .

Se dividen en dos grandes tipos:

i) Receptores con actividad catalítica intrínseca en la porción intracitoplásmica.

Ejemplo: Factores de crecimiento hematopoyéticos.

ii) Receptores que acoplan kinasas intracitoplásmica de manera no permanente utilizando para ello dominios adaptatorios.

Ejemplo: Receptores para la porción Fc de la molécula de inmunoglobulina.

Receptores ligados a actividad fosfatasa: En este caso también existen actividades fosfatasa intrínseca, como en el caso de la molécula CD45, o reclutamiento de actividad fosfatasa citoplásmica como en algunos tipos de receptores Fc γ R.

Dominios adaptatorios en los receptores de membrana:

Son dominios localizados en la porción intracelular de los receptores de membrana, que permiten el anclaje de moléculas citoplasmática implicadas en la transducción de la señal producida por la ocupación de los receptores. Se distinguen tres tipos fundamentales de dominios adaptadores.

i) Dominios SH2 (sarcoma homology 2). Se componen de una porción de alrededor de 100 aminoácidos en los que se encuentran tirosinas fosforilables, que a su vez reclutan las tirosinas fosforiladas de otras proteínas citosólicas. Los dominios P-YXXM, interaccionan con el dominio SH2 de la fosfatidilinositol 3-kinasa. Los dominios que contienen P-YXXL, interaccionan con el dominio SH2 de los miembros de la familia *scr*.

ii) Dominios SH3, contienen alrededor de 50 aminoácidos y reclutan secuencias ricas en prolina.

iii) Dominios de homología de pleckstrina (Pleckstrin Homology domain, PH). Interaccionan con inositol 3-fosfato y con las subunidades $\beta\gamma$ de las proteínas G heterotriméricas.

Segundos mensajeros: Los segundos mensajeros mejor caracterizados por su intervención en la mediación de las respuestas inducidas por agonistas son:

i) El ácido adenílico cíclico (AMP cíclico), producido por la activación de adenilato ciclasas.

ii) El ácido guanílico cíclico (GMPcíclico), producido por guanilato ciclasas. Es uno de los efectores de la acción del óxido nítrico en el sistema vascular.

iii) El diacilglicerol (DAG), producido por fosfolipasas C.

- iv) El inositol 1,4,5 trisfosfato (IP_3), producido también por fosfolipasas C al actuar sobre fosfoinosítidos. Su acción fundamental es sobre la movilización de iones calcio de los depósitos intracelulares.
- v) Iones calcio.

La cascada de las MAP kinasas

La cascada de proteín-kinasas activadas por mitógenos (MAP kinasas) es un sistema de señalización intracelular ampliamente conservado en eucariotas que consiste en tres módulos paralelos de kinasas, compuestos a su vez de distintas kinasas que actúan en cascada y son las encargadas de transmitir al núcleo de células en estado quiescente la información necesaria para iniciar el proceso de división celular. La relación de esta cascada con la reacción inflamatoria se debe a que tanto las citocinas proinflamatorias TNF e IL-1, como fenómenos pro-inflamatorios como el choque térmico, la hiperosmolaridad o la radiación ultravioleta son potentes activadores de alguno de los módulos de esta cascada. Los módulos de la cascada de las MAP kinasas son el módulo ERK/MAP, el módulo SAPK (proteín-kinasas activadas por stress) y el módulo p38. El módulo ERK/MAP se activa cuando ligandos específicos ocupan receptores con actividad tirosina kinasa o de la familia de siete dominios transmembrana, mientras que los módulos SAPK y p38 se activan preferentemente por citocinas proinflamatorias y stress ambiental. Los elementos sucesivos de la cascada que componen los distintos módulos son serina/treonina quinasas (MAP kinasa kinasa kinasa) que fosforilan a los elementos del segundo nivel denominados MAP kinasa kinasa o MEK. Los elementos de este segundo nivel poseen actividad serina y tirosina kinasa sobre dominios específicos de las MAP kinasas propiamente dichas. Estas enzimas serán los efectores finales de los sustratos celulares responsables de los cambios fenotípicos o de la respuesta nuclear a los agonistas iniciales.

Factores de transcripción

Son proteínas con capacidad de unirse a secuencias específicas de los genes, que modifican el estado de la transcripción basal. En el sistema inmune son importantes factores de transcripción como ISRE, activado como consecuencia de la estimulación por citocinas cuyo sistema de señalización incluye el sistema JAK/STAT, y NF- κ B que activa numerosos elementos efectores de la respuesta inflamatoria.

El factor de transcripción NF- κ B (nuclear factor κ B)

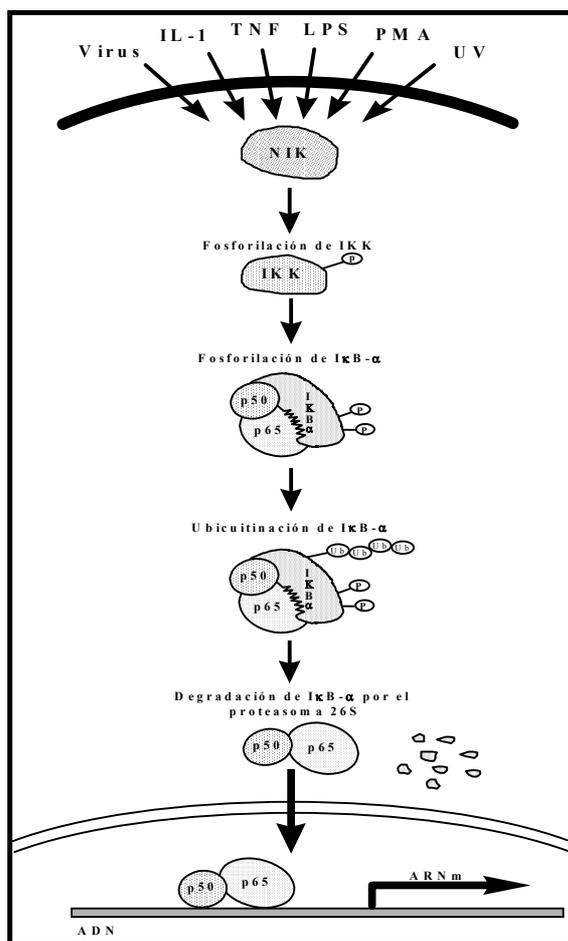


Figura 1.5. Activación de NF- κ B. NIK, NF- κ B inducer kinase

El factor de transcripción NF- κ B fue descrito por primera vez en 1986 por Sen y Baltimore en el *enhancer* del promotor de la cadena ligera κ de las inmunoglobulinas en los linfocitos B, lo que explica su denominación. En los años siguientes se encontraron secuencias de unión de este factor de transcripción en los promotores de numerosos genes relacionados con el sistema inmune como citocinas, (IL-2, IL-6, GM-CSF), moléculas de adhesión ICAM, VCAM, y enzimas inducibles de la respuesta inflamatoria (sintasa de óxido nítrico, ciclooxigenasa-2). NF- κ B, además de desempeñar un papel central en la inflamación y la respuesta inmune, interviene en la proliferación celular y en la apoptosis. Los sitios de unión a NF- κ B sirven como elementos reguladores de la transcripción que responden, principalmente, a estímulos inmunológicos, como TNF α , IL-1, LPS y receptores para la porción Fc de la molécula de inmunoglobulinas, factores de crecimiento; y a estímulos como la radiación ultravioleta.

En las células en reposo el NF- κ B se encuentra inactivo en el citoplasma

asociado con una proteína inhibitoria, I κ B. La liberación de I κ B permite la rápida activación de NF- κ B y su translocación al núcleo. Así, ciertos genes regulados por NF- κ B pueden ser activados transcripcionalmente en minutos.

Hasta el momento se han clonado en mamíferos 5 miembros de la familia de proteínas NF- κ B/Rel: c-Rel, NF- κ B1 (p50/p105), NF- κ B2 (p52/p100), Rel A (p65) y Rel B. Además se han clonado 2 proteínas en *Drosophilla*: Dorsal y Dif. En cuanto a la proteína inhibitoria se conocen: I κ B α , I κ B β , I κ B γ , I κ B ϵ , Bcl-3 y las formas precursoras NF- κ B1 y NF- κ B2. En *Drosophilla* se ha clonado una proteína homóloga, Cactus que regula la activación de Dorsal y Dif.

En 1997 se caracterizaron algunas kinasas que intervienen en la ruta de activación de NF- κ B. En la célula en reposo el miembro mejor caracterizado de la familia de inhibidores, I κ B- α , se une al heterodímero p50/p65 en el citoplasma. Cuando las células se exponen a los inductores de NF- κ B, tales como, TNF- α o IL-1 β , dos serinas de I κ B- α (Ser³² y Ser³⁶) se fosforilan específicamente. Esta fosforilación es una señal de ubiquitinación, la ubiquitina marca a la proteína para su posterior degradación por el proteasoma 26S. Entonces el NF- κ B se libera, se transloca al núcleo y activa la transcripción de genes. Recientemente varios grupos han identificado y clonado 2

quinasas que fosforilan I κ B- α : IKK β (Kinasa α de I κ B) e IKK β , también se ha descrito una kinasa que fosforila a estas kinasas, NIK (NF- κ B inducer kinase).

La familia de factores nucleares de células T activadas (NFAT)

Estos factores han recibido enorme atención en los últimos años puesto que son los blancos farmacológicos de drogas inmunosupresoras ampliamente usadas en clínica como la ciclosporina. Las proteínas de esta familia juegan un papel importante en la regulación de la expresión de genes de citocinas y de otras proteínas implicadas en la respuesta inmune. Estos factores se encuentran preformados en el citoplasma en un estado fosforilado que impide su translocación al núcleo celular y su interacción con las secuencias específicas de los promotores. Sin embargo, cuando las células del sistema inmune se activan por distintos agonistas, se produce activación de fosfatasa dependientes de calcio y calmodulina, como la calcineurina, que provocan la defosforilación de los factores NFAT y permiten su traslocación al núcleo celular. Estas fosfatasas son inhibidas por ciclosporina y FK506. Las proteínas de la familia NFAT muestran ciertas analogías con las proteínas de la familia Rel/NF- κ B, y en algunos casos actúan de forma coordinada con estas proteínas o con miembros de la familia AP-1

Mediadores de la reacción inflamatoria

Son moléculas liberadas en el foco inflamatorio que presentan las siguientes características:

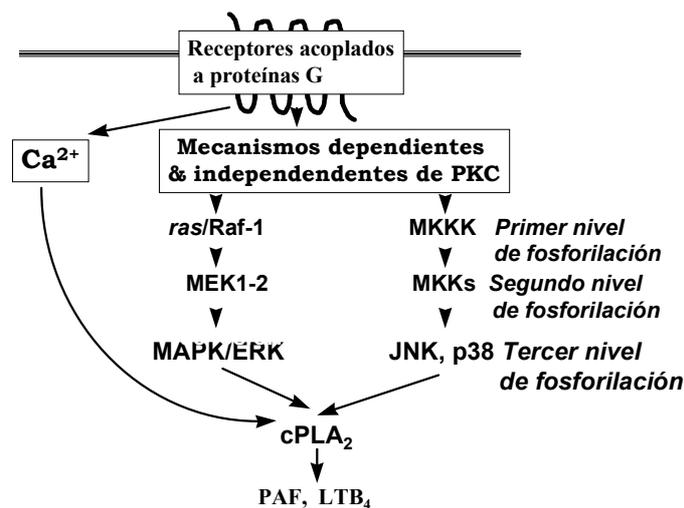
- i) Actúan en un entorno local intermedio entre el de las hormonas y el de los neurotransmisores.
- ii) Intervienen en la comunicación celular al ser liberadas por células y actúan sobre otros tipos celulares a través de receptores específicos.
- iii) En su espectro de acciones biológicas destacan dos características: la pleiotropía y la redundancia. Sobre esta base, un mediador puede actuar sobre distintos blancos y ejercer sobre ellos diversos efectos (pleiotropía), por otra parte, distintos mediadores pueden ejercer el mismo efecto el mismo blanco celular (redundancia).

4. LA QUIMIOTAXIS DE LEUCOCITOS

El término *quimiotaxis* indica el movimiento de los leucocitos (o de las células en general) inducido por un agente químico de manera estimulada y directa. Además de la quimiotaxis, los leucocitos tienen otros tipos de movimiento. El movimiento espontáneo y carente de dirección recibe el nombre de *migración al azar*, mientras que el movimiento inducido, y carente de dirección se denomina *quimioquinesis*. El estímulo quimiotáctico es proporcionado por sustancias que pueden atraer o repulsar a las células, de tal manera que el movimiento quimiotáctico puede ser positivo o negativo. El movimiento positivo es característico de los leucocitos. Las sustancias que poseen actividad quimiotáctica se denominan factores quimiotácticos o quimioatrayentes y pueden ser exógenos o endógenos. Entre los exógenos merecen especial mención productos de origen bacteriano: oligopéptidos formilados del tipo N-formil-metionil-leucil-fenilalanina (FMLP), lectinas y lipopolisacáridos. Los agentes quimiotácticos endógenos son productos humorales derivados de la activación del sistema del

complemento (anafilatoxina C5a), o productos de origen celular de naturaleza lipídica (leucotrieno B₄ y PAF) o peptídica (citocinas quimiotácticas o quemocinas).

Todos estos agentes actúan a través de receptores específicos de membrana del tipo de los acoplados a proteínas G heterotriméricas y producen una serie de reacciones bioquímicas coordinadas, que incluyen: cambios del potencial transmembrana, variaciones de los niveles intracelulares de nucleótido cíclicos, modificación de los flujos iónicos a través de la membrana plasmática, activación de la cascada de las MAP kinasas, aumento de la utilización de la glucosa y del metabolismo del oxígeno, y liberación del ácido araquidónico de los fosfolípidos de membrana para su posterior transformación en metabolitos oxigenados conocidos colectivamente con el nombre de eicosanoides. En unos pocos minutos la morfología leucocitaria se modifica, pasando de su forma redondeada a un aspecto triangular orientada a lo largo del gradiente de concentración del agente quimiotáctico, y dependiente de la reorganización de los elementos contráctiles del citoesqueleto, particularmente los microfilamentos de actina y las estructuras microtubulares. Estos cambios producen también aumento de la adherencia celular que permite establecer interacciones estables con otros tipos celulares y secreción de enzimas lisosomales.



Señalización a través de los los quimioatrayentes: Se produce movilización de iones calcio, activación de receptores de proteína kinasa C, activación de la cascada de MAP kinasas y producción de mediadores lipídicos. Se indica la posición de los distintos niveles de fosforilación por las MAP kinasas.

Características de los receptores de los agentes quimiotácticos

Todos los genes clonados hasta la fecha carecen de intrones en su pauta de lectura abierta y poseen siete dominios transmembrana enriquecidos en aminoácidos hidrofóbicos, alternando con otros más polares. Las propiedades más características de estos receptores son:

- i) Secuencias de longitud similar, aproximadamente 350 aminoácidos.

- ii) El extremo N-terminal es extracelular y el C-terminal intracelular.
- iii) Poseen siete dominios transmembrana α -helicoidales.
- iv) Contienen tres bucles intra y extracelulares.
- v) Existe un puente disulfuro que conecta residuos de cisteína entre el primero y el segundo bucle extracelular.
- vi) Contienen residuos de asparragina que son sitios potenciales de glicosilación en el extremo N-terminal.
- vii) Existen abundantes residuos de serina y treonina en el extremo C-terminal que pueden ser fosforilados e intervienen en la regulación del receptor.

Quemocinas

Las quemocinas (abreviatura de *quemoatrayentes citocinas*) constituyen una superfamilia de varias decenas de elementos que intervienen en la reacción inflamatoria por su capacidad para iniciar y mantener la migración de leucocitos a los tejidos. Se componen de una cadena polipeptídica cuya extensión varía entre 8 y 11 kD de peso molecular. Son muy activas a concentraciones de 1 a 100 ng/ml, y son producidas por numerosos tipos celulares. Su producción se induce por agentes exógenos como la endotoxina bacteriana, mediadores endógenos como IL-1 β , TNF- α , PDGF (*platelet-derived growth factor*), IFN- γ y estimulación de receptores para la porción Fc de la molécula de anticuerpo. Las quemocinas se unen a receptores específicos de la superficie celular y son citocinas de segundo orden de respuesta, menos pleiotrópicas que las citocinas de primer orden (citocinas proinflamatorias) puesto que no inducen a otras citocinas y poseen una función quimiotáctica muy especializada. La característica estructural más notable de las quemocinas es la presencia de cuatro residuos conservados de cisteína que forman un puente disulfuro. Es clásica la división en dos subgrupos de la superfamilia de quemocinas: C-X-C (donde C indica cisteína y X representa cualquier aminoácido) y C-C. Esta distinción ha permitido delinear una distinción entre sus propiedades biológicas. Así, la mayoría de las quemocinas C-X-C atraen a los polimorfonucleares neutrofilos y no a monocitos, mientras que las quemocinas C-C atraen monocitos, basófilos, eosinófilos y linfocitos, pero no neutrófilos.

La interleucina 8 (IL-8) es la molécula prototípica de quemocina C-X-C. El perfil de la actividad biológica de la IL-8 es muy similar al de los quimioatrayentes clásicos de naturaleza polipeptídica C5a y FMLP (N-formil-metioonil-leucil-fenilalanina), o lipídica (PAF y leucotrieno B₄) e induce el patrón completo de respuestas observable en los neutrófilos activados, como la activación de la motilidad, la migración direccional, la expresión de moléculas de adhesión, la liberación de enzimas lisosomales y la producción de metabolitos reactivos del oxígeno. IL-8 es también un potente factor angiogénico.

La primera situación clínica asociada con altos niveles de IL-8 ha sido el psoriasis, puesto que se encontraron altas cantidades de esta quemocina en las lesiones cutáneas. Se han descrito recientemente niveles urinarios elevados de IL-8 en pacientes con varios tipos de nefropatía glomerular caracterizadas por la presencia de infiltración de polimorfonucleares y monocitos y proliferación de las células mesangiales como son la nefropatía por depósito mesangial de inmunoglobulina A (Enfermedad de Berger), glomerulonefritis aguda postinfecciosa, glomerulonefritis de la purpura de Schönlein-

Henoch y nefritis lúpica, pero no en casos de glomerulosclerosis focal o nefropatía membranosa. Los estudios inmunohistoquímicos han demostrado en estos casos la presencia de proteína IL-8 en las células inflamatorias del glomérulo renal, lo que sugiere la participación de la IL-8 en el reclutamiento de las células del infiltrado y en la inducción del daño tisular.

MCP-1 (*monocyte-chemoattractant-protein 1*) es el elemento prototípico de la subfamilia C-C. MCP-1 atrae a los monocitos humanos a la concentración óptima de agonista 1 nM, durante un periodo de 24-48 horas tras la interacción entre un antígeno específico y linfocitos sensibilizados. Puesto que MCP-1 es también activa sobre los basófilos y produce liberación de histamina, se ha propuesto su participación en la patogenia de la fase tardía de la reacción anafiláctica, en situaciones como alergia alimenticia, asma y urticaria crónica. Otras quemocinas C-C como RANTES (*regulated on activation, normal T cell expressed and secreted*) y MIP-1 α (*macrophage inflammatory protein-1 α*) también producen liberación de histamina.

RECEPTORES DE QUEMOCINAS

Receptor	Ligando
Receptores CXC	
CXCR1	IL-8
CXCR2	IL-8, GRO- α , GRO- β , GRO- γ , NAP-2, ENA-78
CXCR3	IL-10, MIG
CXCR4	SDF-1 α
Receptores CC	
CCR1	MIP-1 α , RANTES, MCP-3
CCR2	MCP-1, MCP-3, MCP-5
CCR3	Eotaxina, RANTES, MCP-2, MCP-3, ?MCP-4
CCR4	MIP-1 α , RANTES, MCP-1, TARC
CCR5	MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES
CCR6	MIP-3 α /LARC
CCR7	MIP-3 β /ELC

Los quimioatrayentes de los eosinófilos

Las reacciones inflamatorias de origen alérgico como el asma bronquial y la rinitis se caracterizan por la acumulación de eosinófilos frente a la acumulación de neutrófilos observados en las inflamaciones agudas usuales. Este hecho explica que se haya intentado aclarar durante mucho tiempo los mecanismos que conducen al reclutamiento selectivo de algunos tipos celulares. Recientemente se ha descubierto la existencia de una quemocina de la familia C-C, de aproximadamente 80 aminoácidos, que es selectivamente activa sobre los eosinófilos. Asimismo se ha detectado la presencia en los eosinófilos de receptores específicos para esta quemocina, a los que se une también RANTES con baja afinidad, pero no MCP-1. Este receptor se denomina receptor de

quemocinas CCR3 y ha sido aislado y caracterizado en distintas especies animales, incluido el hombre. El gen de la eotaxina humana ha sido aislado y se conoce que es un gen de la respuesta inmediata (*early response gene*) expresado en células epiteliales estimuladas por citocinas, en células endoteliales y en eosinófilos de la sangre periférica estimulados con IL-3.

5. LAS CITOCINAS Y SU MECANISMO DE ACCIÓN

Las citocinas son moléculas proteicas o glicoproteicas, cuya estructura se encuentra estabilizada en muchos casos por puentes disulfuro o por uniones N- y/o O-glicosílicas, que juegan un papel primordial en la comunicación entre células de los organismos multicelulares. En su calidad de mediadores intercelulares que actúan a concentraciones picomolares, regulan la supervivencia, el crecimiento, la diferenciación y numerosas funciones efectoras de las células. Además regulan la respuesta inmune en la infección, y en la respuesta inflamatoria asociada a enfermedades articulares, renales, vasculares e intestinales; así como en enfermedades autoinmunes de los sistemas endocrino y nervioso. A diferencia de las hormonas, las citocinas no se almacenan como moléculas preformadas, sino que se sintetizan rápidamente y se segregan tras la estimulación. Sin embargo, se detectan con dificultad en el suero puesto que las células que las producen son cercanas a sus células blanco y, en consecuencia, no es preciso generar cantidades masivas de citocinas. La pleiotropía y la redundancia son características de las acciones biológicas de las citocinas, y frecuentemente se producen interacciones entre citocinas que pueden ser: aditivas, sinérgicas o antagonística. Sus acciones se ejercen a través de receptores y pueden ser autocrinas, paracrinas o endocrinas, en función de la relación existente entre la célula productora y la célula blanco. Las citocinas se han clasificado de acuerdo con sus acciones biológicas, los tipos de receptores usados y sus estructuras tridimensionales. Utilizaremos una clasificación en cuatro tipos principales, basada en sus acciones biológicas y sus mecanismos de acción:

Tipo I: Hemopoyetinas y factores de crecimiento hematopoyético, como IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, eritropoyetina, GM-CSF, IL-7, IL-9, IL-13 e IL-15.

Tipo II: Interferones α , β , γ e IL-10.

Tipo III: Citocinas proinflamatorias, que incluye la familia de receptores de IL-1, la familia de TNF (TNF-R, CD40, FAS, NGF-R...) e IL-6.

Tipo IV: Citocinas quimiotácticas o quemocinas.

Citocinas proinflamatorias

Interleucina-1

Existen dos formas biológicamente activas, una esencialmente asociada a membrana y otras secretada y circulante. Interviene en las fases iniciales de la inflamación y de la respuesta inmune, y es un ejemplo de molécula pleiotrópica. Sobre el hipotálamo estimula la síntesis de prostaglandinas y causa fiebre, inicia la respuesta inmune al activar linfocitos B y T, y produce cambios en el metabolismo hepático al estar implicada en la inducción de la respuesta de fase aguda. La isoforma β estimula la hemopoyesis en cooperación con otras citocinas,

El factor de necrosis tumoral (TNF)

Se describió en dos contextos independientes. Por un lado en pacientes cancerosos deplecionados de reservas grasas a causa de la presencia en su suero de un mediador soluble (de donde deriva el término *caquectina*, también aplicado al mediador), y en ratones estimulados con BCG, donde se generaba un mediador capaz de producir la lisis de las células tumorales (origen del término *factor de necrosis tumoral*)

Existen dos formas de la molécula: $TNF\alpha$ y $TNF\beta$, que poseen actividad antitumoral por citotoxicidad directa y actividad proinflamatoria. El TNF es activo a bajas concentraciones y actúa a través de receptores bien caracterizados. Ejerce sus acciones sobre linfocitos B y T, macrófagos, fibroblastos, sistema nervioso central y células endoteliales. Es capaz de inducir la expresión de otras citocinas (IL-1 e IL-6) y de las proteínas de fase aguda.

Receptores de la familia del TNF

Se han identificado dos tipos de receptores de membrana para el TNF, p55 (tipo I), o receptor de baja afinidad (1 nM) y el p75 (tipo II) de alta afinidad (100 pM). La ocupación de estos receptores permite la señalización intracelular a través de la hidrólisis del fosfolípido esfingomiélin y la producción de ceramida. Posteriormente se produce el reclutamiento a los complejos de señalización de proteínas citoplásmicas denominadas TRAF (*TNF-receptor associated factors*) que permiten la activación de MAP kinasas de los módulos SAPK y p38 y del factor de transcripción NF- κ B.

Interleucina-6

Es una molécula que aparece más tardíamente en la reacción inflamatoria. Favorece la producción de plaquetas al actuar sobre sus precursores medulares, la hematopoyesis precoz y la respuesta de fase aguda en los hepatocitos. La familia de la IL-6 se ha incrementado con la caracterización de numerosos componentes como LIF (leukemia inhibitory factor), oncostatina M (OSM), CNTF (*ciliary neurotrophic factor*) e IL-11.

Características de los receptores de citocinas del Tipo I

Son multiméricos y contienen una cadena privada específica de ligando y una cadena pública (compartida con otros receptores) implicada en la transducción de la señal y en la afinidad de la unión del ligando. El dominio extracelular posee alrededor de 200 aminoácidos, con cuatro cisteínas conservadas, motivos repetidos de fibronectina y un motivo WSXWS cercano a la membrana celular. Un dominio transmembrana único y una región de homología de 60 a 100 aminoácidos yuxtamembranar, crítico para la transducción de señales. La porción C-terminal no conservada, confiere especificidad a la señalización. El parentesco estructural sugiere un ancestro común y la utilización de mecanismos similares de transducción de la señal.

Se pueden clasificar estos receptores en subfamilias:

- i) Subfamilia IL2-R : IL2-R, IL4-R, IL7-R, IL9-R, comparten la cadena γ .
- ii) Subfamilia IL3-R : IL3-R, IL5-R, GM-CSF-R, comparten la cadena β
- iii) Subfamilia IL6-R : IL6-R, LIF, OSM, CNTF e IL1 comparten la subunidad del receptor gp130 y su señalización se realiza a través del sistema JAK/STAT.

La función de los receptores IL2-R es regular la duración de la respuesta inmunitaria tras la activación por el antígeno. Carecen de actividad tirosina kinasa intrínseca, sin

embargo estimulan fosforilaciones por reclutar tirosina kinasas solubles de la familia *src* a través de interacciones con dominios SH2 (*sarcoma homology*), kinasas de lípidos (IP 3-kinasas) y serina/treonina kinasas de la familia MAP kinasa.

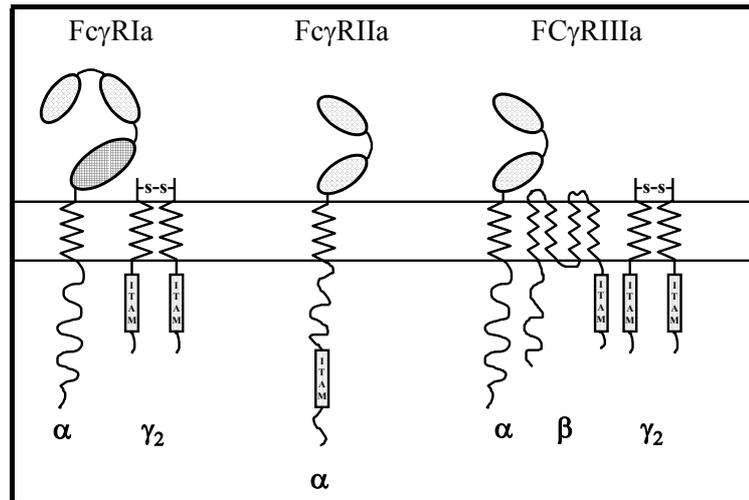
Características de los receptores de interferones

Existen dos subtipos : I (α y β) y II (γ) . Los interferones de tipo I son producidos de forma ubicua y juegan un papel importante en la defensa frente a infecciones virales. Los interferones de tipo II se producen por células T activadas y por células NK. Desde el punto de vista de la señalización citosólica se reclutan proteínas con dominios SH2 y SH3 pertenecientes a la familia JAK de tirosina kinasas (Janus kinases). Desde el punto de vista de señalización nuclear se produce la activación de la expresión de numerosos genes caracterizados por ser regulados por una familia de factores de transcripción denominados STAT (*signal transducers and activators of transcription*), que interaccionan con una secuencia consensus denominada ISRE (*IFN stimulated response element*), perteneciente al tipo de las cremalleras de leucina, con motivos HLH (*helix-loop-helix*).

6. RECEPTORES PARA LA PORCIÓN FC DE LAS MOLÉCULAS DE INMUNOGLOBULINA

Los receptores para la porción Fc de la molécula de anticuerpo proporcionan especificidad para el reconocimiento de antígenos a células que carecen de otro tipo de estructuras capaces de reconocimiento antigénico y ello explica su importancia en las fases efectoras de la respuesta inmune. Existen receptores para cada clase de inmunoglobulina, de tal manera que se distinguen receptores Fc γ R, los que unen moléculas de IgG, Fc α R, los que unen IgA, e Fc ϵ R, los que unen IgE.

En lo que se refiere a los receptores Fc γ R, se distinguen tres familias: Fc γ RI, Fc γ RII y Fc γ RIII, sobre la base de su afinidad y selectividad para el reconocimiento de los ligandos. Los receptores Fc γ RI son de alta afinidad y se a los anticuerpos antes de que éstos hayan interaccionado con el antígeno. En contraste, los receptores de baja afinidad Fc γ RII y Fc γ RIII sólo interaccionan con los anticuerpos cuando éstos han reaccionado con los antígenos. La capacidad de estos receptores para iniciar la señalización intracelular depende de la presencia en sus colas citoplásmicas de de una secuencia conservada de aminoácidos denominada ITAM (*immunoreceptor tyrosine-based activation motif*). Este motivo consiste en seis residuos de aminoácidos espaciados de forma precisa en una secuencia de veintiséis aminoácidos. Los Fc γ R que no poseen este motivo carecen de actividad de señalización, y en algunos casos poseen un motivo inhibitorio de la activación denominado ITIM (*immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif*). La señalización a través del ITAM implica el reclutamiento y la activación de tirosina kinasas de la familia *src*, como Lyn, que conducen a la fosforilación en tirosina del dominio ITAM y al anclaje posterior de tirosinas kinasas de otras familias como Syk y ZAP-70. La activación de estas quinasas conduce a la activación de fosfolipasas C- γ y a la hidrólisis de fosfatidilinositol con la formación de IP₃ y diacilglicerol. La activación de fosfolipasas A₂ y D, IP 3-kinasa, de la cascada de MAP kinasas, de la explosión oxidativa y de activación del factor de transcripción NF- κ B son otros mecanismos bioquímicos relevantes en la señalización inducida por la activación de estos receptores.



Representación de los receptores de IgG (Fc γ R) con motivos ITAM y de sus subunidades constitutivas

7. LAS MOLÉCULAS DE ADHESIÓN VASCULAR

Las moléculas de adhesión sirven para aumentar la afinidad del contacto entre estructuras complementarias expresadas en las superficies celulares durante la reacción inflamatoria, y transmitir señales al interior de las células que permiten la activación de funciones específicas. Se distinguen al menos cuatro superfamilias de moléculas de adhesión: selectinas, integrinas, miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas y cadherinas.

Selectinas

La familia de selectinas se compone de tres miembros denominados según las células en las que fueron inicialmente descubiertas. La L-selectina (CD62L) se expresa de forma constitutiva en leucocitos y su contra-receptor se expresa en células endoteliales activadas. La E-selectina (CD62E) se produce exclusivamente por las células endoteliales tras su activación por citocinas y su contra-receptor está en los neutrófilos, monocitos, eosinófilos, linfocitos y algunas células tumorales. La P-selectina (CD62P) se encuentra preformada y almacenada para su rápida movilización en los gránulos de las plaquetas, y en los cuerpos de Weibel-Palade de las células endoteliales, pero en este caso sólo se expresa tras la activación por citocinas. Sus células blanco son las mismas que las de la E-selectina. Cada molécula de E-selectina contiene un dominio análogo al dominio N-terminal de lectina seguida de un dominio análogo al motivo de *epidermal growth factor*, una serie de repeticiones consensus similar a proteína reguladoras del complemento, un dominio transmembrane y una cola citoplásmica. El dominio de lectina participa directamente en la mediación del contacto célula-célula a través de interacciones con carbohidratos de la superficie celular, particularmente el antígeno sialil-Lewis X. Estas interacciones de carácter débil permiten el desplazamiento del leucocito a lo largo del endotelio (*rolling*), y son previas a las interacciones de más alta afinidad que implican moléculas del tipo integrinas.

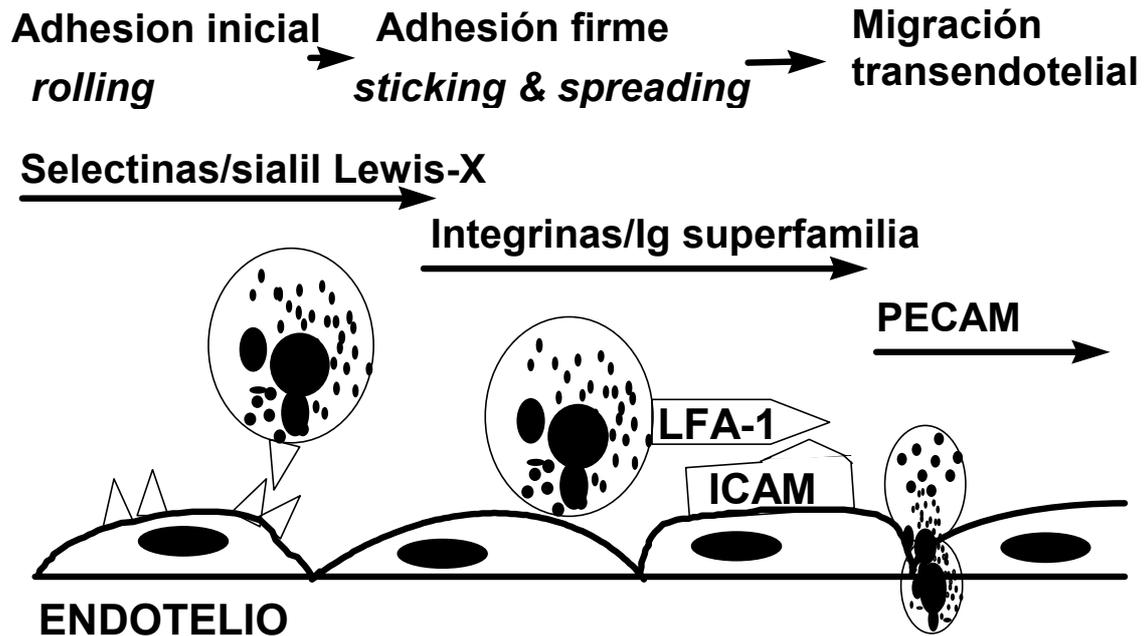
Integrinas y superfamilia de inmunoglobulinas

Las integrinas son una amplia familia de glicoproteínas heterodiméricas que pueden subdividirse de acuerdo con las subunidades que poseen. Las integrinas se expresan particularmente en los leucocitos e incluyen: LFA-1 (CD11a/CD18), CR3 (CD11b/CD18) y CR4 (CD11c/CD18). Cada una de ellas contiene la misma subunidad de 95kDa, denominada CD18 y cadenas diferentes CD11a (180 kDa), CD11b (165kDa) y CD11c (150kDa). La molécula CD11a/CD18 es el denominado LFA-1 (lymphocyte function-associated antigen-1), que se expresa en linfocitos, células mieloides y una variedad de otros tipos celulares. CD11b/CD18 es el receptor del complemento tipo 3 (CR3) y CD11c/CD18 es el receptor del complemento CR4. CR3 y CR4 se expresan en células mieloides. Hay al menos dos ligandos para LFA-1: ICAM-1 (CD54) e ICAM-2 (CD102), ambos miembros de la superfamilia de inmunoglobulinas. CR3 une fragmentos de factores del complemento, especialmente iC3b, que posee un importante papel en la fagocitosis de partículas opsonizadas por los fagocitos profesionales. ICAM-1 e ICAM-2 se expresan en las células endoteliales. Las moléculas de adhesión de la familia de las integrinas participan en las interacciones entre leucocitos y células endoteliales en las vénulas post-capilares y son responsables de contactos fuertes (*sticking*) que permiten la salida de las células leucocitarias de los vasos (diapédesis). Otra integrina, la molécula VLA-4, es el ligando de VCAM-1, que pertenece a la superfamilia de inmunoglobulinas.

La transmigration de neutrófilos a través de la barrera endotelial requiere finalmente la interacción entre los aminoglicanos glicosilados de la membrana plasmática del polimorfonuclear y la proteína de adhesión PECAM-1 (*platelet endothelial cell adhesion molecule*), localizada en las uniones intercelulares de las células endoteliales y perteneciente a la superfamilia de inmunoglobulinas. Una vez que el neutrófilo ha alcanzado el exterior del vaso, interacciones entre proteínas de la matriz extracelular y las moléculas de adhesión, posiblemente por activación de tirosina kinasas, facilita la liberación de enzimas proteolíticos, radicales de oxígeno y, en general, mediadores inflamatorios.

La importancia de las moléculas de adhesión se demuestra por la existencia de síndromes bien definidos de deficiencia congénita de adhesión leucocitaria conocidos como síndromes LAD-1 y LAD-2 (*leukocyte adhesion deficiency*), en los que los leucocitos de los pacientes con síndrome LAD-1 carecen de expresión de integrinas. Existen una forma grave y otra moderada en lo que se refiere a sus manifestaciones clínicas. En la forma severa no existen las dos cadenas de la molécula LFA-1, afecta a ambos sexos y se manifiesta por infecciones graves asociadas a una alta mortalidad, de tal manera que los pacientes raramente alcanzan los dos años de edad. En la deficiencia moderada existe expresión parcial de integrinas, de tal manera que los pacientes expresan de 2.5 a 6.0% de los niveles normales de LFA-1, CR3 y CR4, y normalmente sólo presentan infecciones cutáneas. Los leucocitos de pacientes con el síndrome LAD-2 no expresan sialil Lewis-X (CD15), y en consecuencia, son incapaces de unirse a las selectinas. Los pacientes con síndrome LAD-2 padecen infecciones bacterianas recurrentes, pero alcanzan la infancia, aunque con corta estatura y retardo mental debido a una alteración del metabolismo de la fucosa, que está implicada en el metabolismo de sialil Lewis-X.

LUZ VASCULAR

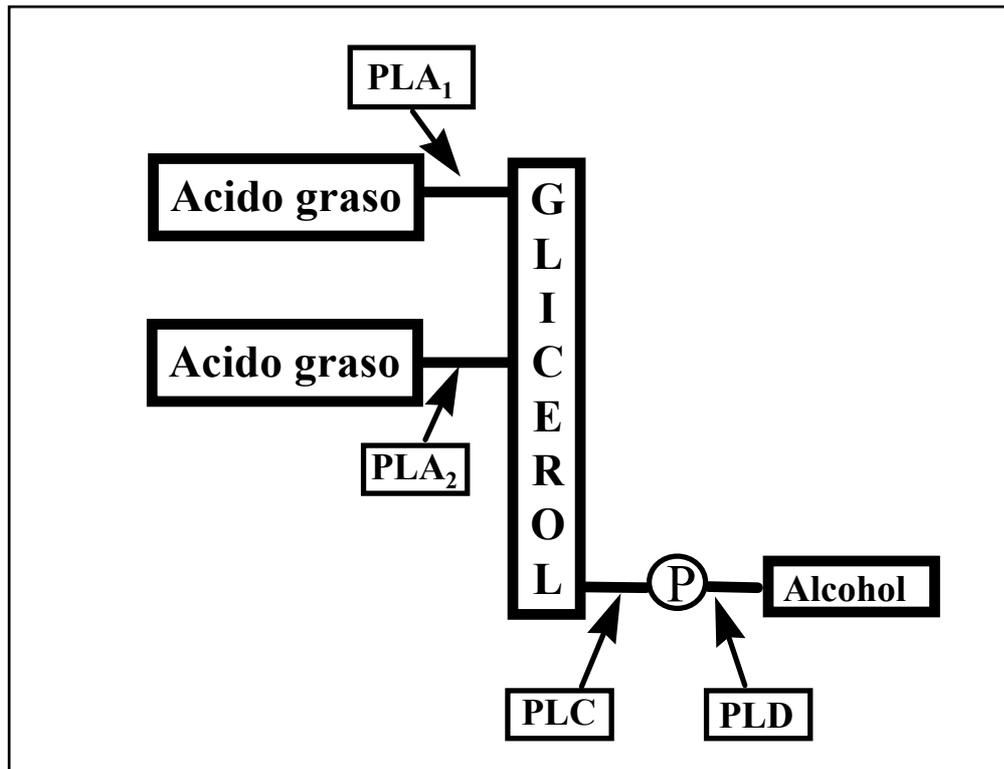


Esquema de la migración leucocitaria del interior de los vasos al intersticio mediante las interacciones en las que intervienen las moléculas de adhesión.

8. MEDIADORES Y MENSAJEROS DE NATURALEZA LIPÍDICA

Fosfolipasas

Las fosfolipasas están ampliamente distribuidas en las células animales y participan en la transducción de señales por ser capaces de generar moléculas de señalización a partir de los fosfolípidos presentes en las membranas biológicas. Aunque los fosfolípidos juegan un papel fundamental en la estructura de las membranas, su distribución en la superficie limitante entre el medio extra e intracelular, y su capacidad de ser precursores de potentes mediadores farmacológicos y mensajeros intracelulares explica el interés general de estas moléculas en la reacción inflamatoria. De acuerdo con el sitio en el que producen su acción catalítica, se distinguen varios tipos de fosfolipasas.



Las fosfolipasas se denominan de acuerdo con el sitio de la molécula de fosfolípido sobre el que actúan.

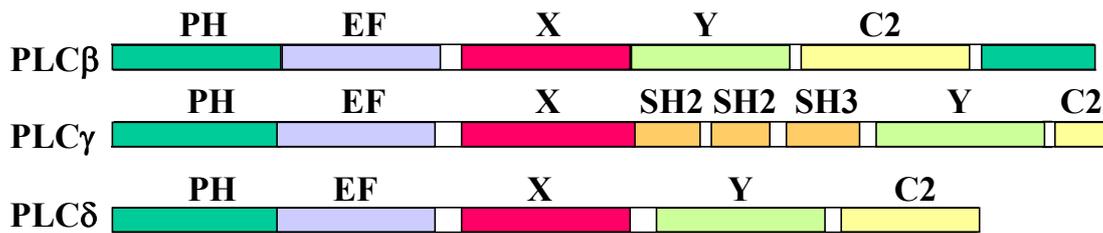
Fosfolipasas C

Las fosfolipasas C (PLC) más importantes acopladas a receptores e implicadas en la señalización intracelular son enzimas que hidrolizan fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (IP₂). La hidrólisis de este fosfolípido minoritario de las membranas celulares es uno de los acontecimientos más tempranos en la regulación de las funciones celulares por más de cien moléculas implicadas en la señalización celular. La hidrólisis por la PLC produce dos mensajeros intracelulares: diacilglicerol e inositol 1,4,5-trisfosfato (IP₃), que median la activación de la PKC y la movilización de iones calcio intracelulares.

Se han caracterizado diez isozimas de la PLC consistentes en simples polipéptidos, que pueden ser divididos en tres tipos: β , γ y δ . Esta clasificación es importante porque las isoformas del tipo β son activadas por proteínas G heterotrómicas, de tal manera que esta isozima es la que se activa al ocuparse los receptores de siete dominios transmembrana, por ejemplo durante la quimiotaxis.

Por otra parte, las fosfolipasas C- γ se activan al ocuparse los receptores que activan tirosina kinasas, como los receptores de factores de crecimiento y los receptores Fc γ R. La activación de un tipo u otro de PLC conduce a la producción de los mismos mensajeros intracelulares, aunque la cinética de activación difiera sustancialmente. Las isoformas β se activan de forma inmediata, mientras que las isoformas γ lo hacen más lentamente.

Dominios estructurales de fosfolipasas C específicas de inositol



PH, homología de pleckstrina

C2, dominio de unión a Ca^{2+}

X, Y, dominios catalíticos

SH, dominios de homología *src*

EF hand motif, quelante de Ca^{2+} en otras proteínas

Fosfoinosítido 3-kinasa

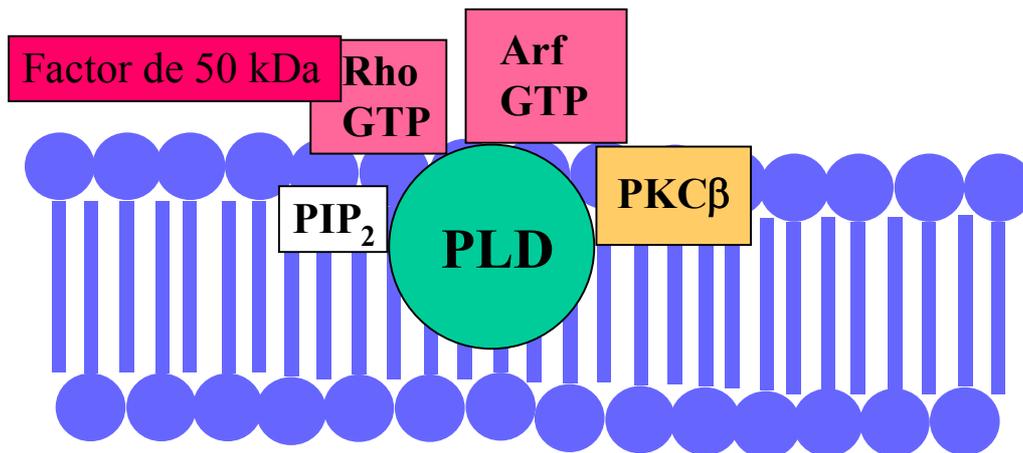
Las fosfoinosítido 3-quinasas (PI 3-kinasa) juegan un papel importante en la señalización celular en general, con algunas características especiales en lo que se refiere a la respuesta inflamatoria. Su función catalítica consiste en la producción de fosfatilinositol 3,4,5-trisfosfato a partir del fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato. Las distintas isoformas de PI 3-quinasas se clasifican de acuerdo con criterios estructurales, que explican, como en el caso de los tipos de PLC previamente descritos, su reclutamiento selectivo por los distintos tipos de receptores. Las PI 3-quinasas de la clase Ib se activan por la ocupación de receptores acoplados a proteínas G, y en general su mecanismo de activación implica a las subunidades $\beta\gamma$ de las proteínas G heterotriméricas. Las clases 2 y 3 de PI 3-quinasas se activan por receptores con actividad tirosina kinasa. La PI 3-kinasa juega un papel importante en la regulación de la explosión oxidativa en fagocitos en asociación con proteínas G de bajo peso molecular como Rac y en el control de respuestas nucleares como diferenciación y apoptosis en cooperación con el módulo SAPK de las MAP kinasas.

Fosfolipasas D

La fosfolipasa D hidroliza fosfatidilcolina para generar colina y ácido fosfatídico cuando se produce la activación de receptores de membrana del tipo de los acoplados a proteínas G o de receptores que activan tirosina kinasas. La rápida producción de ácido fosfatídico (AP) que se produce en estas circunstancias explica que se haya atribuido a este fosfolípido el papel de mensajero intracelular. En consecuencia, la determinación del papel de la fosfolipasa D en el funcionalismo celular se ha centrado en la determinación de los posibles efectores. Estudios realizados *in vitro*, han permitido proponer como blancos a la enzima PI P5 kinase, isoformas de la proteína kinasa C, n-quiimerina, una Rac-GAP y raf-1 kinasa. Se han clonado dos isoformas de fosfolipasa D en mamíferos: PLD1 y PLD2. La PLD1 se regula por la proteína G de bajo peso molecular ARF, junto a señales complementarias de Rho y las proteínas kinasas C (α y β). ARF es una proteína citosólica identificada previamente en los procesos de formación de vesículas, por lo que el tema central de investigación sobre la PLD1 es si juega algún papel en la formación de vesículas, o si posee funciones independientes en la biología celular. En cualquier caso, esta función es relevante en aquellas células del

sistema inmuno-inflamatorio que degranulan en respuesta a agonistas como son los polimorfonucleares y los mastocitos. El ácido fosfatídico es un conocido regulador de la PI P5-kinasa de tipo I, que cataliza la fosforilación de PI(4)P a fosfatidilinositol 4,5 bifosfato PI(4,5)P₂, y por otra parte, el PI(4,5)P₂ juega un papel central en la exocitosis. El ácido fosfatídico juega un papel importante en la regulación de la explosión oxidativa en fagocitos y en el anclaje a la membrana plasmática de la serina kinasa raf-1.

Elementos implicados en la activación de la fosfolipasa D



Clasificación de las fosfolipasas A₂

La actividad fosfolipasa A₂ (PLA₂) se realiza por una superfamilia de enzimas divergentes que hidrolizan la unión éster de los fosfolípidos en posición *sn*-2. Las PLA₂ se clasifican en cuatro grupos: las PLA₂ de bajo peso molecular, la PLA₂ citosólica (cPLA₂), las PLA₂ independientes de Ca²⁺ (iPLA₂) y las PAF-acetilhidrolasas (PAF-AH) o PAF-PLA₂. Las PLA₂ de tipo I, II y III (Tabla) son las que forman el grupo de las PLA₂ de bajo peso molecular. Aunque entre ellas hay diferencias apreciables en la secuencia, las diferencias estructurales no son tan grandes. Debido a que su estructura se halla estabilizada con puentes disulfuro, todas ellas son muy resistentes a las temperaturas altas y al pH ácido y también son muy sensibles a los agentes reductores. Todas ellas son enzimas secretadas y necesitan Ca²⁺ en concentración mM para la catálisis. Presentan poca o ninguna especificidad por la cabeza polar o por la longitud del ácido graso en posición *sn*-2.

Tabla 1. Clasificación de las fosfolipasa A₂

Fosfolipasa A ₂	Localización	Peso Molecular (kDa)	Ca ²⁺	Especificidad de sustrato
Secretadas :				
tipo I	veneno de cobra páncreas	13-15	mM	----
tipo II	veneno de <i>viperidae</i> plaquetas fluido sinovial	13-15	mM	----
tipo III	veneno de abeja	16-18	mM	----
PAF-AH tipo II	plasma	40-45	----	cadena corta en posición <i>sn-2</i>
Citosólicas :				
cPLA₂	ubiquia	85	μM	AA en posición <i>sn-2</i>
iPLA₂	miocardio	40	----	pasmalógeno con AA en posición <i>sn-2</i>
	macrófagos (P388D1)	80	----	----
	cerebro	58	----	----
	epitelio intestinal	97-140	----	----
PAF-AH tipo I	cerebro	29, 30 (tipo Ia) 29, 30, 45 (tipo Ib)	----	grupo acetilo en posición <i>sn-2</i>

La fosfolipasa A₂ citosólica

La PLA₂ citosólica (también llamada de tipo IV) posee un interés especial en la transducción de señales y en la producción de mediadores lipídicos. No contiene puentes disulfuro, por lo que no es sensible a agentes reductores y, sin embargo, pierde su actividad por tratamiento ácido o por calor. Tiene un peso molecular de 85 kDa y necesita Ca²⁺ en concentración μM para translocarse a la membrana, lo que permite su contacto con el sustrato, pero no para la catálisis. Es especialmente relevante el hecho de que posea especificidad por los fosfolípidos con araquidonato esterificado en posición *sn-2* y de que sea sensible a la regulación por agonistas como factores de crecimiento, citocinas, mediadores inflamatorios y neurotransmisores.

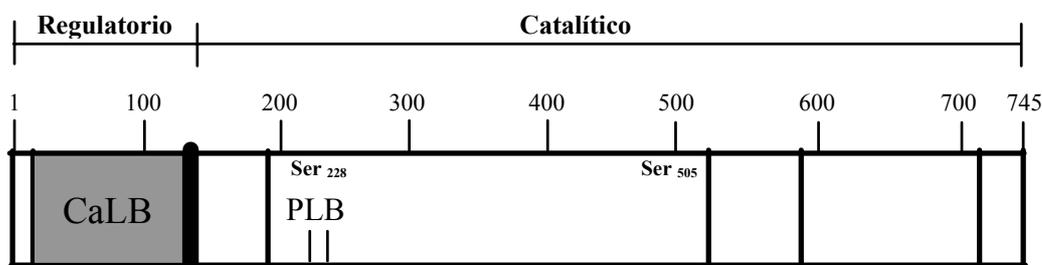
Estructura de la cPLA₂

La cPLA₂ ha sido clonada a partir de la línea de monocitos U937 y de la línea de macrófagos RAW 264.7, lo que indica una distribución celular en células directamente implicadas en la reacción inflamatoria. La cPLA₂ se codifica por un ARN mensajero de

3,4 kbases. La secuencia deducida a partir del ADN complementario es la de una proteína de 749 aminoácidos con una masa molecular de 85,2 kDa que, sin embargo, migra como una proteína de 100-110 kDa si la sometemos a electroforesis en gel de poliacrilamida. Esta migración retrasada es una propiedad inherente a su secuencia de aminoácidos.

Podemos distinguir fundamentalmente dos dominios en la secuencia de la cPLA₂, uno catalítico y otro regulador (Figura). El regulador, formado por unos 130 aminoácidos en el extremo amino terminal, es el responsable de la translocación de la enzima a la membrana. El resto de la secuencia constituye el dominio catalítico. La cPLA₂ posee doce sitios posibles de fosforilación en residuos de serina o treonina y otros cuatro sitios en residuos de tirosina. Además, su secuencia contiene una región rica en prolina y una región de bisagra. La cPLA₂ no posee ninguna homología de secuencia con las PLA₂ de bajo peso molecular, sin embargo, sí que posee algunas regiones muy conservadas en otras proteínas, entre las que destacan:

- Una región homóloga al dominio catalítico de la fosfolipasa B (PLB) de *Penicillium notatum* en la que aparece la secuencia GLS₂₂₈G, encontrada en el centro activo de numerosas lipasas.
- Una secuencia PLS₅₀₅P, reconocida como sustrato de fosforilación por las MAP kinasas.
- Una región de unos 130 aminoácidos en el extremo amino terminal (dominio regulador del enzima), presente en las proteínas que se unen a los lípidos de la membrana para realizar sus funciones biológicas (Figura). Esta asociación a la membrana está mediada por el ion calcio, por lo que esta región es llamada dominio de unión a lípidos dependiente de Ca²⁺ (dominio CaLB).



Dominios funcionales de la cPLA₂

PLA₂ independientes de iones calcio

Se han encontrado actividades PLA₂ independientes de Ca²⁺ en numerosos tejidos. Entre todas las iPLA₂, la mejor descrita es una enzima de 40 kDa encontrada en miocardio de perro. Esta fosfolipasa hidroliza preferentemente plasmalógenos (1-alquenil-glicerofosfolípidos) con ácido araquidónico en posición *sn*-2. Entre otras iPLA₂ que han sido descritas podemos citar las aisladas en la línea de macrófagos P388D1, en el cerebro y en el epitelio intestinal .

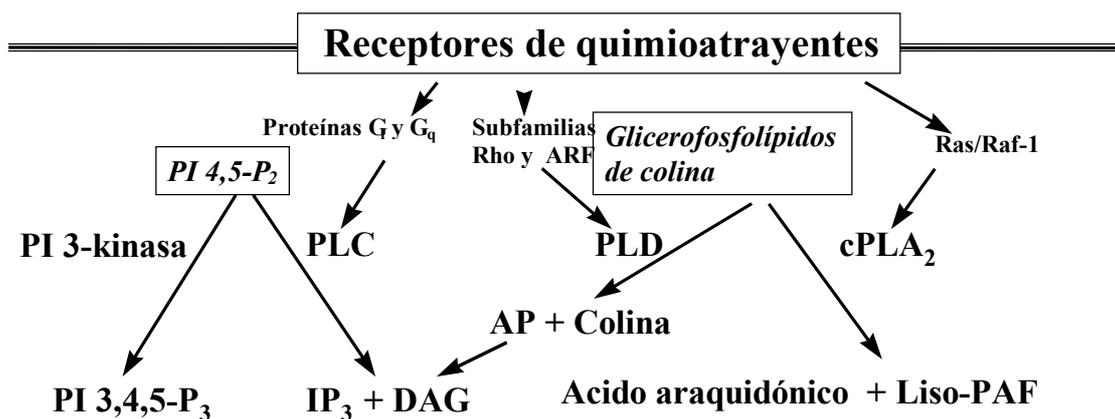
Las PAF-AH son las enzimas encargadas de hidrolizar cadenas carbonadas de poca longitud (de 2 a 4 carbonos) situadas en la posición *sn*-2 de los PL. Existen dos isoformas conocidas, llamadas I y II. La isoforma I está formada por 2 ó 3 subunidades

(Tabla 1) diferentes entre sí, es citosólica y bastante selectiva para el PAF. La isoforma II está formada por una sola subunidad de 45 kDa, es una enzima secretada y es capaz de hidrolizar tanto el grupo acetilo del PAF como otras cadenas de 3 y 4 carbonos situadas en posición *sn*-2. Ninguna de las dos isoformas necesita Ca^{2+} para la catálisis. Otra clasificación también muy extendida es la que divide las PLA₂ en secretadas y citosólicas. Esta clasificación queda reflejada en la Tabla 1.

Ciclooxigenasas

Las ciclooxigenasas (COX; EC 1.14.99.1) catalizan la oxidación del ácido araquidónico para la formación de prostaglandinas H₂. Esta actividad enzimática se codifica por dos genes relacionados, que codifican dos isoformas distintas: COX-1 y COX-2. El gen de COX-1 se expresa de forma constitutiva y ubicua, mientras que COX-2 se expresa a altos niveles sólo tras la estimulación por factores de crecimiento, citocinas y estímulos extracelulares asociados con la activación celular. Numerosos tipos celulares que intervienen en la reacción inflamatoria, como los monocitos y las células endoteliales expresan el producto de COX-2 tras la activación. Este hecho tiene importancia capital, pues permite establecer que la producción de prostaglandinas en los focos inflamatorios se debe casi exclusivamente a la actividad COX-2. Como consecuencia de este hecho, cabe suponer que los inhibidores selectivos de la actividad COX-2 sean mejores agentes antiinflamatorios que los inhibidores de COX-1, y que además carezcan de los efectos secundarios derivados de la inhibición de la función homeostática de las prostaglandinas sobre la secreción gástrica y la función renal.

En lo que se refiere a la estructura de estos genes, el gen de COX-1 no posee una TATA *box*, sino múltiples sitios donde se puede iniciar la transcripción, lo que implica un mecanismo complejo de regulación. El gen de COX-1 posee en el humano 11 exones en una extensión de 22 kb, mientras que el gen de COX-2 posee 10 exones distribuidos en un área de 8.3 kb. El gen de COX-2 tiene sitios reguladores sensibles a citocinas como IL-6, y sitios κB , que explican su inducción por TNF- α . La homología entre ambas enzimas es del 60% y poseen valores similares de *K_m* para el ácido araquidónico, aunque COX-2 parece aceptar un mayor número de sustratos entre los ácidos grasos poliinsaturados.



Producción de mensajeros y mediadores lipídicos en respuesta a los quimioatrayentes

Lipoxigenasas y producción de leucotrienos

Las lipooxigenasas son enzimas implicadas en la formación de una serie de metabolitos del ácido araquidónico conocidos colectivamente con el nombre de leucotrienos (LT), que desempeñan importantes funciones en la respuesta inflamatoria y cuya producción se ha relacionado con enfermedades como la enfermedad inflamatoria intestinal y el asma bronquial. Desde el punto de vista bioquímico se distinguen varias actividades lipoxigenasa según la posición del átomo de carbono sobre el que actúan: 5-, 12- y 15-lipoxigenasas, pero desde el punto de vista funcional es la 5-lipoxigenasa (5-LOX) aquella en la que más se ha avanzado en su conocimiento. Al igual que la cPLA₂, la 5-LOX es una enzima citosólica que se transloca a la membrana durante la activación celular para dar lugar a la formación de LT. La 5-LOX convierte el ácido araquidónico en ácido 5-hidroperoxieicosatetranoico (5-HPETE) y LTA₄. Posteriormente el 5-HPETE puede dar lugar a la formación de tres cisteinil-leucotrienos (LTC₄, LTD₄ y LTE₄) por acción de la enzima LTC₄-sintasa, que cataliza la conjugación del glutatión al LTA₄ en la posición C-6. Por otra parte, la LTA₄ hidrolasa da lugar al quimioatrayente LTB₄. Los cisteinil-leucotrienos se producen principalmente por mastocitos estimulados por mecanismo dependiente de IgE y producen constricción bronquial, hiperrespuesta bronquial, secreción de moco y edema bronquial. La constricción bronquial producida por los cisteinil-leucotrienos es prolongada, a diferencia de la contracción producida por la histamina, que es transitoria. Este hecho explica que se les conociese previamente a su caracterización química con el nombre de *slow-reacting substance of anaphylaxis* (SRS-A).

Mecanismo de acción de los leucotrienos

Los leucotrienos ejercen sus efectos a través de receptores localizados en la membrana plasmática de sus células blanco. Los cisteinil-leucotrienos actúan sobre un único receptor en las células musculares de la vía aérea denominado receptor cis-LT₁, cuya ocupación pone en marcha la activación de proteínas G, y las consiguientes: hidrólisis de fosfatilinositol, formación de diacilglicerol, activación de proteína kinasa C y estimulación de la movilización de iones calcio de los depósitos intracelulares. Además,

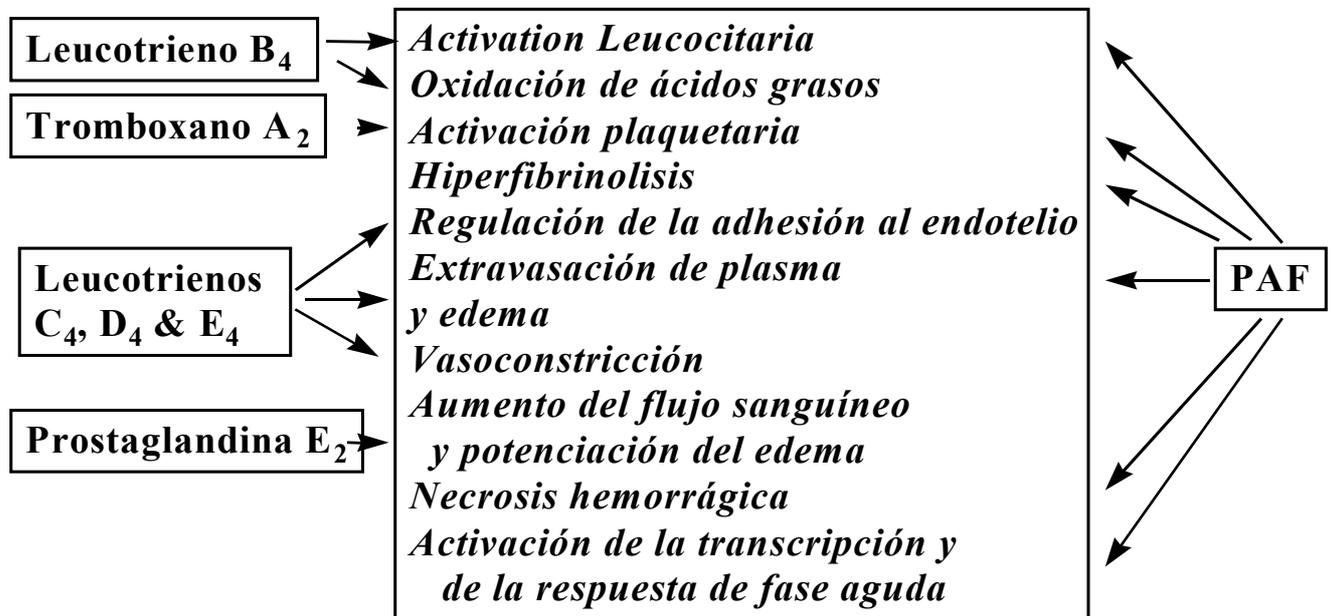
la acumulación de LT en la vecindad de la membrana nuclear, la prolongada activación de proteína kinasa C y la elevación de la concentración intracelular de iones calcio conduce a la activación de respuestas nucleares, como es la transcripción de la topoisomerasa I.

El factor activador de las plaquetas (PAF)

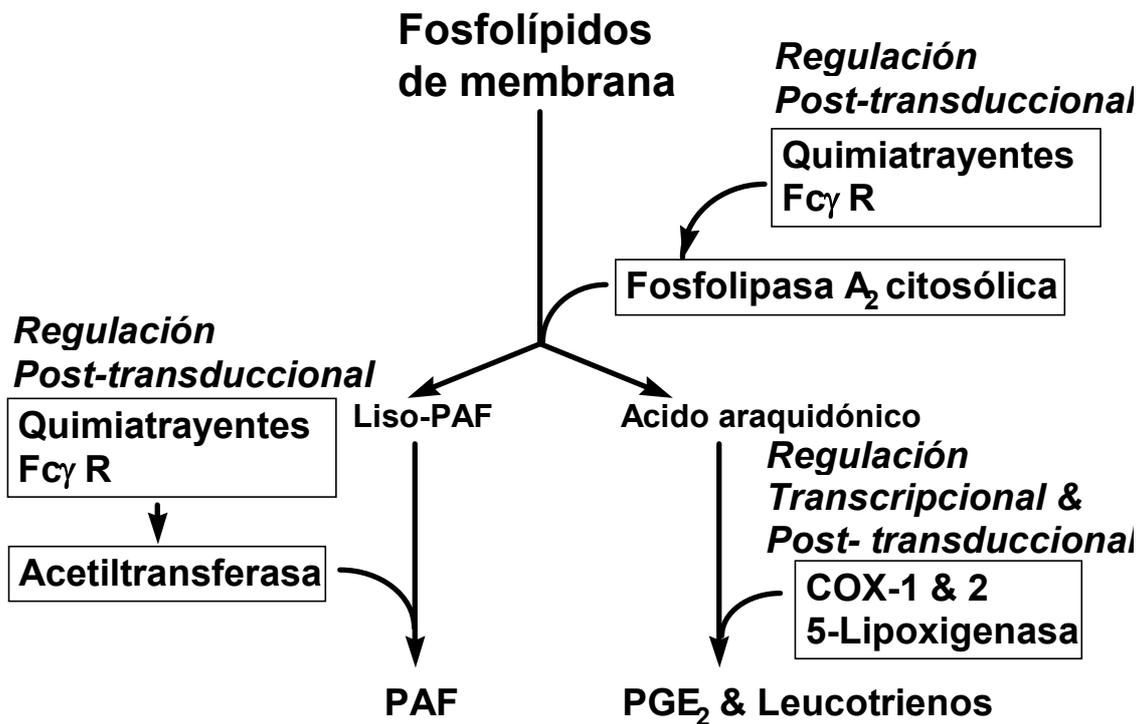
El PAF es un mediador inflamatorio de naturaleza lipídica descrito, inicialmente, como un intermediario soluble liberado por los basófilos de conejo estimulados por mecanismos dependiente de IgE, que producía la agregación y la reacción de liberación de las plaquetas, de ahí el nombre inglés de *platelet-activating factor*, a partir del cual se construyó el acrónimo PAF. Posteriormente, se observó que el PAF podía ser liberado por otros tipos celulares como neutrófilos, monocitos, macrófagos, plaquetas, eosinófilos y células endoteliales. El PAF actúa sobre un gran número de células y tejidos: leucocitos, osteoclastos, pulmón, tracto digestivo, hígado, riñón, corazón, bazo y cerebro, por lo que es una molécula multifuncional con gran pleiotropía como muchas citocinas. Sin embargo, estas respuestas varían según las especies animales estudiadas. Por ejemplo, las plaquetas de rata son insensibles al PAF, a diferencia de las plaquetas humanas y de conejo, que responden a bajas concentraciones de PAF. La estructura química del PAF corresponde al fosfolípido 1-O-alkil-2-acetil-*sn*-glicero-3-fosfocolina. La formación y degradación del PAF es un proceso cíclico que se lleva a cabo por dos rutas enzimáticas que actúan en sentido opuesto. En la biosíntesis del PAF intervienen una fosfolipasa A₂, lo que relaciona su producción con la de los eicosanoides, y una liso-PAF:acetil-CoA acetiltransferasa, dos enzimas que requieren calcio para su activación. El proceso de degradación es catalizado por la enzima acetilhidrolasa, que transforma el PAF en su precursor inactivo liso-PAF. Las principales acciones biológicas del PAF son:

- i) Agregación de plaquetas humanas, de conejo, de cobaya, de perro y de gato.
- ii) Hipotensión arterial sistémica.
- iii) Aumento de la permeabilidad microvascular que conduce a la hemoconcentración por extravasación de proteínas plasmáticas y edema.
- iv) Ulceración gástrica y necrosis intestinal.
- v) Broncoconstricción, inflamación pulmonar e hiperreactividad bronquial.
- vi) Estimulación de la quimiotaxis y activador de polimorfonucleares neutrófilos y eosinófilos.
- vii) Muerte celular neuronal asociada al virus de la inmunodeficiencia adquirida y potenciación de la transmisión sináptica excitatoria.
- viii) Recientemente se ha determinado que la infección de las células animales por *Streptococcus pneumoniae* se realiza a través del receptor del PAF.

Acciones biológicas de los mediadores lipídicos en el daño tisular inflamatorio



El PAF realiza estas funciones a través de receptores específicos en la membrana plasmática. El receptor del PAF ha sido recientemente clonado en el cobaya, en el hombre y en el conejo. De este receptor se expresan dos transcritos diferentes por splicing alternativo de los dos exones situados en 5' de la secuencia. El transcrito del denominado receptor de tipo leucocitario es ubicuo y es el más abundante en los leucocitos periféricos, mientras que el otro se expresa en corazón pulmón, bazo y riñón. Como los demás quimiotrayentes, su receptor pertenece a la familia de siete dominios transmembrana acoplados a proteínas G.



Regulación de la producción de mediadores lipídicos a partir de los fosfolípidos de membrana por estimulación de los receptores de quimiotrayentes y por receptores Fc γ R.

La vía de señalización de los esfingolípidos y ceramida

La esfingomielina es un fosfolípido de colina que carece de glicerol en su estructura y se localiza en la vertiente externa de las membranas celulares. La importancia de este fosfolípido en la transducción de señales procede de la demostración de la activación de la hidrólisis de esfingomielina para producir ceramida por la ocupación de los receptores del TNF. Las enzimas responsables de esta hidrólisis son esfingomielinasas neutras y ácidas reclutadas por moléculas adaptadoras [*TNF-receptor adapter factor(s)*, TRAF(s)] acopladas a las colas intracitoplásmicas de los receptores de TNF. La ceramida actúa como mensajero intracelular capaz de activar distintas vías de señalización, preferentemente relacionadas con la cascada de MAP kinasas, el factor de transcripción NF- κ B y la producción de apoptosis.

9. LA EXPLOSIÓN OXIDATIVA EN FAGOCITOS Y EL SISTEMA DE LA NADPH OXIDASA

Los neutrófilos y otras células fagocíticas producen el anión superóxido como parte de sus mecanismos bactericidas. El anión superóxido puede reaccionar para formar peróxido de hidrógeno, HOCl y radicales hidroxilo. En conjunto, estas especies derivadas del oxígeno participan en la muerte de las bacterias fagocitadas y pueden

llegar a producir daño en los tejidos cuando se generan en cantidades excesivas. La enzima que cataliza la producción de superóxido es la NADPH oxidasa, denominada también oxidasa de la explosión oxidativa. La importancia fisiológica de esta enzima viene dada por la existencia de una enfermedad hereditaria denominada enfermedad inflamatoria crónica, causada por la falta de un componente de la NADPH oxidasa. Los pacientes afectados de esta enfermedad padecen infecciones graves y recurrentes debidas a la incapacidad de sus neutrófilos para matar microbios. Enzimas similares en células no fagocitarias producen superóxido y peróxido de hidrógeno, que juegan un papel importante en fenómenos como la activación de moléculas que regulan la transcripción génica, la apoptosis y la división celular.

La activación de la NADPH-oxidasa requiere la participación de varios factores citosólicos denominados: p47phox, p67phox, p40phox y Rac (1 ó 2). En las células en reposo, p47phox, p67phox, y p40phox forman un gran complejo molecular que se encuentra en la fracción citosólica. La activación de la NADPH oxidasa se inicia por el ensamblaje de p47phox, p67phox y Rac con el citocromo b558 con estequiometría 1:1:1:1 en la membrana plasmática. p47phox, p67phox y Rac muestran unión cooperativa, puesto que al incrementar la concentración de cualquiera de esos componentes se reduce la EC_{50} de los otros componentes. En el momento actual es motivo de investigación intensa el análisis de los mecanismos por los que se producen las interacciones proteína/proteína en el complejo de la NADPH oxidasa y como éstas conducen a cambios en el estado de activación.

Interacciones molecular en el complejo de la NADPH oxidasa

p47phox contiene una repetición en tándem de dos dominios SH3 cerca del centro de la molécula. El primero de ellos se une a una secuencia rica en prolina en el C-terminal de p22phox en el complejo de la oxidasa. Además, este dominio SH3 puede interactuar con la secuencia C-terminal rica en prolina en la misma molécula. El segundo dominio SH3 se une a la secuencia rica en prolina de p67phox cerca del centro de esta molécula, sin embargo, las interacciones de SH3 con secuencias ricas en prolina no son los únicos determinantes de las interacciones proteína/proteína.

Reacciones de fosforilación/defosforilación

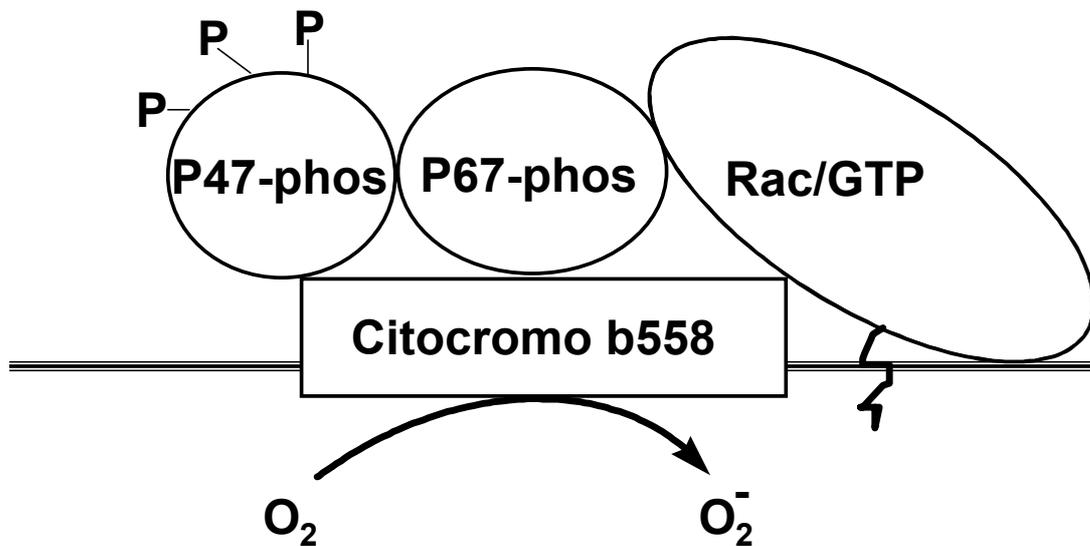
p47phox se fosforila en varias serinas en la vecindad de su extremo C-terminal en respuesta a la activación celular. Esta fosforilación es parte de la señal de activación de la oxidasa, aunque también pueden influir fosforilaciones en otros componentes; sin embargo, se puede activar el sistema en ausencia de p47phox, si existen altas concentraciones de p67phox y Rac. La función de p47phox es incrementar la unión de p67phox, aproximadamente, 100 veces, y la asociación de Rac alrededor de 50 veces. De esta forma, p47phox se comporta como una proteína adaptadora finamente regulada que no interviene directamente en la actividad de la NADPH oxidasa, mientras que Rac y p67phox son reguladores directos de la actividad de la oxidasa.

El papel de la proteína G de bajo peso molecular Rac

Rac pertenece a la familia Rho de GTPasas de bajo peso molecular. Estas proteínas están isopreniladas en su extremo C-terminal, y este lípido media interacciones de la proteína con la membrana celular. La familia Rho es a su vez una subfamilia de la superfamilia Ras. La subfamilia Rho está implicada en la regulación del citoesqueleto,

el crecimiento celular y la transcripción. Existen dos isoformas muy relacionadas de Rac: Rac1 y Rac2, que difieren fundamentalmente en su extremo C-terminal, puesto que Rac1 contiene aminoácidos polibásicos y Rac2 es menos básica. Sus efectores directos son la NADPH oxidasa y PAK (p21-Activated Kinase).

El sistema de la NADPH oxidasa es uno de los ejemplos mejor caracterizados de señalización mediante GTPasas de bajo peso molecular. Rac ensambla la proteína citosólica p47-phox y p67-phox con el flavocitocromo b558 asociado a la membrana para formar el la NADPH oxidasa multi-componente. Las mutaciones de aminoácidos en una región de Rac (residuos 26-45), homóloga de una región efectora de Ras, disminuyen o eliminan la capacidad de Rac para producir la generación de aniones superóxido.



Acoplamiento molecular del complejo de la NADPH oxidasa en la membrana celular para producir radicales de oxígeno.

10. EL SISTEMA DEL ÓXIDO NÍTRICO (NO)

El óxido nítrico es un gas radical cuyas propiedades antimicrobianas se conocen desde la antigüedad, puesto que los sumerios ya utilizaban el NO en el proceso de curación de las carnes para impedir el crecimiento del *Clostridium botulinum*. Más recientemente, a finales del siglo XIX, la nitroglicerina comenzó a utilizarse en el tratamiento de las enfermedades coronarias. A pesar de ser conocidas algunas aplicaciones de los óxidos de nitrógeno, nadie sospechó que este compuesto desempeñara funciones decisivas en el organismo de los mamíferos. Sin embargo, en la pasada década una serie de descubrimientos, procedentes de diferentes líneas de investigación, revelaron que el NO realizaba una amplia gama de funciones, hasta el extremo de convertirlo en uno de los principales mensajeros biológicos, puesto que se descubrió que el NO era la molécula responsable de la vasodilatación producida por la acetilcolina en el endotelio y se identificó como el factor de relajación derivado del endotelio (*endothelium-derived relaxing factor*, EDRF); además, se demostró que el NO tenía propiedades

antimicrobianas y antitumorales; y por otra parte se describió que el NO está presente en las neuronas, donde actúa como mensajero.

El NO es un gas en condiciones ambientales que por presentar un electrón desapareado tiene estructura de radical libre, que le convierte en una molécula muy reactiva. A la vez es una molécula extremadamente lábil y de vida efímera, pues solo dura entre 6 y 10 segundos. Como consecuencia de su reacción con el O₂ y el H₂O se convierte en nitratos y nitritos. Esta reactividad química permite la interacción directa con distintas moléculas, por ejemplo, la guanilato ciclasa y explica su mecanismo de acción farmacológica y su extremada toxicidad. En consecuencia, el mecanismo de acción del NO es una excepción a los mecanismos de señalización bioquímica basados en la interacción con receptores y transducción de señales reiteradamente descritos al analizar el efecto de otros mediadores.

Biosíntesis del NO

El NO se sintetiza por una enzima que se denomina óxido nítrico sintasa (NOS) (EC 1.14.13.39). Se han descrito 3 isoformas de la sintasa de NO que son el producto de la expresión de tres genes diferentes. Esas isoformas son:

- a) NOS neuronal o NOS1: fue la primera NOS en ser purificada y clonada a partir de neuronas de cerebelo de rata. Es citosólica y se expresa en cerebro, glándula adrenal, plaquetas, pulmón, células de músculo esquelético, neutrófilos y epitelio gastrointestinal entre otros.
- b) NOS inducible o NOS2: enzima purificada y clonada por primera vez en macrófagos, es citosólica y se expresa en todo tipo de células incluyendo neuronas y células endoteliales, cuando es inducida por estímulos proinflamatorios como la endotoxina o las citocinas: como, IFN γ , IL-1 β o TNF- α .
- c) NOS endotelial o NOS3: enzima purificada y clonada en células endoteliales. Se expresa además de en esas células en neuronas. Esta enzima se encuentra mayoritariamente en la membrana gracias a que presenta en el extremo N-terminal una miristilación que permite su anclaje a la membrana.

Tabla 1.2. Tipos y características generales de las NOS humanas

Isoformas	NOS1	NOS2	NOS3
Masa	160 kDa	130 kDa	135 kDa
Dependencia de altas $[Ca^{2+}]_i$	SI	NO	SI
Expresión	Constitutiva	Inducible	Constitutiva
Producción de NO	Baja	Alta	Baja
Localización subcelular	Citosol	Citosol y Membrana	Membrana
Localización cromosómica	12q24.2	17 cen q12	7q35-36

La comparación de las secuencias de las isoformas de la NOS con las secuencias de otras proteínas depositadas en las bases de datos ha mostrado que solo presentan cierta homología con una enzima de mamíferos: la citocromo P450 reductasa.

En líneas generales podemos distinguir dos grupos entre las sintasas de NO. El primero correspondería al de las NOS que se expresan de forma constitutiva en todos los tejidos en que están presentes, que son aquellas que dependen de elevaciones transitorias de $[Ca^{2+}]_i$ para activarse. A este grupo pertenecen la NOS1 y NOS3. Estas enzimas producen NO en pequeñas cantidades y durante cortos periodos de tiempo. El NO producido por estas isoformas interviene en procesos fisiológicos como la neurotransmisión o la regulación de la presión sanguínea. En otro grupo aparte estaría la NOS2. Esta enzima se expresa de forma inducible y es activa a las concentraciones de $[Ca^{2+}]_i$ que existen en la célula en reposo, lo que la permite estar activa de forma sostenida durante varios días. Se encuentra asociada a procesos inflamatorios o infecciosos. La muerte celular y el daño tisular pueden ser el precio a pagar por la excesiva producción de NO.

La NO sintasa cataliza la producción de NO a partir de L-arginina en dos reacciones sucesivas de tipo monooxigenasa. En este proceso un nitrógeno guanidino de la L-arginina es oxidado para producir la N^ω-OH-L-arginina como intermediario, el cual es oxidado de nuevo para producir una molécula de NO y otra molécula de L-citrulina. En total, 1,5 moléculas de NADPH y dos moléculas de O₂, que actúan como cosustratos, se convierten en 1,5 moléculas de NADP⁺ y dos moléculas de H₂O. Las NOS solo producen NO cuando se homodimerizan. Además, cada subunidad necesita unirse a cinco cofactores: FAD, FMN, calmodulina, grupo hemo y tetrahidrobiopterina. Por tanto, se forma un complejo macromolecular de 300 kDa para sintetizar una molécula de 30 Da.

La NOS tiene una estructura en dos dominios: un dominio oxigenasa en la porción amino terminal y otro dominio reductasa en la porción carboxilo terminal. El 30-40 % de los aa de este dominio son idénticos a la P450 reductasa.

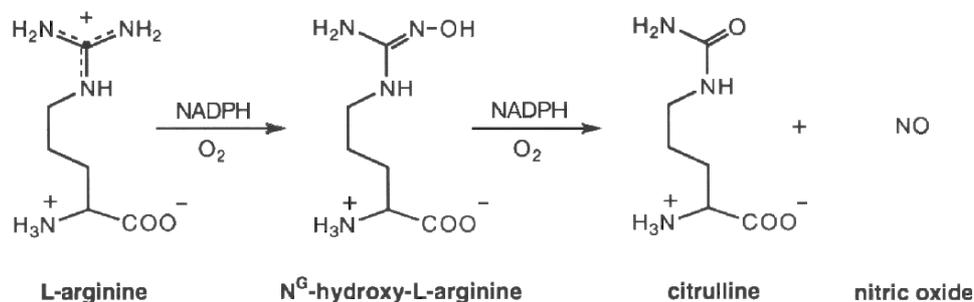


Figura 1.3. Síntesis de óxido nítrico a partir de L-arginina

Modo de acción del NO y de sus especies reactivas

La amplia variedad de efectos que media el NO se producen a través de interacciones covalentes, reacciones de oxidación o coordinación con metales son las dianas celulares. El NO reacciona en los sistemas biológicos con O₂, O₂⁻ y metales de transición, para dar lugar a óxidos de nitrógeno, peroxinitrito o aductos de metales-NO. De acuerdo con esto, los principales objetivos del NO en la célula son las proteínas que contienen metales de transición en la proximidad de los sitios activos o grupos tiol, que en presencia de NO darán lugar a la formación de nitrosotioles.

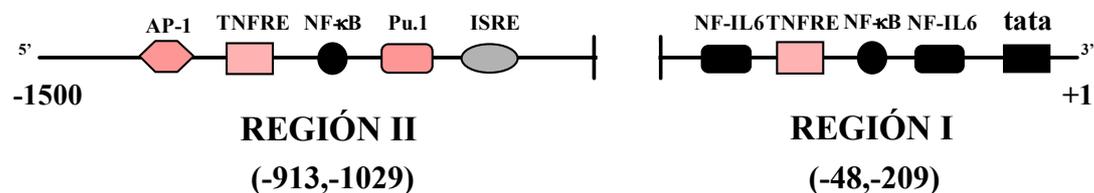
Las proteínas que contienen metales y grupos tiol son las dianas principales del NO: los componentes esenciales del circuito de proteínas regulado por el NO (proteínas de señalización, canales iónicos, receptores, enzimas, y factores de transcripción) contienen estratégicamente localizados cerca de los centros activos metales de transición o grupos tiol.

El NO en la inflamación y el sistema inmune

La activación de la NOS2 da lugar a la formación local de NO en grandes concentraciones de forma sostenida, debido a su capacidad para unirse estrechamente a la calmodulina a las [Ca²⁺]_i que existen en la célula en reposo. Esta enzima se activa, principalmente a nivel transcripcional. El estudio de la NOS2 se ha llevado a cabo, sobre todo, en macrófagos de roedores, rata o ratón, induciendo su expresión con

estímulos proinflamatorios o con productos microbianos. Esos estímulos no han conseguido inducir la expresión de la iNOS en macrófagos humanos aislados de pacientes sanos, por lo que se ha llegado a creer que la NOS2 solo tenía funciones de defensa en los roedores. Sin embargo, posteriormente, se ha detectado la expresión de NOS2 en monocitos de pacientes que sufren enfermedades infecciosas o inflamatorias. Además, se ha demostrado la inducción de la iNOS en macrófagos de otras especies de vertebrados: caballo, oveja, cabra, vaca y pollo, lo que indicaría que la función de la NOS2 en el sistema inmune no se limita a los roedores.

El NO producido por los macrófagos en grandes cantidades tiene actividad citotóxica y citostática frente a virus, bacterias, hongos, protozoos, helmintos y células tumorales. La acción antimicrobiana del NO se potencia por otros productos de los macrófagos como glutatión, H_2O_2 y O_2^- . Esas mismas propiedades hacen que el NO pueda resultar tóxico para las propias células del huésped.



Estructura de la región promotora de la NOS2 de macrófagos murinos. La **REGIÓN I**, situada de -48 a -209, contiene elementos relacionados con la respuesta al LPS que incluyen sitios de unión al factor nuclear de la interleucina 6 (NF-IL6), a NF-κB y al elemento de respuesta a TNF (TNF-RE). La **REGIÓN II**, situada de -913 a -1029, contiene motivos de unión para factores de transcripción relacionados con el $IFN\gamma$, tales como el elemento activado por $IFN\gamma$ /PU.1, el elemento estimulable por $IFN\gamma$ (ISRE), NF-κB y AP-1. Las dos regiones son necesarias para conseguir la máxima expresión de NOS2.

11. LA INFLAMACIÓN COMO MECANISMO PATOGENICO EN LA PRODUCCIÓN DE ENFERMEDAD: LAS REACCIONES DE HIPERSENSIBILIDAD

Cuando las reacciones inflamatorias se producen de forma inadecuada o exagerada, hasta el punto de producir lesiones en los tejidos, se denominan reacciones de hipersensibilidad. Coombs y Gell establecieron una clasificación en cuatro tipos, que a pesar de sus limitaciones, puesto que en la práctica no siempre aparecen claramente diferenciadas, se ha hecho clásica. Los tres primeros tipos de hipersensibilidad están mediados por anticuerpos y el cuarto, especialmente por linfocitos T y macrófagos.

- La **hipersensibilidad de tipo I o inmediata** ocurre cuando una respuesta inmune de inmunoglobulina E (IgE) se dirige contra antígenos medioambientales inocuos, como el polen, el polvo doméstico, los ácaros o la caspa animal. La liberación consiguiente de mediadores farmacológicos, por los mastocitos sensibilizadas por

esa IgE produce una reacción inflamatoria aguda con síntomas como el asma o la rinitis.

- La **hipersensibilidad de tipo II o citotóxica**, dependiente de anticuerpos, ocurre cuando el anticuerpo se une a antígenos presentes en células, dando lugar a fagocitosis, actividad de las células agresoras naturales (NK) o lisis mediada por el complemento.
- La **hipersensibilidad de tipo III** aparece cuando los complejos inmunes se forman en gran cantidad o no son eliminados adecuadamente por el sistema reticuloendotelial, lo que conduce a la aparición de enfermedades del tipo de la enfermedad del suero.
- La **hipersensibilidad de tipo IV o retardada** se manifiesta de forma más grave cuando los antígenos (p. ej., sobre los bacilos tuberculosos) atrapados en los fagocitos mononucleares no pueden ser eliminados, y se produce estimulación de los linfocitos T y la generación de citocinas, que inducen efectos pro-inflamatorios. En el rechazo de injertos y en la dermatitis alérgica por contacto se producen también reacciones de hipersensibilidad retardada.

El asma bronquial como modelo arquetípico de hipersensibilidad tipo I

Los ataques de asma se producen por alérgenos como el polen o el polvo o por estímulos no alérgicos como el aire frío o el ejercicio. Los linfocitos T responden a estos estímulos mediante la producción de citocinas capaces de atraer células inflamatorias y de estimular a los linfocitos B para que produzcan IgE, que se une con alta afinidad a los receptores expresados en la membrana de los mastocitos. El sistema IgE-mastocito constituye la primera línea de defensa de la mucosa frente a los agentes exógenos, y cuando se produce el contacto con el antígeno específico se produce la activación celular con la consiguiente liberación de mediadores preformados y la síntesis de mediadores secundarios, entre los cuales juegan un papel principal los cisteinil-leucotrienos y el factor activador de las plaquetas (PAF). La liberación de estos mediadores es responsable de los síntomas agudos observados en sujetos asmáticos. La broncoconstricción inmediata producida por la inhalación de los alérgenos alcanza el máximo a los 10-15 minutos de la provocación, y usualmente se resuelve en dos horas. Los leucotrienos liberados en la respuesta precoz son responsables de la hipersecreción mucosa, de la vasodilación y del edema en el tejido pulmonar que se asocian con esta respuesta. Esta respuesta inmediata es seguida por el reclutamiento de células inflamatorias en los pulmones como resultado de la producción de quimioatrayentes como LTB₄ y PAF. Este influjo de células inflamatorias puede demostrarse en el líquido de lavado bronquio-alveolar tras la provocación con el antígeno, y ocasionalmente se asocia con una segunda respuesta obstructiva de la vía aérea (respuesta tardía). Esta respuesta es generalmente de mayor duración, y más severa que la respuesta inmediata, se acompaña de hipereactividad bronquial y de aumento del número de eosinófilos en el líquido de lavado bronquio-alveolar y en la mucosa bronquial. En esta situación son los eosinófilos las células responsables de la producción de cisteinil-leucotrienos, y de la presencia de inflamación crónica en la mucosa bronquial de los pacientes asmáticos. Estos hechos explican que las hipótesis patogénicas más aceptadas del asma bronquial incluyan la participación de los leucotrienos y que se hayan desarrollado inhibidores de 5-LOX y antagonistas de los receptores de cisteinil-leucotrienos para el tratamiento de esta enfermedad.

Reacciones de hipersensibilidad tipo II

Las reacciones de tipo III pueden ser causadas por anticuerpos de clase IgG o IgM. Estos anticuerpos interactúan con antígenos tisulares y forman complejos inmunes que activan el sistema del complemento y/o interactúan con células efectoras que producen el daño en los tejidos. Estas células pueden ser neutrófilos, macrófagos, eosinófilos, o células K (*killer cells*), que en general interactúan a través de receptores Fc, en el proceso que se denomina: citotoxicidad dependiente de anticuerpos mediada por células (ADCC). En caso de producirse activación del complemento, ésta se hace por la vía clásica y conduce a la formación del complejo de ataque a la membrana, C5b678(9), y a la lisis de las células revestidas de anticuerpo. Tanto los productos de la activación del complemento, como la IgG actúan como opsoninas unidas a microorganismos y células tisulares, que estimulan la fagocitosis y la producción de radicales de oxígeno, que además de contribuir a la destrucción de patógenos, producen daño en los tejidos. La acumulación de células inflamatorias con la consiguiente liberación de mediadores inflamatorios, enzimas y radicales de oxígeno, junto a la lisis celular mediada por el complemento, explica la destrucción de las membranas basales de glomérulo renal y pulmón en el síndrome de Goodpasture o en las anemias hemolíticas autoinmunes.

Se distinguen tres subtipos de hipersensibilidad tipo II:

- i) Reacciones entre miembros de la misma especie, como ocurre en los procesos de isoimmunización, de los que los ejemplos más frecuentes son las reacciones tras transfusiones incompatibles en el sistema ABO y la enfermedad hemolítica del recién nacido.
- ii) Reacciones de hipersensibilidad autoinmune, en las que los anticuerpos del huésped reaccionan con sus propias células. Este es el caso de la anemia hemolítica autoinmune, la tiroiditis de Hashimoto, en la que el anticuerpo reacciona con el antígeno de superficie de la peroxidasa tiroidea, la púrpura trombocitopénica idiopática, o el síndrome de Goodpasture. En este grupo podrían incluirse también las enfermedades producidas por anticuerpos frente a receptores hormonales. Los autoanticuerpos se pueden comportar como agonistas capaces de estimular esos receptores, o como antagonistas responsables del bloqueo de la señal transmitida a través del receptor ocupado por el autoanticuerpo. Un ejemplo de hiperactividad hormonal inducida por autoanticuerpos es la tirotoxicosis, donde se produce estimulación patológica del receptor de TSH. Ejemplos del mecanismo opuesto son el mixedema, donde el autoanticuerpo bloquea al receptor de TSH, y la miastenia gravis, donde se bloquea el receptor de acetilcolina.

- iii) Las reacciones a drogas tienen especial complicación en cuanto a los mecanismos. En primer lugar la reactividad del fármaco puede conducir a su unión con componentes del organismo y dar lugar secundariamente a producción de IgE específica y la aparición de una reacción de hipersensibilidad tipo I, o a aparición de una respuesta mediada por células perteneciente a las reacciones de hipersensibilidad tipo IV. Incluso, si la respuesta de anticuerpos pertenece a la clase IgG, es posible la formación de complejos inmunes y la aparición de reacciones de hipersensibilidad de tipo III. En el caso que el complejo antígeno-anticuerpo se produzca en la superficie celular, se pueden producir reacciones típicas de citotoxicidad.

Reacciones de hipersensibilidad de tipo III

Cuando se produce la unión de un anticuerpo con un antígeno se forman complejos inmunes que, generalmente, son eliminados por el sistema mononuclear fagocitario; sin embargo, en ocasiones dan lugar a una reacción de hipersensibilidad. De acuerdo con la naturaleza y localización del antígeno y la respuesta inmune del huésped, las lesiones originadas por la formación de inmunocomplejos pueden incluirse en tres grandes grupos.

1. La asociación de una infección persistente con una débil respuesta de anticuerpos conducen a la formación de inmunocomplejos y, eventualmente, a su depósito en los tejidos. Podemos citar como ejemplos la infección ocasionada por *Streptococcus viridans* α -hemolítico o por parásitos como *Plasmodium vivax*, la endocarditis estafilocócica y la hepatitis vírica.
2. La autoinmunidad. En este caso, la producción continuada de anticuerpos frente a los antígenos propios conduce a una formación prolongada de inmunocomplejos. Los sistemas fagocítico mononuclear, eritrocítico y el complemento se sobregargan y los complejos se depositan en los tejidos, como ocurre en el lupus eritematoso diseminado (LED).
3. La formación de complejos inmunes en superficies corporales. Ocurre especialmente en el pulmón tras la inhalación repetida de materiales antigénicos procedentes de hongos, plantas o animales. Encontramos ejemplos en la enfermedad conocida como pulmón del granjero y en la enfermedad de los cuidadores de palomas, en los que existen anticuerpos circulantes contra hongos actinomicetos. Ambas enfermedades son formas de alveolitis alérgicas extrínsecas que ocurren después de una exposición repetida al antígeno, el heno mohoso o los antígenos de paloma, respectivamente. Los anticuerpos inducidos por estos antígenos son primariamente IgG, en lugar de IgE, como ocurre en el caso de las reacciones de hipersensibilidad inmediata (tipo I).

La descripción por Maurice Arthus en 1903 de la producción de lesiones necróticas cutáneas al inyectar localmente antígeno en conejos reiteradamente inmunizados con proteínas heterólogas, es la primera referencia documentada de reacciones tipo III, debiendo mencionarse que la variante pasiva (utilizando anticuerpo obtenido de otro animal), reversa (realizando la inyección local del anticuerpo y sistémica del antígeno) de este modelo ha sido de gran importancia para analizar los mecanismos moleculares y celulares que intervienen en las reacciones de tipo III. Otros modelos experimentales

que han sido de gran utilidad han sido la enfermedad del suero y las enfermedades autoinmunes de los ratones Nueva Zelanda blancos y negros (NZB/NZW).

Reacciones de hipersensibilidad tipo IV

Este tipo de reacciones se observan preferentemente cuando los antígenos se atrapan en los fagocitos mononucleares sin que puedan ser eliminados. En esa situación las células T son estimuladas para producir citocinas, que son los efectores de la respuesta inflamatoria. Un mecanismo similar explica procesos clínicos como la dermatitis de contacto. El patrón temporal de estas respuestas se caracteriza por precisar más de doce horas para su iniciación y de dos a tres días para alcanzar el pico de actividad. A diferencia de las reacciones de tipo I y III, donde es posible producir pasivamente la enfermedad mediante la transferencia de anticuerpo, las reacciones de tipo IV sólo se transfieren mediante el aporte de las células T sensibilizadas. La hipersensibilidad retardada se asocia con inmunidad protectora a cargo de células T, pero sin que exista una correlación absoluta.

Se acostumbra a distinguir tres tipos de hipersensibilidad retardada: *Hipersensibilidad de contacto*, *reacción de tipo tuberculina* y *granuloma*. La dos primeras ocurren en los 2-3 días que siguen al contacto, mientras que la formación de granuloma requiere varias semanas. Las reacciones tipo IV son importantes para la defensa frente a parásitos intracelulares, como ocurre en la tuberculosis, en la sarcoidosis y en la granulomatosis de Wegener. La reacción de Mantoux observada con la aplicación cutánea de micobacterias, son ejemplos de métodos diagnósticos fundamentados en reacciones de hipersensibilidad retardada

12. REPERCUSIÓN SISTÉMICA DE LA REACCIÓN INFLAMATORIA

La reacción inflamatoria generalmente se reduce a un entorno local, sin embargo, puede llegar a comprometer al conjunto del organismo por obligarle a requerimientos generales como son el aporte de nutrientes, la necesidad de sintetizar proteínas implicadas en la defensa del huésped y el desencadenamiento de respuestas neuroendocrinas entre las que se encuentra la fiebre. Esta respuesta se conoce con el nombre de *respuesta de fase aguda*. Cuando esta respuesta afecta al funcionalismo general y produce alteraciones clínicas del funcionamiento de los órganos, hablamos de *fracaso multiorgánico* asociado al choque séptico.

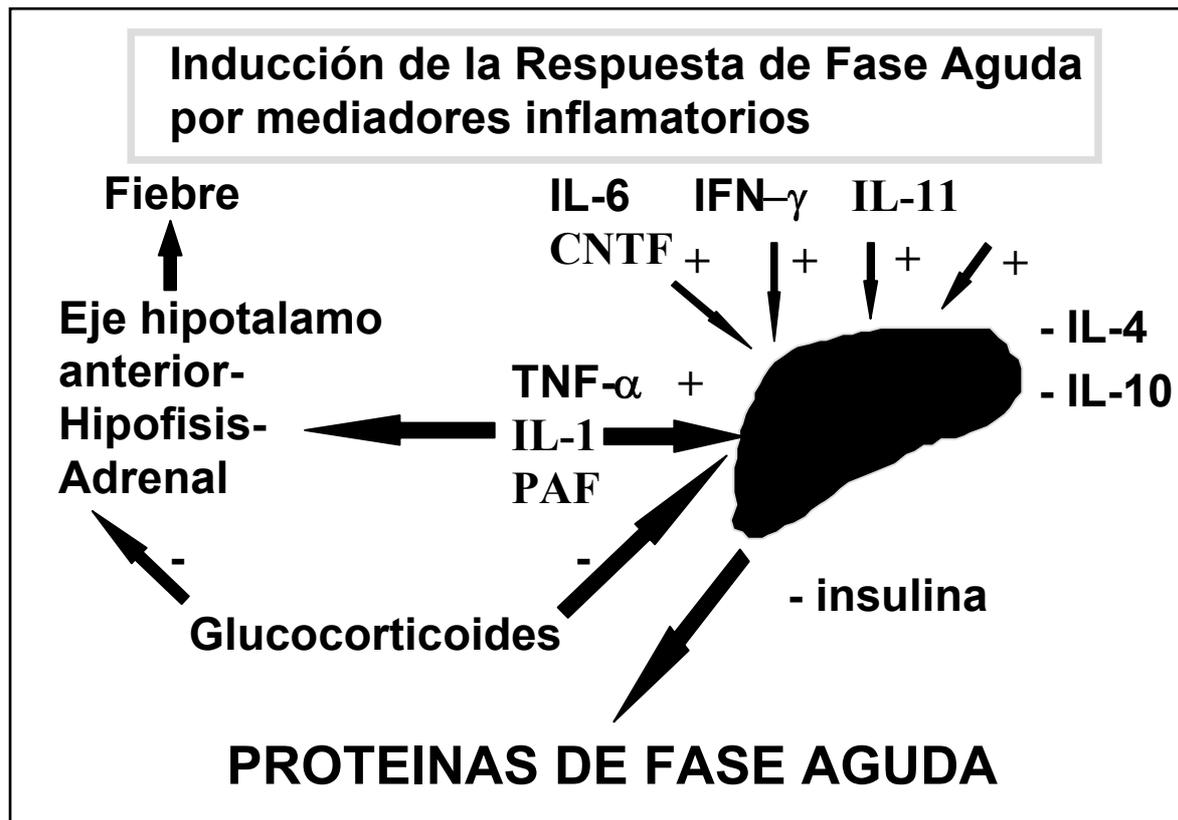
La reacción de fase aguda

En cuanto a la repercusión sistémica de la inflamación existen dos respuestas fisiológicas:

- i) La modificación del punto de control de la temperatura en el hipotálamo y la generación de la respuesta febril.
- ii) Las alteraciones del metabolismo y de la regulación de la expresión génica en el hígado.

Estas respuestas dependen de tres citocinas liberadas en el foco inflamatorio: IL-1, TNF- α e IL-6. Estas citocinas median la fiebre a través de la inducción de prostaglandina E, producida a través de COX-2. Al mismo tiempo, estas citocinas pueden actuar sobre el eje hipófiso-adrenal para generar hormona adreno-corticotropa

(ACTH) y subsiguientemente inducir la producción de cortisol, en forma de mecanismo autorregulador negativo, pues los esteroides adrenales inhiben la expresión de citocinas. La reacción de fase aguda y la inflamación deben ser, pues, entendidas como un proceso dinámico homeostático en el que intervienen además del sistema inmune, otros importantes sistemas orgánicos, como el sistema nervioso y el aparato cardiovascular. Normalmente la respuesta de fase aguda sólo dura unos días, sin embargo, su prolongación excesiva puede conducir a daño vascular (choque endotóxico) o a la producción de daño tisular y al depósito de material proteico como en el caso de la amiloidosis reactiva.



En lo que respecta a la alteración del perfil biosintético hepático, se caracteriza por la disminución de las proteínas habitualmente sintetizadas, y su sustitución por otras proteínas requeridas durante la fase aguda.

La mayoría de las proteínas de fase aguda (*acute phase reactants*, APR), se inducen hasta superar varias veces sus niveles basales, como es el caso de algunos factores del sistema del complemento y proteínas de la coagulación; o alcanzar en algunos casos hasta mil veces el valor normal. Entre estas proteínas se incluyen la proteína C reactiva y el componente sérico del amiloide P. Por el contrario, la albúmina, la prealbúmina, la transferrina y algunas apolipoproteínas disminuyen su concentración plasmática.

Las APR tienen un amplio rango de funciones en la defensa del huésped, pues pueden neutralizar el efecto de los agentes proinflamatorios, y disminuir el daño tisular, o intervenir en la reparación y regeneración de los tejidos.

La proteína C reactiva y el amiloide sérico A pertenecen a una familia de proteínas conocidas como pentraxinas, caracterizadas por una organización homo-pentamérica, organizadas como discos pentagonales. El amiloide sérico A es el nombre genérico

dado a una familia de proteínas polimórficas codificadas por distintos genes. Estas son pequeñas apolipoproteínas que se asocian con una fracción de lipoproteínas durante la respuesta de fase aguda (HDL3), en la que llegan a ser la lipoproteína predominante. El amiloide sérico A aumenta la unión de HDL3 a los macrófagos, al tiempo que disminuye su capacidad de unión a los hepatocitos, de forma que se ha postulado que su papel funcional sería actuar como una señal de redirección de la partícula de HDL3 de los hepatocitos a los macrófagos para poder eliminar el colesterol y los restos lipídicos en los sitios de necrosis.

La gran sensibilidad de la proteína C reactiva a los estímulos capaces de generar la respuesta de fase aguda explican que su determinación en plasma sea un parámetro útil para monitorizar la gravedad de la inflamación o la eficacia de los tratamientos antibióticos durante las infecciones agudas. Curiosamente, enfermedades autoinmunes como el lupus eritematoso diseminado cursa con niveles relativamente bajos de proteína C reactiva.

El choque séptico

El choque séptico es la expresión clínica grave de la respuesta exagerada del huésped a una agresión proinflamatoria, preferentemente de naturaleza infecciosa. El choque séptico es una forma bien definida de los estados sépticos. De acuerdo con la clasificación de Bone, se distinguen:

- i) Septicemia o sepsis, consistente en: infección clínica con aceleración de la frecuencia respiratoria, taquicardia e hiper o hipotermia.
- ii) Síndrome séptico: que incluye además de los síntomas característicos de la sepsis, alteración de la perfusión tisular con la consiguiente encefalopatía aguda, variación del cociente $PaO_2/FiO_2 < 280$ (PaO_2 , Presión arterial de O_2 ; FiO_2 , Fracción de O_2 en la mezcla de gases inspirada), aumento de la lactacidemia y oliguria.
- iii) Choque séptico: en el que al síndrome séptico se añade hipotensión con respuesta a la expansión de volumen o a la intervención farmacológica.
- iv) Choque refractario: en el que la hipotensión no responde a la intervención farmacológica

La clasificación de Bone, bien caracterizada desde el punto de vista fisiopatológico, y de gran utilidad clínica, no considera suficientemente los aspectos etiopatogénicos, puesto que se puede producir la misma situación clínica cuando la reacción de fase aguda ha sido desencadenada por otros factores: factores físicos, quemaduras, pancreatitis, etc. Por esta razón una nueva clasificación de consenso ha introducido el concepto de enfermedad inflamatoria sistémica (*systemic inflammatory response*, SIRS), para reflejar como hecho etiopatogénico fundamental la respuesta del huésped a la agresión e incluir la sepsis como una forma particular del síndrome de respuesta inflamatoria.

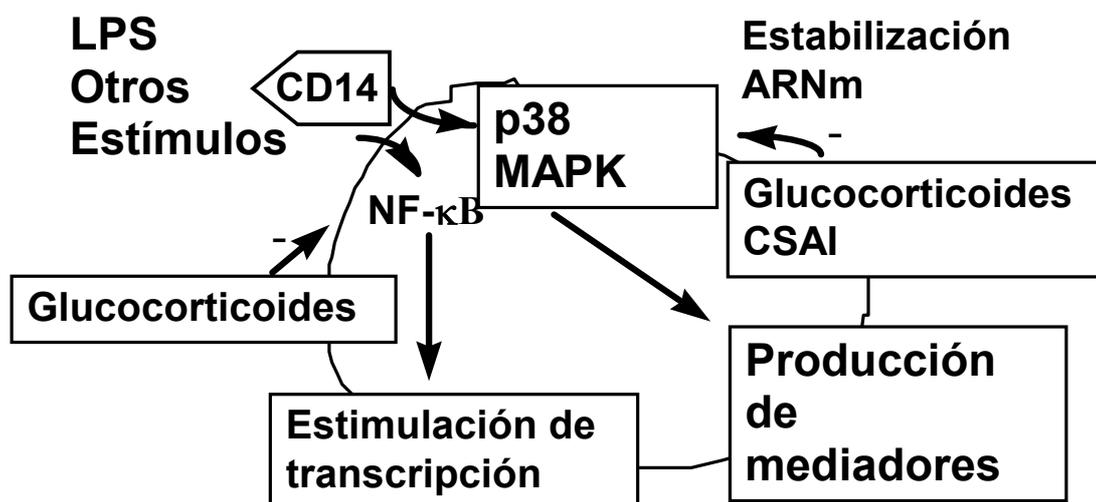
Los síndromes de respuesta inflamatoria sistémica se caracterizan con una alta mortalidad, cercana al 50% en los casos asociados a bacteriemia por gérmenes Gram negativos.

Etiopatogenia del choque séptico

Son los componentes bacterianos los agentes fundamentales en la producción del cuadro. En el caso de las bacterias Gram negativas, el lipopolisacárido de superficie es el agente cuyo papel patogénico está mejor establecido. Se compone de un polisacárido variable según las especies bacterianas y de un dominio lipídico bien conservado denominado lípido A. El lipopolisacárido contiene una cadena O específica externa inmunorreactiva, un núcleo interno ligado al lípido A y un núcleo externo ligado a la cadena O específica. El lípido A vehicula la actividad biológica de los lipopolisacáridos y contiene glucosamina con dos grupos fosfato y un número variable de ácidos grasos. Los lipopolisacáridos interactúan con numerosos blancos celulares en monocitos y macrófagos, lo que indica la posibilidad de interactuar con un número variable de receptores. La molécula CD11b/CD18, un receptor *scavenger* (detoxicador de las lipoproteínas de baja densidad acetiladas) y la molécula CD14. Esta molécula de 55 kD se expresa por las células mieloides y juega un papel fundamental en la respuesta a la endotoxina *in vivo*. Para su unión a la endotoxina, ésta debe haber interactuado previamente con una proteína sérica denominada LBP (*LPS binding protein*).

En cuanto al mecanismo propuesto por el que la interacción LPS-LBP/CD14 activa las células blanco se han propuesto diferentes modelos, aunque la transducción de la señal pasa obligatoriamente por la activación de la MAP quinasa p38.

Mecanismo de Activación de Fagocitos Mononucleares por LPS



En el caso de bacteriemias por gérmenes Gram positivos intervienen exotoxinas, que en general son proteínas de bajo peso molecular y carácter básico que se conocen como superantígenos. La clasificación actual de estas moléculas comprende: TSST-1 (*staphylococcal TSS toxin-1*), las enterotoxinas estafilocócicas y las exotoxinas pirógenas estreptocócicas (serotipos A, B y C). Los superantígenos poseen capacidad de

estimular la proliferación de los linfocitos y la secreción de citocinas de forma independiente del antígeno, puesto que se fijan a las porciones invariables de las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (*MHC, main histocompatibility complex*) de las células presentadoras de antígeno y a la parte invariable de la cadena β del receptor de células T (TCR).

La cascada de mediadores en el síndrome de respuesta inflamatoria sistémica

Independientemente de la causa, se estimula en todos los casos la producción de mediadores inflamatorios, que conduce a la aparición de sepsis y a la aparición de fracaso multiorgánico.

Las citocinas proinflamatorias se producen en grandes cantidades como consecuencia de la interacción entre fagocitos y productos bacterianos, especialmente IL-1, TNF- α , IL-6. Citocinas de otros grupos como IL-8, interferon- γ e IL-10 se producen también en grandes cantidades, y el efecto pleiotrópico de estas moléculas explica la riqueza semiológica de la sepsis y el fracaso multiorgánico.

La aparición de fiebre, los cambios en el recuento leucocitario y la hipotensión arterial, se deben en parte a la producción de TNF. Esta citocina juega un papel importante en la activación del endotelio y la expresión de moléculas de adhesión responsables de cambios en el recuento leucocitario y de la activación de la coagulación. La IL-1 se asocia también con la aparición de fiebre, sueño y cuadro miálgico. También puede contribuir a la hipotensión.

Los mediadores lipídicos son responsables de una porción importante de los síntomas. Las prostaglandinas de la serie E, el tromboxano A₂ y el PAF influyen en el flujo sanguíneo, la extravasación de plasma rico en proteínas, en la activación del endotelio y en la adherencia y agregación plaquetaria. El leucotrieno B₄ y el PAF son activadores de la función leucocitaria. El papel del NO en el síndrome inflamatorio sistémico es aún motivo de investigación. En general se admite que jugaría un papel protector sobre el fracaso multiorgánico por sus propiedades vasoactivas e inhibitorias de la agregación plaquetaria y leucocitaria, aunque podría contribuir a la disminución de la perfusión tisular por vasodilatación excesiva.

Los sistemas de activación en el choque endotóxico

Los factores del complemento aumentan su síntesis hepática como un elemento más de la reacción de fase aguda, en un intento de responder al consumo incrementado de complemento. La cascada de la coagulación se inicia en respuesta a la activación del factor XII por el lípido A de las bacterias Gram negativas y los peptidoglicanos de las bacterias Gram positivas. Esta activación conduce a la activación del sistema de kininas y a la conversión del factor XI en factor XI activado. Este último activa los kininógenos de alto peso molecular y conduce entre otros a la formación de bradicinina, que aumenta la permeabilidad vascular, reduce la tensión arterial y produce contracción del músculo liso pulmonar.

Modelos experimentales y fisiopatología

La administración de lipopolisacárido bacteriano a animales de experimentación ha permitido definir los patrones temporales de elevación de citocinas y su relación con la aparición de los síntomas. El TNF- α se incrementa significativamente a los 90 min de la inyección de lipopolisacárido y permanece elevado durante algunas horas. La IL-6 aumenta de forma más retrasada (120-180 min) y disminuye progresivamente. La IL-8 se incrementa de forma casi paralela y se normaliza al cabo de 6 horas. Las citocinas antiinflamatorias aparecen más tardíamente. Así la IL-12 aparece a las cuatro horas de la inyección de LPS, de forma paralela a la IL-10. Se tiende a interpretar en el momento actual que la evolución del fracaso multiorgánico depende del balance entre citocinas proinflamatorias y citocinas antiinflamatorias, de tal manera que aquellos enfermos que no desarrollan una respuesta de citocinas antiinflamatorias, los que presentan peor pronóstico.

**Orientaciones Terapéuticas del Choque Séptico Fundamentadas
en los Mecanismos Patogénicos**

- a) Bloquear el efecto de la endotoxina mediante anticuerpos específicos.**
- b) Neutralizar las citocinas proinflamatorias con receptores solubles o anticuerpos.**
- c) Antagonizar los receptores de los mediadores inflamatorios.**
- d) Modular farmacológicamente la producción de NO por la vía de la L-arginina.**
- e) Interferir con la activación del factor de transcripción NF- κ B.**
- f) Interferir con la estabilización de los ARNm de citocinas a nivel de p38.**
- g) Administrar citocinas antiinflamatorias (IL-10).**