



Modulation of immune response by bacterial lipopolysaccharides

Modulación de la respuesta inmune por los lipopolisacáridos bacterianos

Gustavo Aldapa-Vega,^{1,2} Rodolfo Pastelín-Palacios,³ Armando Isibasi,¹ Mario A. Moreno-Eutimio,⁴ Constantino López-Macías¹

Abstract

Lipopolysaccharide (LPS) is a molecule that is profusely found on the outer membrane of Gram-negative bacteria and is also a potent stimulator of the immune response. As the main molecule on the bacterial surface, is also the most biologically active. The immune response of the host is activated by the recognition of LPS through Toll-like receptor 4 (TLR4) and this receptor-ligand interaction is closely linked to LPS structure. Microorganisms have evolved systems to control the expression and structure of LPS, producing structural variants that are used for modulating the host immune responses during infection. Examples of this include *Helicobacter pylori*, *Francisella tularensis*, *Chlamydia trachomatis* and *Salmonella spp.* High concentrations of LPS can cause fever, increased heart rate and lead to septic shock and death. However, at relatively low concentrations some LPS are highly active immunomodulators, which can induce non-specific resistance to invading microorganisms. The elucidation of the molecular and cellular mechanisms involved in the recognition of LPS and its structural variants has been fundamental to understand inflammation and is currently a pivotal field of research to understand the innate immune response, inflammation, the complex host-pathogen relationship and has important implications for the rational development of new immunomodulators and adjuvants.

Keywords: Lipopolysaccharide; Toll-like receptor 4; Immunomodulation

Este artículo debe citarse como:

Aldapa-Vega G, Pastelín-Palacios R, Isibasi A, Moreno-Eutimio MA, López-Macías C. Modulación de la respuesta inmune por los lipopolisacáridos bacterianos. Rev Alerg Mex. 2016;63(3):293-302

¹Instituto Mexicano del Seguro Social, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Hospital de Especialidades, Unidad de Investigación Médica en Inmunoquímica, Ciudad de México, México.

²Instituto Politécnico Nacional, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Programa de Posgrado en Inmunología, Ciudad de México, México.

³Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Química, Departamento de Biología, Ciudad de México, México.

⁴Hospital Juárez de México, Unidad de Investigación,

Unidad de investigación de inmunidad e inflamación, Ciudad de México, México.

Correspondencia: Constantino López-Macías.
constantino@sminmunologia.mx

Recibido: 2016-06-27
Aceptado: 2016-06-27



Resumen

El lipopolisacárido (LPS) se encuentra abundantemente en la membrana externa de las bacterias gramnegativas y es un potente estimulador de la respuesta inmunitaria. Al ser la molécula predominante en la superficie bacteriana también es la de mayor actividad biológica. La respuesta del sistema inmunitario del hospedero es activada por el reconocimiento molecular del LPS mediante el receptor tipo Toll 4 (TLR4), por lo que está íntimamente ligada a su estructura. Los microorganismos cuentan con sistemas que les permiten controlar la expresión y estructura del LPS, lo cual les es útil para modular la respuesta inmunitaria del hospedero y lograr la infección. Algunos ejemplos incluyen a *Helicobacter pylori*, *Francisella tularensis*, *Chlamydia trachomatis* y varias especies de *Salmonella*. Altas concentraciones de LPS pueden inducir fiebre, aumento del ritmo cardíaco y dar lugar a choque séptico y la muerte. En concentraciones relativamente bajas, algunos LPS son inmunomoduladores muy activos que pueden inducir la resistencia no específica a los microorganismos invasores. El esclarecimiento de los mecanismos moleculares y celulares involucrados en el reconocimiento del LPS y de sus variantes estructurales permite entender la respuesta inmune innata, la inflamación y la compleja relación hospedero-patógeno, para el desarrollo de nuevos inmunomoduladores y adyuvantes.

Palabras clave: Lipopolisacárido; Receptor tipo toll 4; Inmunomodulación

Abreviaturas y siglas

14:0(~-0H), acilos secundarios del grupo hidroxilo del ácido mirístico	LPS (S), lipopolisacáridos liso
14:0(3-0H), ácido 3-hidroximirístico	LPS-MD2, LPS + proteína soluble MD2
14:0, ácido mirístico	LpxO, beta-hidroxilasa
CAMP, péptidos catiónicos antimicrobianos	miRNA, micro RNA
Fe ³ , ión férrico	MPL, monofosforil lípido A
GlepN II-GlepN I, glucosamina II-glucosamina I unidas por enlace glucosídico β 1-6	MyD88, proteína de diferenciación mieloide 88
IRAK-M, cinasa M asociada al receptor de IL-1	MyD88s, variante por splicing de MyD88
Kdo, ácido 3-desoxi-D-mano-oct-2-ulosónico	NF-κB, factor nuclear κB
Ko, ácido D-glicero-D-talo-oct-2-ulosónico	pags, genes PhoP-activados
LBP, proteína de unión a lipopolisacárido	pH, potencial de hidrogeniones
L-DHEP, L-glicero-D-mano-heptosa	prgs, genes PhoP-reprimidos
LOS, lipooligosacáridos	SOCS-1, molécula supresora de las señales de citocinas
LPS, lipopolisacáridos	ST2, regulador negativo ST2
LPS (R), lipopolisacárido rugoso	UGD, UDP-glucosa deshidrogenasa

Introducción

Desde la época de las escuelas de Hipócrates (460-370 a. C.) y Galeno (129-199 a. C.) se postuló que las enfermedades eran producidas por “venenos”. Con el paso del tiempo el término evolucionó al de “miasma” que proviene del griego *miainein* que significa contaminado; en este modelo el “mal aire” esparcía el veneno y las personas que lo inhalaban enfermaban, pero esta teoría no explicaba por qué no todas las personas que inhalaban el mismo aire padecían la enfermedad. Otra hipótesis explicaba que las infecciones eran causadas por un material venenoso no volátil denominado “contagión”, que proviene del latín ‘contigiere’ que significa tocar.

La teoría de que un veneno estaba presente en la materia en descomposición recibió un fuerte soporte con los experimentos de Albrecht von Haller (1708-1777) y François Magendie (1783-1855), quienes mostraron que la aplicación intravenosa de carne o pescado descompuestos a animales causaba enfermedad. Peter L. Panum (1820-1885) puede ser considerado el pionero en el aislamiento y caracterización de los materiales venenosos. Jacob Henle (1809-1885) postuló que el veneno pútrido conocido como “miasma” o “contagión” podía reproducirse en los individuos afectados haciendo alusión a organismos vivos.

Louis Pasteur (1822-1895) demostró que eran gérmenes los responsables de la putrefacción y descomposición de la materia orgánica. Ludwig Brieger (1849-1919) descubrió que los gérmenes producen y secretan productos venenosos a los cuales denominó toxinas. Las toxinas diftérica y tetánica, fueron los primeros “venenos” bacterianos identificados.

El descubrimiento de la endotoxina al final del siglo XIX se basa en los experimentos de Richard Pfeiffer (1858-1945) en los cuales describe que los lisados de bacterias muertas por calor del agente infeccioso *Vibrio cholerae* causaban reacciones de choque tóxico en conejillos de indias. Sus experimentos lo llevaron a formular el concepto de que *Vibrio cholerae* albergaba una sustancia tóxica es-

table al calor que se localizaba en el interior de la célula bacteriana y por lo tanto la nombró endotoxina (del griego “endo” que significa “dentro”) para distinguirla de las exotoxinas ya conocidas de *Vibrio cholerae*.¹

Gracias a los trabajos de Mary Jane Osborn y de Hiroshi Nikaido, hoy en día sabemos que los efectos biológicos de las preparaciones bacterianas utilizadas en estos primeros estudios fueron preferentemente evocados por una clase de sustancias que se denominan lipopolisacáridos (LPS) en función de su constitución química. El desarrollo de métodos de extracción adecuados fue crucial para la caracterización química de la endotoxina.¹

El LPS o endotoxina es una molécula altamente inmunogénica que se encuentra abundantemente en la membrana externa de las bacterias gramnegativas y desempeña un papel importante en la interacción patógeno-hospedero a través de la activación del sistema inmunitario. Además, el LPS tiene una gran importancia clínica, ya que altas concentraciones de LPS pueden inducir fiebre, aumentar la frecuencia cardíaca, y llevar a la muerte por un choque séptico.² A lo largo de esta revisión describiremos las características químicas y biológicas del LPS, así como los mecanismos que las bacterias usan para modificar la estructura del LPS y evadir al sistema inmune.

Estructura del lipopolisacárido

El LPS es una molécula cargada negativamente que puede ser dividida en tres regiones: la porción del lípido A, que está embebido en la membrana externa, el núcleo de oligosacáridos y el antígeno O que se extiende hacia el exterior de la bacteria. La región del lípido A representa el centro inmunorreactivo del LPS debido al reconocimiento específico y a menudo muy sensible de esta estructura por numerosos componentes celulares y humorales de la inmunidad innata.³

Los lipopolisacáridos que poseen los tres dominios se llaman LPS (S) o formas lisas, mientras que los LPS que carecen del antígeno O se nombran LPS

(R) o rugosos aunque también se les denomina lipooligosacáridos (LOS). La mayor parte de las bacterias gramnegativas presentan LPS en su membrana externa, a la fecha se sabe que solo las especies del género *Sphingomonas* carecen de esta molécula y en su lugar presentan glicoesfingolípidos.⁴

La estructura química del lípido A en *Escherichia coli* y algunas enterobacterias, está formada por un disacárido de D-glucosamina bifosforilado en 1 y 4' unidos entre sí por un enlace glucosídico β 1-6 (GlcP N II-GlcP N I). Ambas glucosaminas están sustituidas por ácido 3-hidroximirístico [14:0(3-OH)] en las posiciones 2, 3, 2' y 3', con sustituciones de grupo acilos secundarios del grupo hidroxilo de 14 [14:0~OH] en posición 3' por ácido mirístico (14:0) y en 2' por ácido láurico de la GlcP N II.⁵

Existen diferencias en la estructura del lípido A entre las especies de bacterias, incluso, en la misma especie puede existir más de una estructura química de lípido A.⁶ Por ejemplo, el lípido A que frecuentemente tiene acilaciones de ácidos grasos con 12 o 14 carbonos puede variar dependiendo de la especificidad de las enzimas que realizan la acilación de los residuos de azúcares como es el caso de *Bacteroides fragilis* y *Bordetella pertussis*, en donde las enzimas que catalizan la acilación de los restos de azúcar parecen ser multifuncionales, por lo tanto, ser capaz de reconocer más de una cadena de acilo específica como sustrato.⁷ Otras diferencias con respecto al lípido A de *Escherichia coli* que se presentan en otros géneros bacterianos consiste en el número de acilos presentes en el lípido A, como es el caso de *Helicobacter pylori* que tiene un lípido A tetracilado, diversas especies de *Acinetobacter* que presentan un lípido A heptacilado, o *Pseudomonas* con uno pentacilado.⁸ Estas diferencias aunadas a otras que se pueden generar en respuesta a los medios ambientes en que se desarrollan las bacterias pueden ocasionar que el reconocimiento del lípido A por TLR4/MD2 sea más débil, lo cual resulta en una ventana que permite que los patógenos puedan evadir la respuesta inmune innata y afecten a la inmunidad adaptativa.

El dominio del núcleo del LPS de enterobacterias contiene al menos un residuo de ácido 3-desoxi-D-mano-oct-2-ulosónico (Kdo) unido covalentemente a uno de los residuos de glucosamina del lípido A. En bacterias entéricas suelen existir de 8 a 12 unidades de monosacáridos a menudo ramificados. En el C-4 del Kdo, puede haber uno o dos residuos de Kdo, tres residuos L-glicero-D-manoheptosa (L-DHEP), el residuo de la heptosa puede estar sustituido por un grupo fosfato, pirofosfato, fosforiletanolamina, o por otro monosacárido en el llamado núcleo interno. El núcleo externo del LPS de *Salmonella*, *Escherichia*, *Shigella*, *Hafnia*, *Citrobacter* y *Erwinia* generalmente consiste en un oligosacárido de hasta seis unidades de azúcar unidas a la heptosa II. En bacterias gramnegativas no entéricas se sabe que es rara la presencia de heptosas como en el caso de *Francisella tularensis* y de *Legionella pneumophila* en las cuales el residuo de Kdo se encuentra unido a un residuo de manosa; otros patógenos no entéricos como *Acinetobacter*, *Chlamidia* y *Moraxella* también carecen de heptosas. *Burkholderia cepacia*, *Haemolyticus acinetobacter* y *Yersinia pestis* no tienen en su núcleo KDO, en su lugar sintetizan el análogo ácido D-glicero-D-talo-oct-2-ulosónico Kdo (Ko). El núcleo carece de función estimuladora del sistema inmune innato pero es capaz de estimular al sistema inmune adaptativo y generar anticuerpos específicos en las bacterias que carecen del antígeno O, es decir en cepas rugosas.⁹

El antígeno O, también llamado polisacárido O-específico, por lo general está constituido por no más de cinco unidades de repetición de monosacáridos con diferentes tipos de enlaces glucosídicos. La diversidad estructural de los antígenos O es notable, con más de 60 monosacáridos y 30 componentes diferentes de carbohidratos reconocidos y con la posibilidad de estar unidos covalentemente en diferentes posiciones. La posibilidad de combinación y unión proporciona una probabilidad muy grande para la generación de esta estructura, por lo general diferente entre géneros y especies y muy importantemente diferente entre miembros de la misma especie, pro-

duciendo los llamados serotipos, organismos de una misma especie pero biológicamente diferentes. El antígeno O se puede encontrar solamente en el LPS de tipo liso de bacterias donde determina sus propiedades antigénicas.⁵

Reconocimiento y señalización del LPS

Durante muchos años se sabía que el LPS podía desencadenar respuestas inflamatorias cuando se introducía en los mamíferos, pero los eventos moleculares exactos que provocaban la respuesta no habían sido dilucidados. El descubrimiento de que el LPS se une a la proteína de unión a lipopolisacárido (LBP) en el suero¹⁰ y que luego los complejos LPS-LBP se transferían a CD14¹¹ fueron la primera visión de la compleja maquinaria de reconocimiento del LPS.

Por muchos años el CD14 fue identificado como la única molécula responsable de reconocimiento LPS, sin embargo, la incapacidad de CD14 para atravesar la membrana celular y alcanzar el citoplasma, levantó dudas en cuanto a su capacidad para transducir la señal activada por el LPS.¹¹ Por lo tanto surgieron teorías sobre una molécula receptora que se asociaba con CD14 y que era la responsable de la transducción de las señales inducidas por el LPS, pero tendrían que pasar casi 10 años para revelar la identidad de esta molécula. Fue con el descubrimiento de que los ratones C3H/HeJ eran hiporrespondedores al LPS, pero altamente susceptibles a la infección por bacterias gramnegativas, que se pudo identificar al TLR4 como el receptor del LPS.¹²

Actualmente se sabe que los ratones C3H/HeJ tienen una mutación puntual en el dominio citoplásmico de TLR4 (posición 712 sustitución de prolina por histidina), lo cual impide la asociación con proteínas adaptadoras para llevarse a cabo la señalización intracelular. Posteriormente se reveló otra pieza de la maquinaria del reconocimiento del LPS, Shimazu et al.¹³ demostraron que una proteína soluble llamada MD2 se asociaba con TLR4 y confería respuesta contra LPS bacteriano. Con el paso de los

años el modelo de receptor único de la activación fue desapareciendo en el pasado distante para ser reemplazado por asociaciones de receptores heterotípicos complejas.

En los últimos años se ha avanzado de forma importante en la identificación de los mecanismos de reconocimiento y señalización del LPS. Las moléculas de LPS están ancladas en la membrana externa bacteriana, para ser reconocido por el sistema inmune del hospedero, el LPS tiene que ser liberado de la membrana externa. Esto puede suceder indirectamente con la muerte de la célula bacteriana, por la formación y liberación de vesículas de membrana externa o directamente por la proteína de unión a LPS (LBP), una transferasa de lípidos que es capaz de unirse a las moléculas de LPS de la membrana bacteriana o de vesículas. LBP transporta las moléculas monoméricas de lípido A y las transfiere a CD14. La proteína CD14 puede estar anclada a la membrana de las células que expresan TLR4 o puede encontrarse como una proteína soluble. CD14 asociado a membranas transporta al lípido A hacia la proteína MD-2 que también puede encontrarse en forma de proteína soluble o unida a un monómero de TLR4 a través de enlaces de hidrógeno.¹⁴

La unión del LPS a MD-2 y TLR4 conduce a la formación de un complejo hetero-oligomérico proteico que consiste en dos moléculas TLR4/MD-2 y las interacciones de las regiones extracelulares provocan la dimerización del dominio TIR presente en la región citosólica de los receptores TLR4, lo que favorece el reclutamiento de la proteína de diferenciación mieloide 88 (MyD88) y la activación de una red compleja de proteínas citoplasmáticas que dan lugar a la translocación de factores de transcripción como el factor nuclear κ B (NF- κ B),¹⁵ y el factor 3 regulador del interferón (IRF3).¹⁶ Todo esto provoca la expresión de múltiples genes relacionados con la expresión de citocinas pro-inflamatorias, quimiocinas y moléculas de activación, que conllevan a una fuerte respuesta inflamatoria y activación celular.

Una vez evocada la respuesta inflamatoria tras el reconocimiento del LPS, múltiples mecanismos

de regulación son activados con el fin de mantener la homeostasis y evitar una respuesta inflamatoria exacerbada. Uno de estos mecanismos es la regulación a nivel postranscripcional por micro RNAs (miRNA) como Mir146a, Mir155 y Mir132,¹⁷ que interfieren en la señalización, además otros miRNAs como MiRNA let 7¹⁸ disminuyen la maduración y el estado funcional de células dendríticas. Otro mecanismo de regulación es a nivel post-traducciona por moléculas antagonistas de la vía de señalización como la molécula supresora de las señales de citocinas (SOCS-1),¹⁹ el regulador negativo ST2 (ST2), la forma corta de MyD88 (MyD88s),²⁰ la proteína inhibidora de Toll (TOLLIP), la cinasa M asociada al receptor de IL-1 (IRAK-M)²¹ y la molécula relacionada al receptor de IL 1 (SIGIRR).²² El conocimiento de compuestos que interfieran en la señalización o que induzcan las moléculas regulatorias, podrían tener aplicaciones terapéuticas en los procesos inflamatorios.

Modificaciones estructurales en el lípido A del LPS bacteriano y su efecto en la respuesta inmunitaria del hospedero

Las bacterias han desarrollado numerosos factores de virulencia que les permiten sobrevivir y colonizar al hospedero, muchos de estos factores de virulencia juegan un papel muy importante en la modificación de la estructura de la membrana externa de la bacteria, al crear cambios estructurales en el lípido A del LPS.²³ Estos cambios son mediados por la expresión de enzimas que añaden o eliminan cadenas de acilo, grupos fosfato, o catalizan la adición de grupos químicos en los fosfatos. Gran parte de la investigación actual en este campo se ha centrado en la estimulación *in vitro* de los sistemas reguladores de dos componentes de *Salmonella*.²⁴ *In vitro*, las modificaciones del lípido A mediadas por los sistemas de dos componentes PhoP/PhoQ y PmrA/PmrB protegen a la bacteria contra la eliminación por CAMP y disminuyen las propiedades inflamatorias del LPS. A continuación se hablará con más en detalle de estos mecanismos centrándose principalmente en *Salmonella*.

Muchas de las propiedades que contribuyen a la supervivencia intracelular de *Salmonella* e inducción de macropinocitosis y fagosomas gigantes son controladas por el sistema regulador de dos componentes PhoP/PhoQ.^{25,26} PhoQ es una proteína integral de la membrana con actividad de histidina-cinasa que se activa *in vitro* en respuesta a la detección de pH bajo (pH 5.5) o bajas concentraciones (10 micromolar) de cationes divalentes tales como magnesio (Mg²⁺) o calcio (Ca²⁺), así como dentro del lumen del intestino delgado, el fagolisosoma del macrófago y la detección de los péptidos catiónicos antimicrobianos (CAMPs).^{27,28} La detección de estos factores por PhoQ provoca un cambio conformacional que resulta en la autofosforilación de PhoQ y la transferencia un fosfato a PhoP. El PhoP fosforilado se une a un promotor específico e induce o reprime la expresión de más de 40 genes llamados PhoP-activados (pags) y PhoP-reprimidos (prgs) respectivamente.^{29,30} Los genes PhoP-activados incluyen más de 10 proteínas de secreción, una proteína de membrana externa, una fosfatasa ácida inespecífica y transportadores para magnesio de alta afinidad.

Como se mencionó anteriormente, ciertos genes PhoP-activados juegan un papel importante en la modificación del lípido A del lipopolisacárido. Entre estas modificaciones tenemos la adición de 2-hidroxiimiristato por la beta-hidroxilasa LpxO,³¹ la desacilación en la posición 3 del lípido A por la 3-O-desacilasa de membrana externa PagL, lo cual afecta el reconocimiento de *Salmonella* por el TLR4 de las células huésped,^{32,33} la palmitoil transferasa de membrana externa PagP añade una cadena de palmitato al lípido A, lo que reduce la fluidez de membrana y por lo tanto ayuda en la resistencia a la entrada de CAMPs en la célula.³⁴

Estudios con cepas de *Salmonella typhimurium* resistentes a polimixina han mostrado que la modificación del lípido A requiere de un segundo sistema regulador de 2 componentes: PmrA/PmrB. La activación de PhoP/PhoQ incrementa la síntesis de PmrA/PmrB; estos regulan la expresión de pmrE, el cual codifica para UDP-glucosa deshidrogenasa (UGD).

La UGD y las enzimas codificadas en el operón *pmr*-HFIJKLM están involucradas en la producción de amino-arabinosa que al unirse al lípido A le confiere a la bacteria resistencia a péptidos catiónicos.

El sistema de dos componentes *PmrA/PmrB* también se puede activar directamente a través de la detección de pH bajo (pH 5.5) o altas concentraciones de hierro (Fe^{3+}). La detección de las señales ambientales da como resultado la autofosforilación de *PmrB* y la transferencia de fosfato para *PmrA*. La activación de *PmrA* media la adición covalente de amino-arabinosa y fosfato-etanolamina al lípido A y a la región de oligosacáridos del LPs de *Salmonella*, lo cual incrementa la resistencia a CAMP como polimixina, CAP-37 y CAP-57.³⁵⁻³⁷

Recientemente se reportó la comparación de los efectos *in vitro* e *in vivo* del LPS silvestre contra los LPS modificados estructuralmente por los sistemas de 2 componentes *PhoP/Q* y *PmrA/B* en *Salmonella*. En el caso del sistema *PhoP/Q*, el lípido A es modificado por la adición de un ácido graso extra, de tal forma que la estructura del lípido A de la forma silvestre que es hexacilado se transforma en un lípido A heptacilado. En el caso del modificado por el sistema *PmrA/B*, provoca que sobre de la estructura del lípido A silvestre se adicione grupos fosfato al lípido A y/o una o dos moléculas de aminoarabinosa, estas modificaciones cambian la carga de la molécula al bloquearse las cargas negativas de los grupos fosfato. En el trabajo se muestra que ambos LPS modificados estructuralmente provocan un efecto modulador sobre la respuesta inmune innata y adaptativa.

En un experimento *in vitro* se vio que macrófagos de ratón estimulados con los LPS modificados estructuralmente inducen menor cantidad de citocinas pro-inflamatorias, quimiocinas, respuesta quimiotáctica y producción de óxido nítrico.³⁸ En experimentos *in vivo* los LPS modificados estructuralmente indujeron una menor expresión de moléculas co-estimuladoras y moléculas MHC clase II en células dendríticas, lo que indicó que producen una menor activación de la respuesta inmune innata en comparación al LPS de las bacterias silvestres.

Los datos anteriores sugirieron que podrían tener un efecto también en la respuesta inmune adaptativa por lo cual se probó la capacidad adyuvante de estos LPS al administrarse en conjunto con diferentes antígenos y midiendo la respuesta de anticuerpos específicos contra los antígenos. Los resultados muestran que los títulos de anticuerpos específicos se vio disminuida al utilizar LPS modificados estructuralmente.³⁸ Al preguntar si esto era un efecto directo o mediado por los linfocitos T CD4, se encontró que las CPA estimuladas con los LPS modificados estructuralmente indujeron una menor proliferación de células T CD4 antígeno específicas en comparación al LPS silvestre. Estos resultados sugieren fuertemente que las modificaciones estructurales en el lípido A de los LPS tienen un efecto muy importante en las respuestas inmunitarias innata y adaptativa y pueden contribuir de manera importante en el proceso infeccioso, favoreciendo la evasión de la respuesta inmune por parte de la bacteria. Estos conocimientos abren la posibilidad de emplear a estas moléculas modificadas como inmunomoduladores de las respuestas inmunes al tener menor capacidad endotóxica e inflamatoria que el LPS silvestre pero manteniendo su actividad adyuvante.³⁸

Modificación del lípido A del lipopolisacárido en otras bacterias

Además de *Salmonella* muchas otras bacterias tienen la capacidad de modificar su lipopolisacárido. Aislados de lípido A de *Helicobacter pylori*, *Legionella pneumophila* y una variedad de patógenos humanos incluyendo *Yersinia pestis*, *Francisella spp.* y *Neisseria meningitidis* tienen porciones de lípido A que son pobremente reconocidos por el TLR4 humano. Estas especies de lípido A suelen estar constituidas de solo cuatro o cinco cadenas de acilo, algunas de las cuales son de 16-18 átomos de carbono de longitud. Parece probable que el potencial de estos patógenos para causar una enfermedad grave en seres humanos es atribuible, al menos en parte, a su relativa falta de señalización de TLR4.³⁹⁻⁴¹

Uso de las variantes del lípido A como adyuvantes: monofosforil lípido A (MPL)

Desde el descubrimiento del LPS como un potente inmunoestimulador, muchos estudios han demostrado su actividad adyuvante, sin embargo, su toxicidad inherente impide su uso como adyuvantes de vacunas. Debido a que la porción del lípido A del LPS era el responsable tanto de la capacidad adyuvante como de las propiedades tóxicas del LPS, en la década de 1970, Edgar Ribí et al. modificaron químicamente al LPS con el fin de determinar si sus propiedades inmunoestimulantes podrían ser separadas de sus efectos endotóxicos. Ribí finalmente creó un proceso hidrolítico en el que LPS de *Salmonella minnesota* R595 fue convertido en una mezcla de di-glucosaminas hexa-aciladas sin cadenas laterales de polisacárido y un grupo fosfato. La capacidad de toxicidad de esta nueva molécula disminuyó de 100 a 1000 veces sin afectar de forma apreciable su actividad inmunoestimulante. El derivado resultante, que tenía solo un grupo fosfato, se llamó monofosforil lípido A (MPL), el cual ha demostrado ser un adyuvante de vacuna seguro y eficaz.

Posteriormente muchos estudios se desarrollaron con el fin de evaluar el mecanismo de la baja toxicidad del MPL. Una razón podría ser que el MPL tenía simplemente muy baja afinidad por el receptor TLR4/MD2, pero un puñado de observaciones experimentales sugieren que el problema es más complejo. Las comparaciones entre MPL y LPS demostraron que el MPL tiene al menos algunas funciones que son de potencia similar a los de sus homólogos tóxicos. Salkowski et al. mostraron que MPL y LPS estimulan con igual eficiencia la generación de productos anti-inflamatorios tales como el receptor antagonista de IL-1 y recepto-

res de glucocorticoides en macrófagos de ratón.⁴² Mata-Haro et al. reportaron que la transcripción de IL-1 β que se induce por el MPL es tan eficientemente como la inducida por el lípido A o LPS sintético.¹⁶ Thompson et al. encontraron potencias similares de MPL y LPS en términos de efectos adyuvantes en las células T en un modelo de ratón y utilizaron la ovoalbúmina como antígeno, de hecho, en dosis altas, el MPL fue más potente que el LPS para impulsar la expansión clonal de las células T CD4⁺ que responden a la ovoalbúmina.⁴³ Por otro lado, las demostraciones de que MPL tiene una actividad más débil en relación con LPS también se han reportado. En un estudio Ismaili et al. encontraron muy poca producción de IL-12 por las células dendríticas humanas que responden a MPL en relación con el LPS.⁴⁴ Pero el hecho de que algunos resultados inmunes pueden ser inducidos con igual potencia por los dos compuestos indica que algo más complicado que una simple deficiencia en la fuerza de la señales sea la responsable. Es necesario considerar más detalladamente los eventos de señalización que siguen a la activación del TLR4.

El entendimiento de las causas de la enfermedad y de estrategias para curarla o prevenirla ha ocupado al ser humano a lo largo de la historia, del miasma, el contagión a la endotoxina y finalmente al LPS ha sido uno de los grandes ejemplos de esto. El esclarecimiento de los mecanismos moleculares y celulares involucrados en el reconocimiento del LPS y de sus variantes estructurales ha sido de suma importancia para entender el fenómeno inflamatorio y representa en la actualidad un campo muy importante de investigación para entender la respuesta inmune innata, la inflamación, la compleja relación hospedero-patógeno y para el desarrollo de nuevos inmunomoduladores y adyuvantes.

Referencias

1. Beutler B, Rietschel ET. Innate immune sensing and its roots: the story of endotoxin. *Nat Rev Immunol*. 2003;3(2):169-76.
2. Freudenberg MA, Merlin T, Gumenscheimer M, Kalis C, Landmann R, Galanos C. Role of lipopolysaccharide susceptibility in the innate immune response to *Salmonella typhimurium* infection: LPS, a primary target for recognition of Gram-negative bacteria. *Microbes Infect*. 2001;3(14-15):1213-1222.
3. Medzhitov R, Janeway C Jr. Jr. Innate immune recognition: mechanisms and pathways. *Immunol Rev*. 2000;173:89-97.
4. Kawahara K, Seydel U, Matsuura M, Danbara H, Rietschel ET, Zähringer U. Chemical structure of glycosphingolipids isolated from *Sphingomonas paucimobilis*. *FEBS Lett*. 1991;292(1-2):107-110.
5. Raetz CR, Whitfield C. Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu Rev Biochem*. 2002;71:635-700.
6. Molinaro A, Holst O, Di Lorenzo F, Callaghan M, Nurisso A, D'Errico G, et al. Chemistry of lipid A: at the heart of innate immunity. *Chemistry*. 2015;21(2):500-519. doi: 10.1002/chem.201403923.
7. Bainbridge BW, Karimi-Naser L, Reife R, Blethen F, Ernst RK, Darveau RP. Acyl chain specificity of the acyltransferases LpxA and LpxD and substrate availability contribute to lipid A fatty acid heterogeneity in *Porphyromonas gingivalis*. *J Bacteriol*. 2008;190(13):4549-4558.
8. Steimle A, Autenrieth IB, Frick JS. Structure and function: Lipid A modifications in commensals and pathogens. *Int J Med Microbiol*. 2016 Mar 5. pii: S1438-4221(16)30016-30019. doi: 10.1016/j.ijmm.2016.03.001.
9. Caroff M, Karibian D. Structure of bacterial lipopolysaccharides. *Carbohydr Res*. 2003;338(23):2431-47.
10. Tobias PS, Soldau K, Ulevitch RJ. Isolation of a lipopolysaccharide-binding acute phase reactant from rabbit serum. *J Exp Med*. 1986;164(3):777-793.
11. Wright SD, Ramos RA, Tobias PS, Ulevitch RJ, Mathison JC. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science*. 1990;249(4975):1431-1433.
12. Heppner G, Weiss DW. High susceptibility of strain a mice to endotoxin and endotoxin-red blood cell mixtures. *J Bacteriol*. 1965;90(3):696-703.
13. Shimazu R, Akashi S, Ogata H, Nagai Y, Fukudome K, Miyake K, Kimoto M. MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *J Exp Med*. 1999;189(11):1777-1782.
14. Jin MS, Lee JO. Structures of TLR-ligand complexes. *CCurr Opin Immunol*. 2008;20(4):414-419. doi: 10.1016/j.coi.2008.06.002.
15. Park BS, Song DH, Kim HM, Choi BS, Lee H, Lee JO. The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4-MD-2 complex. *Nature*. 2009;458(7242):1191-1195. doi: 10.1038/nature07830.
16. Mata-Haro V, Cekic C, Martin M, Chilton PM, Casella CR, Mitchell TC. The vaccine adjuvant monophosphoryl lipid A as a TRIF-biased agonist of TLR4. *Science*. 2007;316(5831):1628-1632.
17. Nahid MA, Satoh M, Chan EK. MicroRNA in TLR signaling and endotoxin tolerance. *Cell Mol Immunol*. 2011;8(5):388-403. doi: 10.1038/cmi.2011.26.
18. Zhang M, Liu F, Jia H, Zhang Q, Yin L, Liu W, et al. Inhibition of MicroRNA let-7i depresses maturation and functional state of dendritic cells in response to lipopolysaccharide stimulation via targeting suppressor of cytokine signaling 1. *J Immunol*. 2011;187(4):1674-1683. doi: 10.4049/jimmunol.1001937.
19. Nakagawa R, Naka T, Tsutsui H, Fujimoto M, Kimura A, Abe T, et al. SOCS-1 participates in negative regulation of LPS responses. *Immunity*. 2002;17(5):677-687.
20. Janssens S, Burns K, Tschopp J, Beyaert R. Regulation of interleukin-1- and lipopolysaccharide-induced NF-kappaB activation by alternative splicing of MyD88. *Curr Biol*. 2002;12(6):467-471.
21. Kobayashi K, Hernandez LD, Galán JE, Janeway CA Jr, Medzhitov R, Flavell RA. IRAK-M is a negative regulator of Toll-like receptor signaling. *Cell*. 2002;110(2):191-202.
22. Wald D, Qin J, Zhao Z, Qian Y, Naramura M, Tian L, et al. SIGIRR, a negative regulator of Toll-like receptor-interleukin 1 receptor signaling. *Nat Immunol*. 2003;4(9):920-927.
23. Gunn JS, Lim KB, Krueger J, Kim K, Guo L, Hackett M, et al. PmrA-PmrB-regulated genes necessary for 4-aminoarabinose lipid A modification and polymyxin resistance. *Mol Microbiol*. 1998;27(6):1171-1182.
24. Gunn JS. The *Salmonella* PmrAB regulon: lipopolysaccharide modifications, antimicrobial peptide resistance and more. *Trends Microbiol*. 2008;16(6):284-290. doi: 10.1016/j.tim.2008.03.007.

25. Linehan SA, Holden DW. The interplay between *Salmonella typhimurium* and its macrophage host--what can it teach us about innate immunity? *Immunol Lett.* 2003;85(2):183-192.
26. Eriksson S, Lucchini S, Thompson A, Rhen M, Hinton JC. Unravelling the biology of macrophage infection by gene expression profiling of intracellular *Salmonella enterica*. *Mol Microbiol.* 2003;47(1):103-118.
27. Alpuche Aranda CM¹, Swanson JA, Loomis WP, Miller SI. *Salmonella typhimurium* activates virulence gene transcription within acidified macrophage phagosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992;89(21):10079-10083.
28. Miller SI, Kukral AM, Mekalanos JJ. A two-component regulatory system (phoP phoQ) controls *Salmonella typhimurium* virulence. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989;86(13):5054-5058.
29. Gunn JS, Hohmann EL, Miller SI. Transcriptional regulation of *Salmonella* virulence: a PhoQ periplasmic domain mutation results in increased net phosphotransfer to PhoP. *J Bacteriol.* 1996;178(21):6369-6373.
30. Guo L, Lim KB, Gunn JS, Bainbridge B, Darveau RP, Hackett M, et al. Regulation of lipid A modifications by *Salmonella typhimurium* virulence genes phoP-phoQ. *Science.* 1997;276(5310):250-253.
31. Gibbons HS, Lin S, Cotter RJ, Raetz CR. Oxygen requirement for the biosynthesis of the S-2-hydroxymyristate moiety in *Salmonella typhimurium* lipid A. Function of LpxO, A new Fe²⁺/alpha-ketoglutarate-dependent dioxygenase homologue. *J Biol Chem.* 2000;275(42):32940-32949.
32. Kawasaki K, Ernst RK, Miller SI. 3-O-deacylation of lipid A by PagL, a PhoP/PhoQ-regulated deacylase of *Salmonella typhimurium*, modulates signaling through Toll-like receptor 4. *J Biol Chem.* 2004;279(19):20044-20048.
33. Trent MS, Pabich W, Raetz CR, Miller SI. A PhoP/PhoQ-induced Lipase (PagL) that catalyzes 3-O-deacylation of lipid A precursors in membranes of *Salmonella typhimurium*. *J Biol Chem.* 2001;276(12):9083-9092.
34. Guo L, Lim KB, Poduje CM, Daniel M, Gunn JS, Hackett M, et al. Lipid A acylation and bacterial resistance against vertebrate antimicrobial peptides. *Cell.* 1998;95(2):189-198.
35. Shafer WM, Martin LE, Spitznagel JK. Cationic antimicrobial proteins isolated from human neutrophil granulocytes in the presence of diisopropyl fluorophosphate. *Infect Immun.* 1984;45(1):29-35.
36. Roland KL, Martin LE, Esther CR, Spitznagel JK. Spontaneous pmrA mutants of *Salmonella typhimurium* LT2 define a new two-component regulatory system with a possible role in virulence. *J Bacteriol.* 1993;175(13):4154-4164.
37. Gunn JS, Miller SI. PhoP-PhoQ activates transcription of pmrAB, encoding a two-component regulatory system involved in *Salmonella typhimurium* antimicrobial peptide resistance. *J Bacteriol.* 1996;178(23):6857-64.
38. Pastelin-Palacios R, Gil-Cruz C, Pérez-Shibayama CI, Moreno-Eutimio MA, Cervantes-Barragán L, Arriaga-Pizano L, et al. Subversion of innate and adaptive immune activation induced by structurally modified lipopolysaccharide from *Salmonella typhimurium*. *Immunology.* 2011;133(4):469-81. doi: 10.1111/j.1365-2567.2011.03459.x.
39. Kawahara K, Tsukano H, Watanabe H, Lindner B, Matsuura M. Modification of the structure and activity of lipid A in *Yersinia pestis* lipopolysaccharide by growth temperature. *Infect Immun.* 2002;70(8):4092-4098.
40. Vinogradov E, Perry MB, Conlan JW. Structural analysis of *Francisella tularensis* lipopolysaccharide. *Eur J Biochem.* 2002;269(24):6112-6118.
41. Phillips NJ, Schilling B, McLendon MK, Apicella MA, Gibson BW. Novel modification of lipid A of *Francisella tularensis*. *Infect Immun.* 2004;72(9):5340-5348.
42. Salkowski CA, Detore GR, Vogel SN. Lipopolysaccharide and monophosphoryl lipid A differentially regulate interleukin-12, gamma interferon, and interleukin-10 mRNA production in murine macrophages. *Infect Immun.* 1997;65(8):3239-47. 43.
43. Thompson BS, Chilton PM, Ward JR, Evans JT, Mitchell TC. The low-toxicity versions of LPS, MPL adjuvant and RC529, are efficient adjuvants for CD4+ T cells. *J Leukoc Biol.* 2005;78(6):1273-1280.
44. Ismaili J, Rennesson J, Aksoy E, Vekemans J, Vincart B, Amraoui Z, et al. Monophosphoryl lipid A activates both human dendritic cells and T cells. *J Immunol.* 2002;168(2):926-932.