

NEUTROFILOS HUMANOS (PMN) INDUCEN LA LIBERACION DE LIPOPOLISACARIDOS (LPS) DE BACTERIAS GRAM NEGATIVAS

ISABEL BREYER, MARISA VULCANO, M. FERNANDA ALVES ROSA, MARTIN A. ISTURIZ

División Inmunología, Instituto de Investigaciones Hematológicas, Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires

Resumen Los lipopolisacáridos bacterianos (LPS) son los principales componentes de las membranas de las bacterias gram negativas. Los LPS constituyen poderosos estímulos para las células del sistema inmune y están asociados, frecuentemente, al desencadenamiento del síndrome séptico o al shock séptico. Los polimorfonucleares neutrófilos humanos (PMN) son una de las células más importantes involucradas en la depuración de los LPS. El conocimiento de los mecanismos de detoxificación de los LPS es crucial para el control del síndrome séptico o del shock séptico causados por bacterias Gram negativas. En este trabajo estudiamos la capacidad de los PMN en la detoxificación de los LPS en dos situaciones diferentes: a) cuando el LPS es ofertado a los PMN como una molécula aislada; b) cuando el LPS ofrecido a los PMN es parte constitutiva de las bacterias Gram negativas (*E. coli 0111:B4*). Nuestros resultados demuestran que los PMN son capaces de inhibir la actividad biológica de los LPS de generar el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α). Sin embargo, cuando los LPS se ofrecen como componentes de las bacterias enteras, los PMN inducen la liberación de los LPS bacterianos sin modificar su actividad biológica. Esto determina que la capacidad depuradora de los PMN esté condicionada por la forma en la cual los LPS son presentados a estas células.

Abstract *Human neutrophils induce lipopolysaccharide (LPS) liberation from Gram negative bacteria.* Bacterial lipopolysaccharide (LPS) is the major membrane component of Gram negative bacteria. It is a potent pleiotropic stimulus for the immune system frequently associated with septic syndrome or septic shock. The detoxification of LPS in Gram negative sepsis is one of the important problems to resolve in clinical treatments. In this study we compare the capacity of polymorphonuclear neutrophils (PMN) in LPS detoxification in two different situations: a) when LPS is offered to PMN as an isolated molecule; b) when the LPS offered is part of the whole Gram negative bacteria (*E. coli 0111:B4*). Our results show that PMN are able to inhibit the capacity of LPS to produce TNF- α . However, when whole bacteria, instead of LPS, are incubated with PMN, an enhancement in the production of tumor necrosis factor alpha (TNF- α) is observed. The bacterial overburden of PMN is not the reason for the spread of LPS after PMN incubation. Our conclusion is that PMN have a dual capacity to deal with LPS, either inactivating or releasing it depending on how it is offered.

Key words: neutrophils, lipopolysaccharides, Gram negative bacteria, sepsis

Los lipopolisacáridos bacterianos (LPS), también conocidos como endotoxinas, son componentes naturales de la membrana externa de las bacterias Gram negativas y constituyen poderosos estimulantes de las células del sistema inmune¹.

Al alcanzar la circulación los LPS, o las citoquinas liberadas en respuesta a ellos, son capaces de desencadenar un fenómeno inflamatorio sistémico que, frecuentemente, concluye en un severo daño orgánico múltiple con disminución de la presión arterial conocido en Medicina como shock séptico².

El factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y la interleuquina 1 (IL-1) son las primeras citoquinas liberadas como consecuencia de la interacción de los LPS con los monocitos/macrófagos y constituyen los componentes centrales en la iniciación del shock séptico inducido por endotoxinas^{1,2}.

Recientemente se ha establecido que los niveles altos de citoquinas y LPS en plasma se correlacionan con los índices de mortalidad en pacientes afectados por síndromes sépticos por bacterias Gram negativas³. Por esta razón, más allá de las diferentes estrategias terapéuticas utilizadas para el manejo de los síndromes sépticos por Gram negativos, la eliminación de los LPS de un organismo es uno de los objetivos importantes a resolver.

Luego de entrar en la circulación sanguínea los LPS sufren una hidrólisis limitada y son depurados en el hígado a través de receptores hepáticos⁴, con la coopera-

Recibido: 6-I-1998

Aceptado: 5-II-1998

Dirección postal: Dr. Martín A. Isturiz, Instituto de Investigaciones Hematológicas, Academia Nacional de Medicina, Pacheco de Melo 3081, 1425 Buenos Aires, Argentina,
Fax: 54-1-803-9475, e-mail: Postmaster@anmra.sld.ar

ción de lipoproteínas de alta densidad y quilomicrones⁵. Además, se ha demostrado que los polimorfonucleares neutrófilos (PMN) son una de las principales células involucradas en los procesos de detoxificación de los LPS a través de mecanismos de deacilación efectuados por enzimas como las acilooxiacil hidrolasas^{6,7}. Por otra parte, la lactoferrina, la lisozima y otros factores que incrementan la permeabilidad de las membranas bacterianas actúan modulando la acción biológica de los LPS⁸.

Los estudios de detoxificación de LPS son de limitado valor clínico debido a que habitualmente se utilizan endotoxinas purificadas⁴. Sin embargo, no se conoce qué sucede con la detoxificación de LPS cuando éstos son ofertados a los PMN en el contexto de la bacteria entera como ocurre en las infecciones naturales.

El objetivo del presente trabajo fue estudiar comparativamente la capacidad de los PMN de detoxificar LPS en dos situaciones diferentes: a) cuando el LPS es ofertado a los PMN como una molécula aislada; b) cuando el LPS ofrecido a los PMN es parte constitutiva de la bacteria.

Las experiencias fueron llevadas a cabo utilizando bacterias de la cepa *E. coli* 0111:B4 inactivadas por tratamiento con formol, y con LPS purificado correspondiente a la misma cepa bacteriana (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO). Los PMN fueron purificados por las técnicas de Fcoll-Hypaque y sedimentación en dextran⁹ y llevados a una concentración de 15×10^6 células/ml en el medio de cultivo RPMI 1640 suplementado con 5% de suero fetal bovino y gentamicina (50 µg/ml). La incubación de 200 µl de la suspensión de PMN con LPS o bacterias

se hizo durante 1 hora a 37°C. Luego de ese período, los tubos fueron centrifugados y el LPS residual presente en los sobrenadantes fue determinado por su capacidad de generar TNF-α sobre células mononucleares periféricas humanas. Para evaluar los niveles de fagocitosis, las bacterias *E. coli* 0111:B4 fueron marcadas con cromo radioactivo (⁵¹Na₂CrO₄) e incubadas con PMN. Luego de 30 minutos de incubación a 37°C los tubos fueron centrifugados a baja velocidad con la finalidad de separar las bacterias libres de las fagocitadas. El procedimiento fue repetido cinco veces más y finalmente se midió la radioactividad en el sedimento celular que representa a las bacterias fagocitadas.

Para evaluar la inactivación de LPS por los PMN, 3×10^6 PMN fueron incubados con 25 ng de LPS en un volumen final de 250 µl. Luego de 1 hora de incubación las células fueron centrifugadas y en los sobrenadantes recuperados se evaluó la capacidad de producir TNF-α en células mononucleares periféricas humanas. El TNF-α fue evaluado por el ensayo de actividad biológica, determinando su capacidad lítica sobre monocapas de células L-929¹⁰. Este efecto lítico es completamente inhibido por un anticuerpo policlonal anti-TNF-α (Sigma Chemical Co.). Todos los experimentos fueron realizados por lo menos 4 veces, mostrándose solamente uno representativo del conjunto.

Los resultados presentados en la Figura 1 indican que, luego de la incubación de LPS con PMN, los sobrenadantes tienen una reducida capacidad de producir TNF-α (baja concentración de LPS), respecto a aquellos obtenidos de LPS incubado con PMN inactivados por congelamiento y descongelamiento reiterados o en au-

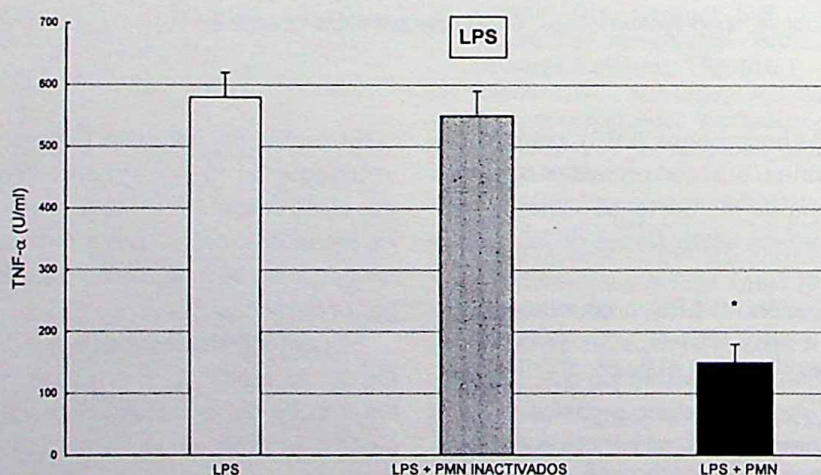


Fig. 1.- Producción de TNF-α por sobrenadantes de PMN incubados con LPS. 200 µl de PMN a 15×10^6 células/ml en RPMI, fueron incubados a 37°C por 1 hora con 25 ng/ml de LPS. Los controles fueron hechos en las mismas condiciones experimentales con PMN inactivados o en ausencia de PMN. Después de 1 hora de incubación los tubos fueron centrifugados y en los sobrenadantes se evaluó la producción de TNF-α en células mononucleares periféricas humanas. El asterisco (*) indica diferencias significativas respecto de los controles ($p < 0.001$). Cada valor representa la media \pm SD de un experimento representativo ($n = 4$) hecho por triplicado.

sencia de células. Por lo tanto, el experimento muestra que la desaparición de la actividad de los LPS de los sobrenadantes no se debe a un secuestro inespecífico de LPS por los PMN, sino a un mecanismo activo de captación. Estos datos confirman los obtenidos por otros autores que demuestran que los PMN son capaces de deacilar enzimáticamente a los LPS, hidrolizando por lo menos tres cadenas hidrocarbonadas, transformándolos en componentes biológicamente inactivos¹¹ y también aquéllos que han demostrado que la lactoferrina, es capaz de inhibir la actividad biológica de los LPS⁸.

Sin embargo, aunque la inactivación de LPS aislados por PMN es en sí mismo un hecho beneficioso para un organismo, parece no representar un modelo adecuado para el control de los fenómenos sépticos⁴. Por esa razón, nosotros utilizamos el mismo diseño experimental pero en presencia de bacterias *E. coli* 0111:B4 en lugar del LPS como molécula aislada. Como se muestra en la Figura 2, sorprendentemente, los sobrenadantes provenientes de los PMN incubados con *E. coli* presentaron una significativa capacidad de producir TNF- α (alta concentración de LPS), mientras que no se observó este efecto con sobrenadantes de bacterias aisladas o en presencia de PMN inactivados. Este efecto no se debe a una sobrecarga bacteriana que supera la capacidad detoxificante de los PMN ya que trabajando con un número 100 veces menor de bacterias (3×10^7 bacterias/tubo), y donde la fagocitosis de bacterias marcadas con ⁵¹Cr se redujo 12 veces, el fenómeno observado fue cualitativamente similar (no mostrado).

El paso siguiente fue corroborar si la capacidad de esos sobrenadantes de producir TNF- α se debe exclusivamente a LPS y no a otros productos que eventual-

mente pueden ser liberados por las bacterias o los PMN. Para ello, los sobrenadantes fueron tratados con polimixina B (50 μ g/ml), un conocido y bien definido antagonista de LPS¹², durante 15 minutos a 37°C y luego se evaluó la capacidad de los mismos para producir TNF- α . Los resultados obtenidos mostraron que la capacidad de producir TNF- α fue totalmente abolida por la polimixina B, indicando que la molécula responsable de la producción de TNF- α fue, efectivamente, el LPS. Estos resultados indican que cuando las bacterias son lisadas por los PMN se produce una gran liberación de moléculas de LPS que no pueden ser detoxificadas eficientemente por los PMN. La causa de este fenómeno puede deberse a que cada bacteria posee en su membrana alrededor de 3×10^6 moléculas de LPS¹³ y no se depuran en la medida en que éstos se liberan al medio. En consecuencia los PMN, considerados como una de las células más importantes en la detoxificación de los LPS¹⁴, paradójicamente se pueden convertir en una de las células diseminadoras de los LPS luego de la lisis y degradación de bacterias Gram negativas.

Trabajos realizados por otros autores han demostrado que los PMN y sus productos tóxicos contribuyen al desarrollo de la injuria tisular durante la sepsis o el shock séptico¹⁻³. Esto sugiere que la liberación de LPS activo por parte de los PMN podría representar un mecanismo adicional de agresión mediado por los PMN.

Esta diseminación de LPS por los PMN puede ser causada por la maquinaria lítica de los fagocitos constituida esencialmente por la generación de productos reactivos del oxígeno y por la secreción de enzimas lisosomales al medio circundante. Además, la presencia de anticuerpos específicos podrían, eventualmente, am-

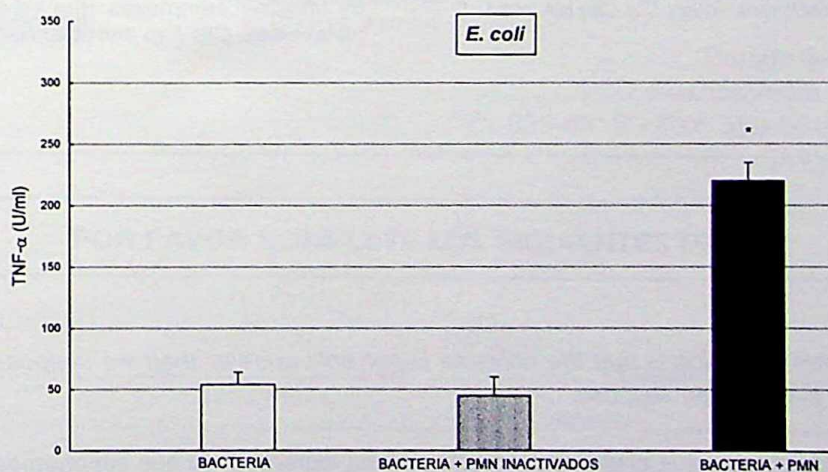


Fig. 2. Producción de TNF- α por sobrenadantes de PMN incubados con *E. coli* 0111:B4. 200 μ l de PMN a 15×10^6 células/ml en RPMI, fueron incubadas a 37°C durante 1 hora con 15 μ l de *E. coli* 0111:B4 a 1.8×10^{11} células/ml. Los controles fueron hechos en las mismas condiciones experimentales con PMN inactivados o en ausencia de PMN. Después de 1 hora de incubación los tubos fueron centrifugados y en los sobrenadantes se evaluó la producción de TNF- α en células mononucleares periféricas humanas. El asterisco (*) indica diferencias significativas respecto de los controles ($p < 0.001$). Cada valor representa la media \pm SD de un experimento representativo ($n = 5$) hecho por triplicado.

plificar estos efectos a través de mecanismos citotóxicos que actúan a través de receptores para la porción Fc de las IgG como la generación de radicales libres por complejos inmunes y la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). Todos ellos son mecanismos rápidos y poderosos de ataque de estructuras celulares¹⁵.

Las consecuencias de la actividad de los PMN sobre las *E. coli* 0111:B4 es similar, en algunos aspectos, a lo que sucede con el uso de antibióticos en las sepsis. En efecto, estos antimicrobianos, generalmente beneficiosos para el huésped porque reducen el número de bacterias viables, a menudo promueven la liberación de endotoxinas en el proceso de bacteriolisis, empeorando la evolución clínica de los pacientes¹⁴.

En conclusión, nuestro trabajo demuestra que los PMN pueden ejercer una acción dual en los procesos sépticos, y no deben considerarse simplemente como células responsables de la depuración de los LPS. En efecto, en circunstancias donde ellos interactúan con bacterias Gram negativas son capaces de diseminar los LPS bacterianos, y pueden generar consecuencias opuestas a las deseadas.

Agradecimientos: Al Servicio de Hemoterapia del Hospital Rivadavia, Buenos Aires. Este trabajo fue subsidiado por el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica PICT 0160 y la Fundación Alberto J. Roemmers.

Bibliografía

- Parrillo JE. Pathogenetic mechanisms of septic shock. *N Engl J Med* 1993; 328: 1471-7.
- Bone RC. Sepsis syndrome. New insights into its pathogenesis and treatment. *Infect Dis Clin NA* 1991; 5: 793-805.
- Casey LC, Balk RA, Bone RC. Plasma cytokine and endotoxin levels correlate with survival in patients with the sepsis syndrome. *Ann Int Med* 1993; 119: 771-8.
- Cross AS, Opal SM. Endotoxin's role in Gram-negative bacterial infection. *Curr Op Infect Dis* 1995; 8: 156-63.
- Harris HW, Grunfeld C, Feingold KR, Read TE, Kane JP, Jones AL, et al. Chylomicrons alter the fate of endotoxin, decreasing tumor necrosis factor release and preventing death. *J Clin Invest* 1993; 91: 1028-34.
- Munford RS, Hall CL. Detoxification of bacterial lipopolysaccharides (endotoxins) by a human neutrophil enzyme. *Science* 1986; 234: 203-5.
- Erwin AL, Munford RS. Processing of LPS by phagocytes. In: Morrison DC and Ryan JL editors, *Bacterial Endotoxin Lipopolysaccharides, Molecular Biochemistry and Cellular Biology*. Vol. 1. Boca Raton, Florida: CRC Press; 1992; p 337-48.
- Wang D, Pabst KM, Aida Y, Pabst MJ. Lipopolysaccharide-inactivating activity of neutrophils is due to lactoferrin. *J Leukoc Biol* 1995; 57: 865-74.
- Boyum A. Separation of leukocytes from blood and bone marrow. *Scand J Lab Invest* 1968; 97 Suppl 22: 77-89.
- Wang AM, Creasey AA, Lander MB, Lin LS, van Arsdell JN, Yamamoto R, et al. Molecular cloning of the complementary DNA for human tumor necrosis factor. *Science* 1985; 228: 149-54.
- Mey A, Hmama Z, Normier G, Revillard JP. Alteration of deacylated lipopolysaccharide antagonistic properties by interaction with plasma factors. *J Leukoc Biol* 1997; 61: 17-23.
- Lynn WA, Golenbock DT. Lipopolysaccharide antagonists. *Immunol Today* 1992; 13: 271-6.
- Rietschel ET, Kirikae T, Schade FU, Mamat U, Schmidt G, Loppnow H, et al. Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function. *FASEB J* 1994; 8: 217-25.
- NIH Conference. Moderator: C Natanson. Selected treatment strategies for septic shock based on proposed mechanisms of pathogenesis. *Ann Intern Med* 1994; 120: 771-83.
- Geffner J, Giordano M, Palermo M, Prat A, Serebrinsky G, Isturiz MA. Neutrophil mediated cytotoxicity triggered by immune complexes: the role of reactive oxygen metabolites. *Clin Exp Immunol* 1987; 69: 668-75.

My own suspicion is that the universe is not only queerer than we suppose, but queerer than we can suppose.

Mi sospecha es que el universo no sólo es más extraño de lo que suponemos sino más extraño de lo que podemos suponer.

J.B.S. Haldane (1892-1964)

On being the right size, 1927