

Inflamación y conducta inducidas por la administración intraperitoneal de lipopolisacárido en un modelo murino

TAPIA-SANSORES M., RESÉNDIZ-MELÉNDEZ I. I., MUNGUÍA-CONTRERAS M. A., MORÁN-ALVARADO H., DEL MORAL-DÍEZ J. J.

Resumen. La sepsis es una respuesta inflamatoria sistémica asociada a un agente infeccioso. Representa hasta el 50% de los ingresos a las unidades de terapia intensiva y constituye un importante problema de salud pública. Las bacterias gram-negativas son una frecuente causa de sepsis; poseen una endotoxina llamada lipopolisacárido la cual es un potente inductor de la respuesta inflamatoria, y por lo tanto permite observar la activación de células de la respuesta inmune, así como la liberación de citocinas proinflamatorias. **Materiales y Métodos:** se utilizaron ratones machos CD1 que recibieron inoculación intraperitoneal de lipopolisacárido (n=8), solución salina isotónica (n=9) o no recibieron tratamiento (n=8). Se evaluaron variables de actividad conductual; concentración de las citocinas TNF α , IL-1 β e IL-6 en suero y extracto de bazo y cerebro, mediante ELISA tipo sándwich; y activación en sistema nervioso central por inmunofluorescencia. **Resultados:** A las tres horas de la inoculación, observamos disminución en la actividad del grupo LPS en comparación con los otros grupos experimentales. Cuantificamos concentraciones en suero y extractos de bazo y cerebro, donde se advirtió la elevación TNF α en suero, IL-1 β en bazo e IL-6 en cerebro. En SNC observamos activación de astrocitos en giro dentado del hipocampo de los ratones del grupo LPS. **Conclusiones:** En este modelo experimental, la inoculación de LPS desencadenó cambios conductuales y una respuesta inflamatoria sistémica y central con la consecuente elevación de TNF- α , IL-1 β e IL-6 y activación de astrocitos.

I. INTRODUCCIÓN

La sepsis es una respuesta inflamatoria sistémica asociada a un agente infeccioso. Su etiología puede variar en microorganismos gram-positivos y gram-negativos, en la zona geográfica de cada centro de atención a la salud, y en la edad y características de cada paciente. Representa hasta el 50% de los ingresos a las unidades de terapia intensiva (UTI) y es un problema importante de salud pública por su alto grado de morbi-mortalidad y los altos costos que representa para los

sistemas de salud en todo el mundo [1]. En México, se reportó una incidencia de 40,957 casos de sepsis en el año 2009, y una tasa de incidencia de 40 casos por cada 100,000 habitantes, mientras que la mortalidad es de 30% y los costos de atención ascienden de \$600,000 a \$1,870,000 MN, lo que muestra la repercusión de la sepsis en nuestro país [1, 2].

Las bacterias gram-negativas son una frecuente causa de sepsis; poseen una pared celular que contiene dos capas situadas en el exterior de la membrana citoplasmática. La zona externa de esta membrana está formada fundamentalmente por una endotoxina denominada lipopolisacárido (LPS) [3, 4]. El LPS es considerado un tipo de patrón molecular asociado a patógenos (PAMP), cuyo subdominio "Lípido A" es reconocido en el huésped, por receptores tipo toll (TLR) en la membrana de las células de la respuesta inmune innata, activando a macrófagos, células dendríticas, células endoteliales y linfocitos B, induciendo la liberación de moléculas como factor de necrosis tumoral α (TNF α), interleucina-1 β (IL-1 β), interleucina-6 (IL-6), y otros factores inmunitarios que desencadenan respuestas inflamatorias [4]. En algunas situaciones esta respuesta es excesiva y descompensada, lo cual puede poner en peligro la vida.

Dentro de las citocinas proinflamatorias que son inducidas por LPS, TNF α es de las primeras en liberarse y parece ser de vital importancia en la sepsis por su alto potencial de lesión tisular; además, induce la producción de agentes vasodilatadores como el óxido nítrico (NO) y prostaglandina E2 (PGE2), mediante la activación de las enzimas óxido nítrico sintasa (iNOS) y ciclooxigenasa 2 (COX-2), esto produce la migración de neutrófilos al sitio de infección al estimular la adhesión de leucocitos al endotelio vascular. El LPS, en combinación con el TNF α promueven la apoptosis del endotelio en diversos órganos [4, 5].

La respuesta inflamatoria del huésped es directamente proporcional a la concentración de LPS en suero, quien combinado con TNF α e IL-1 β , pueden producir hipotensión y choque, pérdida de la barrera endotelial y coagulación intravascular diseminada (CID) como consecuencia de la activación de las vías de coagulación de la sangre [4, 5].

Las manifestaciones clínicas de la sepsis varían dependiendo del sitio inicial de infección, la etiología, el

TAPIA-SANSORES M., RESÉNDIZ-MELÉNDEZ I. I., MUNGUÍA-CONTRERAS M. A., MORÁN-ALVARADO H., y DEL MORAL-DÍEZ J. J. pertenecen a la carrera de MÉDICO CIRUJANO de la Facultad Mexicana de Medicina y realizaron el proyecto dentro del TALLER DE INICIACIÓN A LA INVESTIGACIÓN (Email: migueltapiasansores@hotmail.com).

El proyecto fue asesorado por la Dra. DULCE MARÍA MENESES RUIZ, investigadora de la Unidad de Investigación de la Facultad Mexicana de Medicina de la Universidad La Salle y la Dra. GABRIELA MENESES RUIZ del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM.

patrón de disfunción orgánica y el estado de salud subyacente del paciente. Entre los síntomas más frecuentes, se encuentran: alteración del estado de conciencia, inestabilidad hemodinámica (arritmias e hipotensión), alteraciones respiratorias (taquipnea e hipoxia), oliguria, fiebre, leucocitosis, elevación del lactato, y elevación de enzimas hepáticas séricas; que de no ser resultas, progresan el cuadro a disfunción orgánica múltiple [5].

El equilibrio entre las respuestas proinflamatorias y antiinflamatorias está mediado por diversos factores extrínsecos e intrínsecos al organismo. De igual manera influyen tanto la carga y virulencia del organismo patógeno, como la presencia de PAMPs. Por otro lado, la edad, ambiente, genética y patologías subyacentes del hospedador también repercuten en el desarrollo de la sepsis [5].

Actualmente existe evidencia que la activación del sistema inmune periférico puede producir un proceso inflamatorio en sistema nervioso central (SNC). La edad es un factor que parece intervenir, siendo que, a mayor edad, es mayor la exacerbación de esta respuesta en SNC [6]. Los mecanismos por los cuales se activa esta respuesta en SNC no han sido del todo explicados, pero esto abre una puerta en entender la fisiopatología de enfermedades neurodegenerativas en donde se ha evidenciado un proceso neuroinflamatorio asociado, que no se sabe si es causa o efecto de estos padecimientos, como son el trastorno depresivo mayor, esclerosis múltiple, enfermedad de Alzheimer y Parkinson, entre otros [6, 7, 8].

El objetivo de este trabajo, que se desarrolló como actividad del Primer Taller de Investigación de la FMM-ULSA, en enero 2016, fue estudiar la respuesta inflamatoria producida por una dosis sub-letal de LPS en ratones CD1, y su efecto en la conducta, la producción de citocinas proinflamatorias y la activación de astrocitos en SNC con el fin de detallar el mecanismo fisiopatológico de la sepsis.

II. JUSTIFICACIÓN

La sepsis es una de las enfermedades intrahospitalarias más frecuentes en México, lo que demuestra su relevancia en materia de salud pública con un alto número de pacientes que se ven afectados ya sea por el mismo cuadro séptico, o por las secuelas ocasionadas. Es clave por lo anterior, analizar a fondo los mecanismos fisiopatológicos que se llevan a cabo en un organismo durante el proceso inflamatorio sistémico.

III. CONCEPTOS BÁSICOS

Las definiciones de los conceptos básicos a conocer se presentan en el cuadro I [9].

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

Animales y Tratamientos

Para este trabajo se utilizaron 25 ratones machos de una cepa exogámica CD1 entre 6 y 8 semanas de vida obtenidos del

CUADRO I
DEFINICIÓN DE CONCEPTOS BÁSICOS

	Definición
Sepsis	Una complicación severa de infecciones bacterianas que se caracteriza por colapso vascular, coagulación intravascular diseminada y alteraciones metabólicas.
LPS	Endotoxina. Un componente de la pared celular de las bacterias gram negativas, que se libera cuando la bacteria está muriendo y estimula la respuesta inflamatoria inmune mediante su unión al TLR4.
Citocina	Proteínas que son producidas y secretadas por muchos tipos celulares, que median la reacción inflamatoria e inmune; son los principales mediadores de la comunicación entre células inmunitarias.
Inflamación	Reacción compleja del tejido vascularizado en respuesta a la infección o daño celular primario que involucra acumulación extravascular de proteínas plasmáticas y leucocitos. Tiene una función protectora y promueve la reparación tisular posterior.
Respuesta inmune	Respuesta colectiva y coordinada a la introducción de sustancias ajenas en un individuo. Está mediada por células y moléculas pertenecientes al sistema inmune.
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay.</i> Método para cuantificar antígenos inmovilizados en una superficie sólida utilizando un anticuerpo específico con una enzima acoplada covalentemente.
Interleucina (IL)	Cualquiera de un gran número de citocinas cuyo nombre incluye un sufijo numérico o caracterización molecular. Algunas fueron nombradas según su actividad biológica.
Receptor TLR	Una familia de receptores de reconocimiento de patrones de la inmunidad innata que están expresadas en la superficie celular y en endosomas de muchos tipos celulares que reconocen estructuras microbianas.
Inmunofluorescencia	Técnica para detectar la presencia de un antígeno en tejidos utilizando anticuerpos acoplados a marcadores fluorescentes específicos para el antígeno. Es una técnica de rutina utilizada en patología diagnóstica y en investigación.

bioterio de la FMM-ULSA, siguiendo las guías establecidas por el comité institucional para el cuidado y uso de animales de experimentación. Se dividieron en tres grupos experimentales al azar: sin tratamiento (ST), solución salina isotónica (SSI) y tratamiento con lipopolisacárido (LPS) con 8, 9 y 8 ratones en cada grupo, respectivamente. El grupo ST no recibió tratamiento alguno; el grupo SSI recibió 200µL de solución salina vía intraperitoneal (ip); y al grupo LPS se le administró la dosis de 5mg/kg de LPS de *Escherichia coli* serotipo 0111:B4 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) diluidos en 200µL de solución salina ip.

El experimento se dividió en dos tiempos: t1, en el que se evaluó la actividad conductual de cada ratón previo a la administración de su respectivo tratamiento; y t2, tres horas después de la administración de su respectivo tratamiento, se volvió a evaluar la actividad conductual. Se sacrificó a todos los roedores por la técnica de dislocación cervical, seguido del procesamiento de tejidos y órganos para la determinación de

concentraciones de citocinas y activación de células gliales en SNC.

Actividad Conductual

Para evaluar la conducta de los ratones se utilizaron bandejas, cuya base se dividió en nueve cuadrantes, dejando a los ratones desplazarse libremente y observándolos durante 2 minutos. Cada ratón debía cruzar cualquiera de las líneas con las cuatro extremidades para acreditar un desplazamiento completo. Se realizó la prueba antes y después del respectivo tratamiento, se contó el total de desplazamientos completos de cada ratón y se obtuvo media y desviación estándar (SD) de cada grupo experimental.

Concentración de Citocinas

La concentración de TNF α , IL-1 β e IL-6 se obtuvo mediante ELISA de tipo sándwich en suero, bazo y cerebro. Las muestras se obtuvieron mediante homogenización de tejidos (bazo y cerebro) en un buffer de lisis (50 mM HEPES, 150 mM NaCl, 1% Nonidet-p40, 0.5% desoxicolato de sodio, 0.1% SDS) que contenía inhibidores de las proteasas (Roche, IN). Una vez realizado esto, las muestras fueron centrifugadas a 16,000 x g durante 15 minutos a 4 °C. Los sobrenadantes fueron utilizados para análisis. La cantidad total de proteínas en el extracto soluble fueron cuantificadas mediante el método de Lowry. Para la obtención de suero, se obtuvo la sangre por punción retroocular con capilares y centrifugación de la muestra. Tanto el suero como los extractos proteicos se almacenaron a -20°C hasta su uso. Se realizaron ELISAs de acuerdo a las instrucciones del kit comercial Biolegend ELISA MAX® (San Diego, CA) en 96 "MaxiSorp microtiter plates" (Nunc, Rockslide, Denmark).

Los microplatos se prepararon 18 hrs antes a 4° C con el anticuerpo de captura. Después de lavar con PBS-Tween-20 (0.05%) y bloquear por 60 min a temperatura ambiente con PBS-BSA 2%, los sueros y extractos fueron incubados a temperatura ambiente por 2 hrs con la solución estándar, se lavaron tres veces y se incubaron durante una hora a temperatura ambiente con el anticuerpo de detección. Se colocaron 100 μ L de suero y extractos por pozo de cada placa y por triplicado para cada citocina. La detección de antígenos se llevó a cabo utilizando una dilución 1:1000 Avidina-HRP y TMB como sustrato. La densidad óptica fue leída antes y después de que la reacción fuera detenida con H₂SO₄ 2N a 450 y 630 nm respectivamente. Los resultados fueron expresados en pg/mL por mg de proteína de su respectivo extracto soluble. De los datos analizados se obtuvo media y SD de cada grupo.

Inmunofluorescencia

Para observar la actividad inflamatoria en SNC se obtuvieron muestras histológicas de cerebro a nivel de hipocampo y giro dentado. Los cerebros fueron fijados y después criopreservados en soluciones crecientes de sacarosa (10, 20 y 30%). Se realizaron cortes de 30 μ m de grosor y se incubó en solución buffer de citratos (0.01M ácido cítrico,

0.05% Tween 20, pH 6.0) a una temperatura de 70°C durante 50 min.

Las muestras fueron lavadas 4 veces con solución TBS y bloqueadas con solución de albúmina libre de IgG al 2%. Se identificaron astrocitos [10, 11] marcados con anticuerpos rabbit anti-GFAP (anticuerpos para proteína fibrilar ácida de la glía, GFAP por sus siglas en inglés) (Invitrogen®) en solución TBS-2% BSA. Posteriormente, se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con Alexa Fluor® 594 goat anti-rabbit IgG (Molecular Probes, OR) diluido en solución TBS-2% BSA. Se tiñeron núcleos con DAPI y se observaron en microscopio de fluorescencia, modelo Olympus DP71 (Nikon Instruments Inc., NY).

V. RESULTADOS

Efecto de la inoculación sistémica de LPS en la conducta

Posterior al tratamiento, no se observaron diferencias significativas en el promedio de desplazamientos entre el t1 y t2 de los grupos ST y SSI. Sin embargo, sí se encontró diferencia significativa entre el grupo LPS y los grupos ST y SSI posterior al tratamiento. ($p < 0.0001$) (Fig. 1).

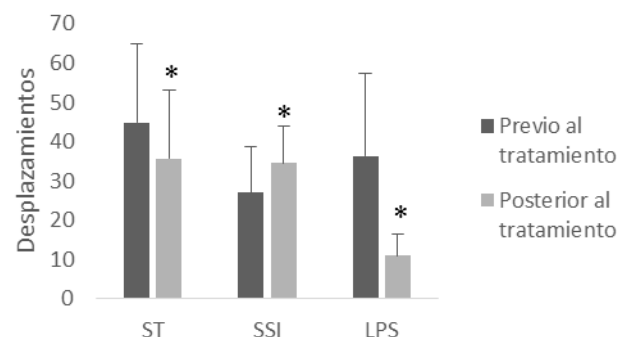


Figura 1. Promedio de desplazamientos previos y posteriores al tratamiento. Prueba estadística utilizada: Tstudent $*p = .01$ comparando el promedio de desplazamientos en el grupo LPS. Tstudent comparando los desplazamientos en LPS vs ST y SSI $p < .01$.

Concentración de citocinas en compartimentos corporales tras la inoculación sistémica de LPS

Se observó incremento de TNF α en suero y bazo en el grupo LPS en comparación con los grupos ST y SSI ($p < 0.01$). No se encontró diferencia significativa entre los grupos SSI y ST. (Fig. 2). Se observó de igual manera un incremento de TNF α en los ratones tratados con LPS, presentando diferencia estadística significativa, al compararlos con los otros grupos experimentales ST y SSI.

IL-1 β se expresó en todos los órganos, encontrándose particularmente elevada en el bazo de los ratones del grupo LPS. A pesar de que la diferencia no es significativa, es evidente su incremento con respecto a los grupos ST y SSI (Fig. 3).

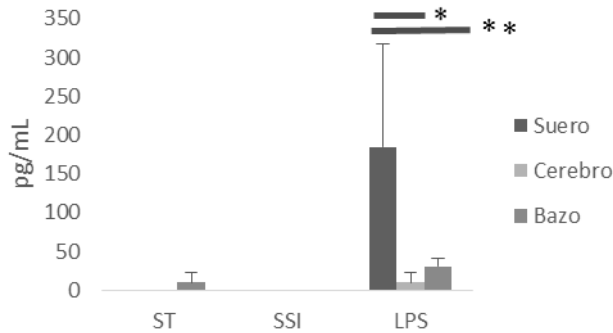


Figura 2. Concentración promedio de TNFα en suero, cerebro y bazo en los tres grupos experimentales. Prueba estadística utilizada: ANOVA *p <.05 comparando TNFα en sangre. **p <.05 comparando TNFα en bazo. TNFα en LPS vs ST y SSI p<.01.

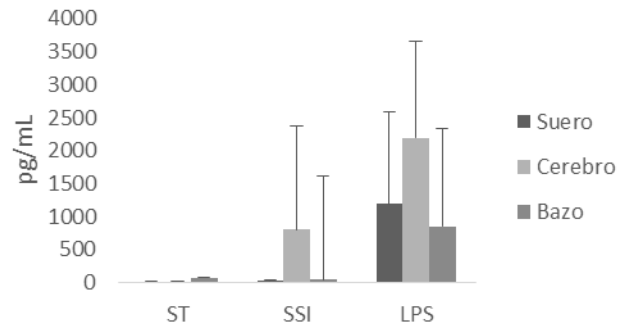


Figura 4. Concentración promedio de IL-6 en suero, cerebro y bazo en los grupos experimentales. Prueba estadística utilizada: ANOVA sin diferencia significativa comparando IL-6 en LPS vs ST y SSI.

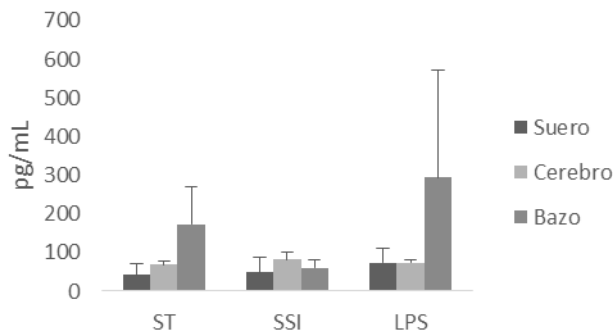


Figura 3. Concentración promedio de IL-1β en suero, cerebro y bazo en los grupos experimentales. Prueba estadística utilizada: ANOVA sin diferencia significativa comparando IL-1β en LPS vs

IL-6 se elevó en todos los órganos y tejidos en el grupo LPS con una mayor elevación en SNC, y con una segunda elevación importante en suero, comparado con los grupos ST y SSI (Fig. 4).

Microscopia con Inmunofluorescencia de SNC

Por microscopía fue posible apreciar la activación de astrocitos a nivel del giro dentado e hipocampo en el grupo LPS, en comparación con grupo ST. El grupo control se obtuvo de otro estudio experimental con metodología idéntica debido a problemas durante la manipulación de las muestras (Fig. 5).

VI. DISCUSIÓN

La inoculación de LPS en ratones simula un estado parecido al de la sepsis en humanos, en el cual se encuentran concentraciones elevadas de citocinas como TNFα, IL-1β e IL-6, alterando funciones orgánicas y conductuales [4, 8]. En las pruebas de actividad conductual se observó una disminución de la actividad de los ratones del grupo LPS en el t2, así como cambios en la apariencia, tales como piloerección, palidez de tegumentos, temblor e hipoactividad, coincidiendo con los resultados de otros modelos experimentales [4, 7]. Existe evidencia de la elevación de IL-6

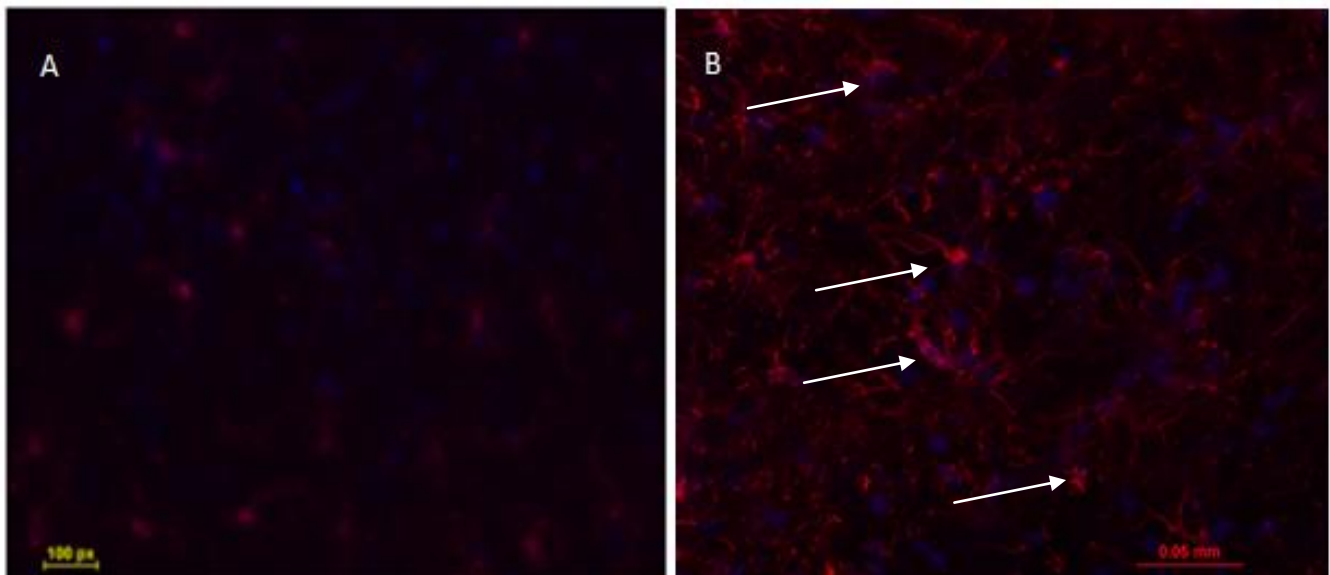


Figura 5. Inmunofluorescencia para identificación de GFAP en hipocampo. A. Grupo ST B. Grupo LPS; Activación de astrocitos en el grupo LPS marcados con anti GFAP, denotando el cambio de morfología. Las flechas marcan la activación de astrocitos.

e IL-1 β en modelos de infecciones agudas y crónicas como cáncer, enfermedades reumáticas, y el trastorno depresivo mayor, haciendo que se observe una hipoactividad marcada en los roedores, lo que coincide con nuestros resultados [8, 12, 13].

La elevación de las citocinas evaluadas nos brinda evidencia de que la administración de LPS activa una respuesta inflamatoria sistémica. En modelos experimentales parecidos a éste, se ha encontrado que en cultivos de células de bazo aumenta la producción de IL-1 β , en comparación con cultivos no estimulados con LPS [12, 14, 15]. Por otra parte, se ha evidenciado el papel que tiene IL-6 en el desarrollo de neuroinflamación y su posible progresión hacia enfermedades crónico-degenerativas [13, 15, 16], siendo ésta la más abundante en nuestro modelo; lo anterior correlaciona con observaciones de otros autores en donde el aumento de IL-1 β puede aumentar la producción de IL-6 por parte de células de la microglía y astrocitos, siendo predominante en las primeras [15, 17, 18]. Esto puede apoyar la teoría de que procesos inflamatorios sistémicos pueden inducir respuestas locales en SNC siendo un puente importante a la neuroinflamación, sin embargo, los mecanismos por los que las citocinas como IL-1 β estimulan a las células de la microglía no son claros todavía.

El incremento de TNF α en suero a las 3 horas, en nuestro trabajo, correlaciona con el conocimiento de que, en la sepsis, es la primera citocina que se eleva a nivel sérico. De igual manera, se ha visto que TNF α tiene una importancia crítica durante el choque endotóxico causando daño tisular junto con otras citocinas proinflamatorias como IL-1, IL-6 e IL-8 [5].

En la observación de células gliales por inmunofluorescencia encontramos una activación importante de astrocitos, con lo que se apoya la idea de que en modelos de inflamación sistémica la respuesta se extiende incluso a sitios privilegiados del sistema inmunológico, ocasionando así una respuesta inflamatoria sincrónica en SNC [6, 7, 12].

VII. CONCLUSIONES

La inoculación intraperitoneal de LPS desencadenó en los ratones cambios conductuales y una respuesta inflamatoria sistémica. TNF α fue la citocina con mayor elevación en suero, coincidiendo así con la historia natural del síndrome. De igual manera, la inoculación sistémica de LPS promovió la síntesis de IL-6 de manera importante en SNC, por lo que las concentraciones de esta citocina podrían asociarse con las alteraciones en la actividad conductual observadas.

REFERENCIAS

- [1] J. F. Martín-Ramírez *et al*, "Sepsis," *Med. Int. Méx.*, vol. 30, no. 2, pp. 159-175, 2014.
- [2] R. Carrillo-Esper *et al*, "Estudio epidemiológico de la sepsis en unidades de terapia intensiva mexicanas," *Cir. Cir.*, vol. 77, no. 4, pp. 301-308, 2009.
- [3] P. Murray *et al*, *Microbiología médica*, 7^a ed. España: Elsevier Saunders, 2013.

- [4] G. Ramachandran, "Gram-positive and gram-negative bacterial toxins in sepsis, a brief review," *Virulence*, vol. 3, no. 1, pp. 213-218, 2014.
- [5] S. Finfer y J. L. Vincent, "Severe sepsis and septic shock," *N. Engl. J. Med.*, vol. 369, no. 9, pp. 840-851, 2013.
- [6] L. Yao *et al*, "Toll-like receptor 4 mediates microglial activation and production of inflammatory mediators in neonatal rat brain following hypoxia: role of TLR4 in hypoxic microglia," *J. Neuroinflammation*, vol. 10, no. 23, pp. 1-21, 2013.
- [7] S. J. Sukoff-Rizzo *et al*, "Evidence for sustained elevation of IL-6 in the CNS as a key contributor of depressive-like phenotypes," *Transl. Psychiatry*, vol. 199, no. 2, pp. 1-12, 2012.
- [8] S. M. Ye y R. Johnson, "Increased interleukin-6 expression by microglia from brain of aged mice," *J. Neuroimmunol.*, vol. 93, pp. 139-148, 1998.
- [9] A. Abbas *et al*, *Cellular and molecular immunology*, 8^a ed. España: Elsevier Saunders, 2015.
- [10] J. Middeldorp, "GFAP in health and disease," *Prog. Neurobiol.*, vol. 93, pp. 421-443, 2011.
- [11] H. Baba *et al*, "GFAP gene expression during development of astrocyte," *Dev. Neurosci.*, vol. 19, pp. 49-57, 1996.
- [12] D. T. Skelly *et al*, "A systematic analysis of the peripheral and CNS effects of Systemic LPS, IL-1B, TNF- α and IL-6 challenges in C57BL/6 mice," *PLoS One*, vol. 8, no. 7, pp. 1-20, 2013.
- [13] R. Dantzer *et al*, "From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain," *Nat. Rev. Neurosci.*, vol. 9, pp. 46-57, 2008.
- [14] G. E. Hodes *et al*, "Integrating interleukin-6 into depression diagnosis and treatment," *Neurobiol. Stress*, vol. 6, pp. 1-8, 2016.
- [15] R. Haapakoski *et al*, "Cumulative meta-analysis of interleukins 6 and 1 β , tumour necrosis factor α and C-reactive protein in patients with major depressive disorder," *Brain Behav. Immun.*, vol. 49, pp. 206-215, 2015.
- [16] C. Dinarello, "Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family," *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 27, pp. 519-550, 2009.
- [17] Z. Kollárova *et al*, "Production of IL-1 β and IL-6 by adherent spleen cells after the stimulation with lipopolysaccharides from salmonella enteritidis strain," *Immunopharmacol. Immunotoxicol.*, vol. 18, no. 3, pp. 433-441, 1996.
- [18] C. Hunter y S. Jones, "IL-6 as a keystone cytokine in health and disease," *Nat. Immunol.*, vol. 16, no. 5, pp. 448-457, 2015.