

# ÁCIDO LIPOTEICOICO: RECEPTORES Y MECANISMO DE TRANSDUCCIÓN\*

Gloria Gutiérrez-Venegas y Patricia Cardoso-Jiménez

## RESUMEN

Las infecciones bacterianas se caracterizan por las reacciones inflamatorias del hospedero a los agentes patógenos. Una posible explicación a este evento es la secreción de citocinas proinflamatorias por parte de las células del hospedero como respuesta a los componentes de la pared celular de bacterias Gram-positivas, en particular al ácido lipoteicoico (ALT). Durante las infecciones bacterianas, las células del hospedero reconocen al ALT a través de dos receptores: CD14 y el receptor tipo Toll 2 (TLR2). La unión del ALT al receptor TLR2 induce la activación de mecanismos de transducción y la secreción de citocinas como la interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), la interleucina-6 (IL-6) y el factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ).

Como importancia clínica señalamos que el aumento en la incidencia de muertes por sepsis y choque séptico ocasionado por bacterias Gram-positivas, las cuales contienen ALT. El ALT al ser liberado por la bacteria promueve el daño de órganos. En esta revisión se describen los receptores del hospedero a los que se asocia ALT y los mecanismos de transducción involucrados en la expresión de citocinas proinflamatorias.

**PALABRAS CLAVE:** Bacterias Gram-positivas, ácido lipoteicoico, receptor tipo Toll.

## ABSTRACT

Bacterial infections are characterized by certain inflammatory reactions of the host by pathogens. A possible explanation for these findings is the secretion of proinflammatory cytokines by host cells triggered by cell wall components released from the bacteria. These responses have been demonstrated by the lipoteichoic acid (LTA) of Gram-positive bacteria. During bacterial infection, the cells recognize the cell wall components through two distinct receptors, CD14 and Toll like-receptor 2 (TLR2). The recognition and binding between TLR2 receptor and LTA induced activation of signaling transduction pathways that lead to the secretion of proinflammatory cytokines, including IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$  from macrophages. LTA can be considered a virulence factor that has an important role in infections caused by Gram-positive bacteria. With regard to clinical significance, these infections cause sepsis and death associated to septic shock in the presence of Gram-positive bacteria, which contain LTA, toxic molecules that are released by the bacteria and become primary factors in organ damage and in infectious disease etiology. In this review, we describe LTA-associated host receptors and the transduction mechanisms involved in proinflammatory cytokine expression.

**KEY WORDS:** Gram-positive bacteria, lipoteichoic acid, TLR receptors, cytokines.

## INTRODUCCIÓN

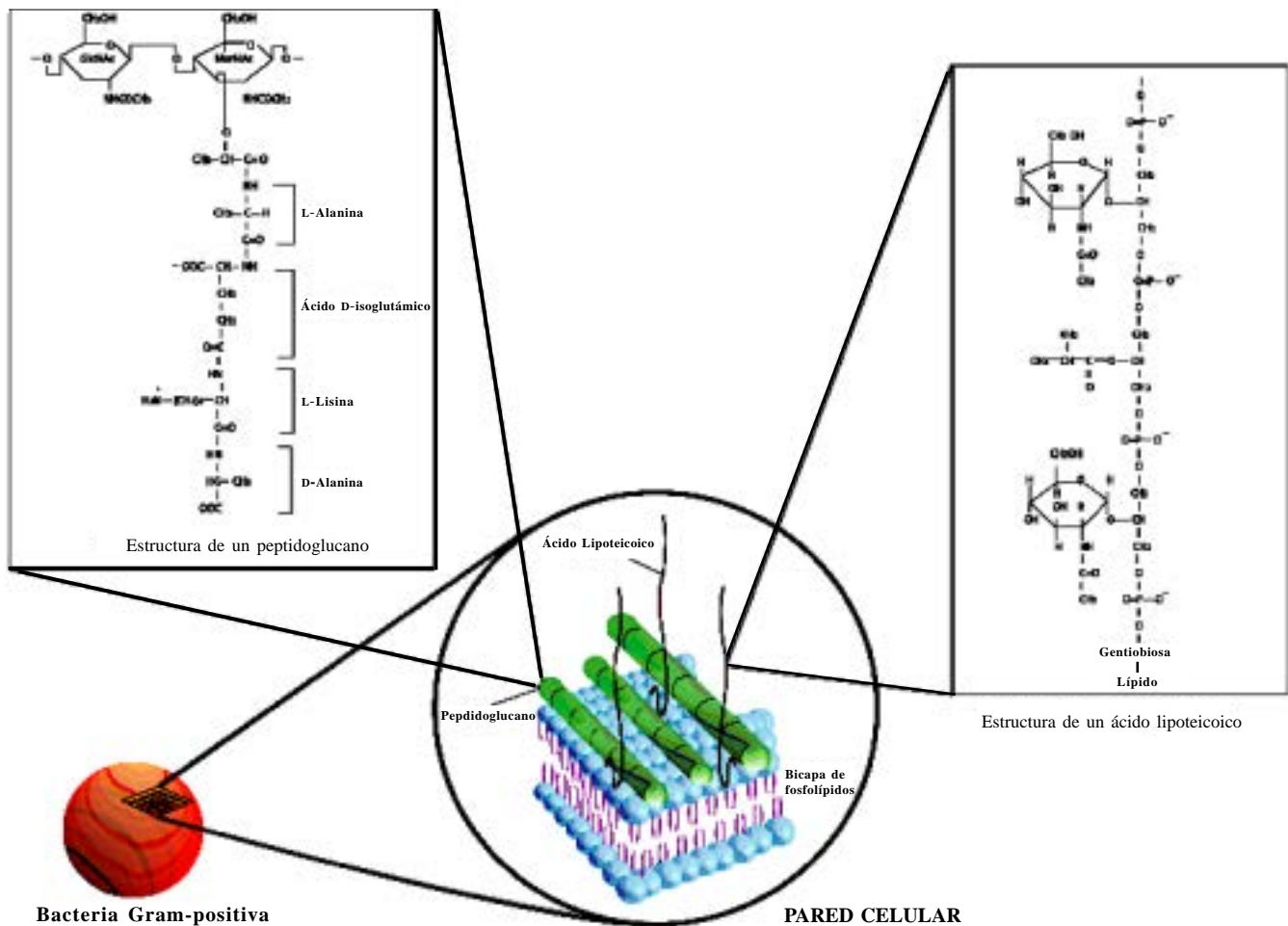
En la Unión Americana se presentan al año aproximadamente 500,000 casos de sepsis y del síndrome de disfunción multiorgánica (1). En la terapia intensiva pediátrica de la ciudad de México la disfunción multiorgánica fue causa de 20 a 30% de las defunciones en el año del 2002.

Por mucho tiempo se consideró que estos padecimientos eran ocasionados por bacterias Gram-negativas como *Pseudomonas* y *Enterococcus*, en particular por los componentes de su pared celular como son los lipopolisacáridos (LPS). Actualmente se sabe que los LPS por sí mismos no pueden producir todas las características del

síndrome de disfunción multiorgánica y que se requiere de la participación de bacterias Gram-positivas, las cuales carecen de LPS (2). Tal es el caso de *Staphylococcus aureus* que es una bacteria Gram-positiva y que a pesar de que carece de LPS está asociada al desarrollo de las siguientes enfermedades: neumonía, meningitis,

\*Recibido: 22 de noviembre de 2005 Aceptado: 6 de junio de 2006

Laboratorio de Bioquímica, División de Estudios de Posgrado e Investigación. Facultad de Odontología. Universidad Nacional Autónoma de México D.F. C.P. 04510. Teléfono y Fax 56 22 55 54. Correo E: [gloria@fo.odonto.unam.mx](mailto:gloria@fo.odonto.unam.mx)



endocarditis y septicemia, lo que sugiere que esta bacteria presenta otros factores de virulencia. Los peptidoglucanos y el ácido lipoteicoico (ALT) son dos de los principales componentes de las bacterias Gram-positivas que tienen actividades relacionadas con el desarrollo de sepsis (Fig. 1). En modelos experimentales tanto *in vivo* como *in vitro*, han mostrado que el ALT estimula respuestas inflamatorias, y que de igual forma estos componentes se encuentran asociados a infecciones específicas.

Se han identificado tres eventos ocasionados por bacterias Gram-positivas y que conducen a la liberación de citocinas por parte de diferentes células del hospedero como monocitos, macrófagos y células dendríticas. El

primero se produce por la presencia de componentes provenientes de las bacterias Gram-positivas, seguida de la interacción con receptores presentes en las células inmunes y finalmente por la activación de mecanismos de transducción que conducen a la expresión de moléculas proinflamatorias.

En esta revisión se describirá a los receptores involucrados en el reconocimiento del ALT, la activación de señales de transducción y la expresión de mediadores inflamatorios.

### HISTORIA

Los ácidos teicoicos (del griego: teichos: pared) se detectaron en el año de 1958 por Baddiley y colaboradores mientras investigaban el papel de las moléculas citidina difosfato-glicerol

(CDP-glicerol) y citidina difosforibitol (CDP-ribitol) (Fig. 1), que están presentes en las bacterias Gram-positivas (3). Las primeras moléculas que se aislaron de la pared celular mostraron ser polímeros del ribitol fosfato o del glicerol-fosfato que usualmente contienen residuos glucosil, ésteres de alanina o ambos. Debido a la diferencia estructural que presentaban estas moléculas, el término ácido teicoico se redefinió para incluir a todas las moléculas que contenían glicerol-fosfato o residuos de ribitol-fosfato presentes en la pared bacteriana, en la membrana o en polímeros capsulares.

El grupo de ácidos teicoicos de poliglicerol-fosfato se diferenció y denominó ácidos teicoicos intracelulares

porque se extraían de bacterias que no contenían pared celular (4). Posteriormente los ácidos teicoicos se detectaron en la membrana citoplasmática y se renombraron como ácidos teicoicos de membrana. Un tercer cambio a la denominación de los ácidos teicoicos, se sugirió ocho años después en la que se detectaron complejos de ácidos teicoicos y se describieron como compuestos anfifílicos en donde la estructura del poliglicerol-fosfato se une de forma covalente a los glucolípidos de membrana por unión fosfodiéster. De esta forma se caracterizaron a los ácidos lipoteicoicos como moléculas anfifílicas ancladas a la membrana citoplasmática por interacciones hidrofóbicas mientras que los ácidos teicoicos son moléculas que están covalentemente unidos al peptidogluclano de la pared celular (5).

Muchas bacterias Gram-positivas contienen ambos polímeros, pero el ácido lipoteicoico es el que predomina y su biosíntesis es menos dependiente de las condiciones de crecimiento bacteriano, en comparación con los ácidos teicoicos.

Como posibles funciones del ALT se ha propuesto que regula la función de las autolisinas (enzimas que ocasionan pequeños orificios en la pared celular). La naturaleza anfifílica del ALT parece ser muy importante para esta actividad ya que ésta se pierde al tratamiento con detergentes. Se ha demostrado en estudios *in vitro* que para llevar a cabo esta función es necesaria la formación de micelas (6).

Otra característica del ALT es su naturaleza polianiónica que le permite tener un papel clave en el mantenimiento del balance catión-divalente sobre la superficie celular, posiblemente, a través de la pared celular, mediante una interacción de intercambio iónico (6).

Un posible papel del ALT, que comparte con lipoglicanos, es que participan como mediadores de interacciones célula-célula, célula-sustrato, y la consecuente virulencia de la bacteria.

El ALT también se ha identificado como el responsable de la hidrofobicidad de la superficie en los *Streptococcus* del grupo A, en los cuales participa en la adherencia de la bacteria a la fibronectina en la superficie de células epiteliales, así como la adherencia de los *Staphylococcus saprophyticus* a las células uroepiteliales, en *Staphylococcus epidermidis* a los coágulos de fibrina-plaquetas y en *Staphylococcus aureus* con las células de mucosas, epiteliales y mesoepiteliales (7).

Todos los macroanfifilos tienen un gran potencial de contribuir a la hidrofobicidad de la superficie y además de actuar como un puente entre ligandos y bacterias.

#### DIFERENCIAS ENTRE EL LPS Y ALT

Los LPS denominados también como endotoxinas, son moléculas anfifílicas presentes en las bacterias Gram-negativas. Estas bacterias se caracterizan porque la pared celular del peptidogluclano está rodeada de una membrana externa y a nivel de esta membrana se encuentra el LPS; esta molécula participa en la fisiología de las membranas y es esencial en el crecimiento y supervivencia bacteriana. El LPS es el blanco principal de interacción entre los antibióticos y los componentes del sistema inmune. Los LPS cuando son liberados juegan un papel importante en la patogénesis y la manifestación de infecciones de bacterias Gram-negativas y en particular en el choque séptico.

Por otra parte el ALT es un componente de la pared celular de las bacterias Gram positivas, bacterias que se caracterizan porque rodeando a la membrana citoplasmática se encuentra la pared celular de peptidogluclanos que a diferencia de las bacterias Gram-negativas, es más gruesa. Aunque al LPS se le ha considerado como el principal factor de virulencia bacteriano. En fechas recientes se ha demostra-

do que el ALT comparte muchas propiedades patofisiológicas con el LPS y que actúa como un potente agonista con propiedades antiinflamatorias y que juega un papel clave en la patofisiología del choque séptico (8). En la tabla 1 se muestran algunas de las principales diferencias que se presenten entre estas moléculas.

#### Composición y efectos del ALT

El ALT es un componente único de la pared celular de las bacterias Gram-positivas, es un polímero de glicerol-fosfato que contiene azúcar y dos grupos acilo, estos últimos le confieren la propiedad de anclarse en la membrana celular (Fig. 1). En la tabla 2 se muestran las diferencias en los lípidos de anclaje entre las diferentes especies. Una forma no acetilada del ALT es el ácido teicoico, que está unido covalentemente al peptidogluclano de la pared celular de las bacterias Gram-positivas. Desde 1993, el ALT se extrae con fenol seguido de una cromatografía de interacción hidrofóbica. Sin embargo, algunos reportes han señalado que durante la extracción del ALT puede haber contaminación con algún otro componente de la pared celular bacteriana como LPS o peptidogluclanos.

En estudios *in vitro* se demostró que los monocitos expresan interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interleucina-6 (IL-6) y el factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ) en respuesta al tratamiento con ALT.

El ALT aislado de *Bacillus subtilis*, *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pyogenes* y de cepas de *Enterococci*, promueven la liberación de las citocinas antes mencionadas en líneas celulares de macrófagos y monocitos (9).

Sin embargo, el ALT aislado de otras bacterias Gram-positivas como *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pneumoniae* no inducen liberación de citocinas. En el mismo estudio se muestra también que la inducción de citocinas ocurre tanto en

TABLA 1

| Diferencias entre el lipopolisacárido (LPS) y el ácido lipoteicoico (ATL) |  |  |                      |
|---|--|--|----------------------|
|   | LPS  | ATL  | BIBLIOGRAFÍA         |
| Ubicación   | Componente principal de la lámina externa de la pared de bacterias Gram- negativas                             | Componente principal de la lámina externa de la pared de bacterias Gram positivas  | LPS (17)<br>ATL (18) |
| Función   | - Estructural<br>- Esenciales en el crecimiento y multiplicación bacteriana<br>- Viabilidad bacteriana         | - Estructural<br>- Esenciales en el crecimiento bacteriano<br>- Regulación de las concentraciones de calcio y magnesio en la pared celular<br>Regulación de enzimas autolíticas<br>- Posible función como acarreador en la pared celular durante la síntesis de ácidos teicoicos | LPS y ATL (19)       |
| Forma purificada  | Cilíndrica. La forma puede cambiar a laminar, cúbica y hexagonal dependiendo de la temperatura y fuerza iónica | Cónica formada por micelas esféricas con diámetro aprox. de 22 nm las cuales consisten en un número aproximado de 150 moléculas de ATL   | LPS y ATL (19)       |
| Porción tóxica  | Lípido A   |  | LPS y ATL (19)       |
| Se liberan durante  | Multiplicación y muerte bacterianas  | Multiplicación y muerte bacterianas  | LPS y ATL (19)       |
| Receptor  | TLR4, CD14, LBP  | TLR2   | LPS y ATL (19)       |
| Sitio de inicio de sepsis bacteriana                                      | - Enterico<br>- Genitourinario   | - Piel<br>- Heridas<br>- Estructuras de tejido blando<br>- Sitios cateterizados  | LPS y ATL (19)       |

TABLA 2

### Características del lípido de anclaje y unidades hidrofílicas de diferentes microorganismos Gram-positivos

| ORGANISMO                               | LÍPIDO DE ANCLAJE                      | UNIDADES HIDROFÍLICAS   | BIBLIOGRAFÍA |
|---|--|-------------------------|--------------|
| <i>Micrococcus</i> spp.                 | Diacilglicerol                         | Manano                  | (20)         |
| <i>Streptococcus pneumoniae</i>         | Indefinido pero contiene ácidos grasos | Colina y ribitolfosfato | (21)         |
| <i>Bifidobacterium</i> spp.             | Galactosildiacilglicerol               | Glucogalactano          | (22)         |
| <i>Mycobacterium</i> spp.               | Fosfatidilinositol                     | Arabinomanano           | (23)         |
| <i>Corynebacterium diphtheriae</i>      | Indefinido pero contiene ácidos grasos | Arabinomanano           | (24)         |
| <i>Propionibacterium freudenreichii</i> | Fosfatidilinositol                     | Manano                  | (25)         |
| <i>Streptococcus sanguis</i>            | Indefinido pero contiene ácidos grasos | Heteropolisacárido      | (26)         |
| <i>Actinomyces viscosus</i>             | Indefinido pero contiene ácidos grasos | Heteropolisacárido      | (27)         |

presencia como en ausencia de suero, lo que sugiere que la estimulación no es dependiente de factores del complemento. Por otra parte, cuando el ALT es desacilado pierde la capacidad de estimular a monocitos, lo que demuestra que el componente lipídico es el que confiere al ALT su actividad biológica.

En otros estudios realizados en macrófagos se muestra que el ALT

cuando se obtiene de diferentes especies bacterianas, induce la expresión de TNF- $\alpha$  y de la enzima óxido nítrico sintasa, así como la producción de óxido nítrico. Estos estudios sugieren que la capacidad del ALT para estimular respuestas inmunes no depende de la especie. Sin embargo, el ALT obtenido de *Staphylococcus aureus* no induce la expresión de TNF- $\alpha$  ni la

producción de nitritos en las células antes mencionadas.

Las preparaciones de ALT que se obtienen únicamente por extracción fenólica estimulan a las células sólo cuando se utiliza a altas dosis. Por ejemplo, el ALT de *Staphylococcus aureus* induce la liberación de IL-12 en una línea celular de monocitos (1 a 10  $\mu\text{g/ml}$ ), así como la expresión de la enzima óxido nítrico sintasa inducible en cardiomiocitos y en la línea celular de macrófagos J774, la expresión de TNF- $\alpha$ , IL-6 e interleucina-10 (IL-10) en monocitos y células T (10) y de la ciclooxigenasa-2 en células epiteliales de pulmón. El ALT activa también las vías del complemento clásica y alterna. En estudios *in vivo*, el ALT extraído con fenol actúa en sinergia con el peptidoglucano para causar falla de órganos en ratas y proteger contra el daño por isquemia y la reperfusión del corazón y los riñones. Recientemente se demostró que la aplicación nasal de ALT provoca la infiltración de neutrófilos en los pulmones, lo que sugiere que el ALT comparte

muchas propiedades con los LPS.

Otros estudios muestran que preparaciones comerciales de ALT aislado de *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* y de *Streptococcus sanguis* contienen concentraciones significativas de LPS y de otros componentes distintos al ALT con capacidad de inducir respuestas inflamatorias (11). Por ejemplo, se ha demostrado que la capacidad del ALT para estimular la producción de óxido nítrico en macrófagos de rata RAW 264.7 es fuertemente atenuada por el tratamiento con polimixina, (péptido catiónico cíclico que se asocia con alta afinidad al LPS y reduce su toxicidad) lo que sugiere que la muestra que utilizaron para este estudio presentaba contaminación por LPS.

Pero cuando las preparaciones de ALT de *Streptococcus aureus*, *Bacillus subtilis* y *Streptococcus sanguis* fueron sometidas a cromatografía de interacción hidrofóbica se obtuvieron dos fracciones una enriquecida en ALT y otra en LPS. Al tratar los macrófagos con la fracción enriquecida en ALT, las células no sintetizaron óxido nítrico. Las preparaciones enriquecidas en ALT obtenidas de *Bacillus subtilis* y *S. pyogenes* inducen la liberación de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-10 en macrófagos y linfocitos. En este estudio se reportó nuevamente que el ALT de *Staphylococcus aureus* no tuvo ningún efecto; algunos investigadores sugieren que durante la extracción del ALT se produce una descomposición en su estructura y por este motivo no presenta actividad biológica. La utilización de otros métodos como la extracción con butanol permite la obtención de ALT de *Staphylococcus aureus* con actividad biológica. En estudios *in vivo* este ALT no tiene efecto sobre la adhesión y emigración de leucocitos desde la microcirculación a los tejidos (diapédesis). Es por este motivo que deben realizarse mayores estudios que

permitan caracterizar la metodología más apropiada para la obtención de muestras purificadas de ALT y de esta manera caracterizar con precisión los efectos del ALT y determinar la parte activa de su estructura.

### Receptores

Los mecanismos de defensa por parte del hospedero contra patógenos, los realiza el sistema inmune a través de dos componentes denominados inmunidad innata y adaptativa.

La respuesta inmune adaptativa se caracteriza por la selección clonal de linfocitos antígeno específicos, es por tanto una respuesta tardía, pero tiene memoria y proporciona una protección prolongada, no participa en la patogénesis de la sepsis ni en la del choque séptico y se presenta solo en vertebrados. La inmunidad innata se manifiesta en vegetales y en animales invertebrados y vertebrados. Es de respuesta rápida y actúa directamente sobre los patógenos. En este tipo de respuesta participan monocitos, macrófagos y células dendríticas. Se ha demostrado que tanto los macrófagos como las células dendríticas pueden ser activadas por componentes bacterianos como LPS y ALT.

A finales del siglo veinte se encontró que los receptores Toll se activaban en defensa contra las infecciones por hongos en la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*; organismo que solamente tiene inmunidad innata (12). Tagushi descubrió el primer TLR en humanos al que denominó TIL y que actualmente corresponde al receptor TLR1. Un año después se descubrió un homólogo del receptor Toll en mamíferos (actualmente denominado TLR4) y se mostró que la activación del receptor inducía la expresión de genes involucrados en respuestas inflamatorias. Después de la caracterización del primer receptor tipo Toll (TLR) se identificaron diversas proteínas que estructuralmente estaban

relacionadas con TLR4. Actualmente los TLR comprenden una amplia familia conformada por al menos 11 miembros. Los receptores TLR 1-9 están conservados en humanos y ratón. Sin embargo, TLR10 es funcional en humanos y el TLR 11 en ratón.

Los receptores Toll son proteínas transmembranales con un dominio extracelular que contiene una región de repeticiones de leucina y un dominio intracelular homólogo al receptor de interleucina 1 $\beta$  denominado Toll/receptor IL-1 (TIR).

El receptor TLR2 reconoce una gran variedad de componentes microbianos entre los que se encuentran las lipoproteínas y lipopéptidos de varios patógenos, peptidoglucano y ácido lipoteicoico de bacterias Gram-positivas, lipoarabinomano de micobacteria y glucolípidos de *Treponema maltophilum* (8).

Los receptores TLR2 reconocen un amplio rango de productos bacterianos debido a la cooperación con diversas proteínas. Se ha demostrado que forma heterodímeros con otros TLR como TLR1 y TLR6 los cuales estructuralmente están relacionados con TLR2. De igual forma colabora con distintos tipos de receptores como dectina-1, receptor de la familia de las lectinas para  $\beta$ -glucano componente de la pared celular de hongos. Otras observaciones muestran también que los dominios citoplasmáticos de diferentes TLR no son funcionalmente equivalentes, lo que sugiere que la capacidad de tipos celulares específicos para responder a bacterias Gram-positivas no está definida solamente por la expresión de TLR2. La expresión diferencial y heterodimerización entre los receptores TLR incrementa el repertorio de respuestas celulares que pueden activarse por diversos estímulos infecciosos, y es posible que esta sea la base para las respuestas celulares específicas.

Ratones deficientes en TLR2

(TLR2  $-/-$ ) son susceptibles a la infección por *S.aureus* y *S. pneumoniae* (12). Se ha demostrado también que la transfección de TLR2 en células CHO o HEK293, les confiere la habilidad de activar al factor nuclear- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) en respuesta al tratamiento con ALT. En ambos estudios la co-transfección con CD-14 incrementa la activación del receptor TLR2. A fin de elucidar el papel de estos receptores en la respuesta celular a los componentes microbianos se obtuvieron ratones deficientes en TLR2 ( $-/-$ ) o TLR4 ( $-/-$ ). En respuesta a ALT los macrófagos peritoneales deficientes en TLR2 ( $-/-$ ) no sintetizaron TNF- $\alpha$  mientras que los deficientes en TLR4 ( $-/-$ ) sintetizaron grandes cantidades de TNF- $\alpha$ . Con base en todos estos experimentos se ha llegado a la conclusión de que los receptores TLR2 son las moléculas de reconocimiento del ALT (11).

Los receptores TLR2 responden a diversos productos bacterianos como lipoproteínas y peptidoglucanos, lo que demuestra que el receptor TLR2 no responde de forma exclusiva al ALT. En un estudio diferente, se demostró que células CHO transfectadas con los receptores TLR2 responden a *Listeria monocytogenes* pero no a *Streptococci* grupo B lo que sugiere que el receptor TLR2 puede discriminar entre dos bacterias Gram-positivas. En monocitos encontraron que la liberación de TNF- $\alpha$  inducida por ALT, se bloquea cuando las células son tratadas con anticuerpos monoclonales anti-TLR2. De igual forma existen evidencias que demuestran que el receptor TLR4 confiere resistencia a las infecciones por pneumococo mediante la interacción con pneumolisina

En células humanas el TLR2 se expresa predominantemente en monocitos, macrófagos, neutrófilos, células T y células B. Sin embargo, otros tipos de células sintetizan RNA mensajero para TLR2 y otros tipos de TLRs. La expresión y eficacia de los

TLR para la activación de señales de transducción es regulada por MD-1 y MD-2 (13). El receptor CD14 actúa en concierto con el complejo TLR4/MD-2 para iniciar las respuestas a lipopolisacárido. Los peptidoglucanos también se asocian a CD14 y cuando se bloquea este receptor se inhibe la señalización inducida por ALT lo que sugiere que CD14 además de su relevancia en las respuestas a LPS también está involucrado en el reconocimiento de bacterias Gram-positivas. También se ha demostrado que el reconocimiento entre el ALT y los receptores TLR2 está mediada por la región de los carbohidratos.

### MECANISMO DE TRANSDUCCIÓN DE ALT

Entre las vías de transducción activadas en respuesta al tratamiento con ALT se encuentran la de las proteínas cinasas activadas por mitógeno (MAPK/p38) y la vía de fostatidilinositol-3 cinasa gamma (PI3K $\gamma$ ). En la sepsis en humanos la activación de MAPK/p38 está implicada en la granulocitosis y permite de esta forma restaurar la función inmune en sepsis.

### Vía Clásica estimulada por ALT

Una vez que el ALT se une a su respectivo receptor membranal (TLR2), entonces se activa la fosfatidilcolina-fosfolipasa C (PC-PLC) y la fosfatidilcolina-fosfolipasa D (PC-PLD) para inducir la activación de PKC, simultáneamente ocurre la activación de cinasas de residuos de tirosina. Estos efectos resultan necesarios para la consecuen- te fosforilación de las MAPK p42/44 y p38. La cascada de fosforilaciones descrita resulta en la estimulación de NF- $\kappa$ B y la subsecuente expresión de la ciclooxigenasa-2 (COX2) y liberación de prostaglandina E<sub>2</sub> (14).

Recientes estudios han demostrado que utilizando el inhibidor específico de la MAPK/p38 (SB 203580) se interrumpe la expresión de iNOS y la liberación de óxido nítrico (NO) cuan-

do se trata con ALT a la línea celular de macrófagos RAW 264.7. Estos resultados sugieren que la vía de transducción de las MAPK/p38 se encuentra también involucrada en la producción de nitritos. (13).

### Otras vías de transducción activadas por ALT

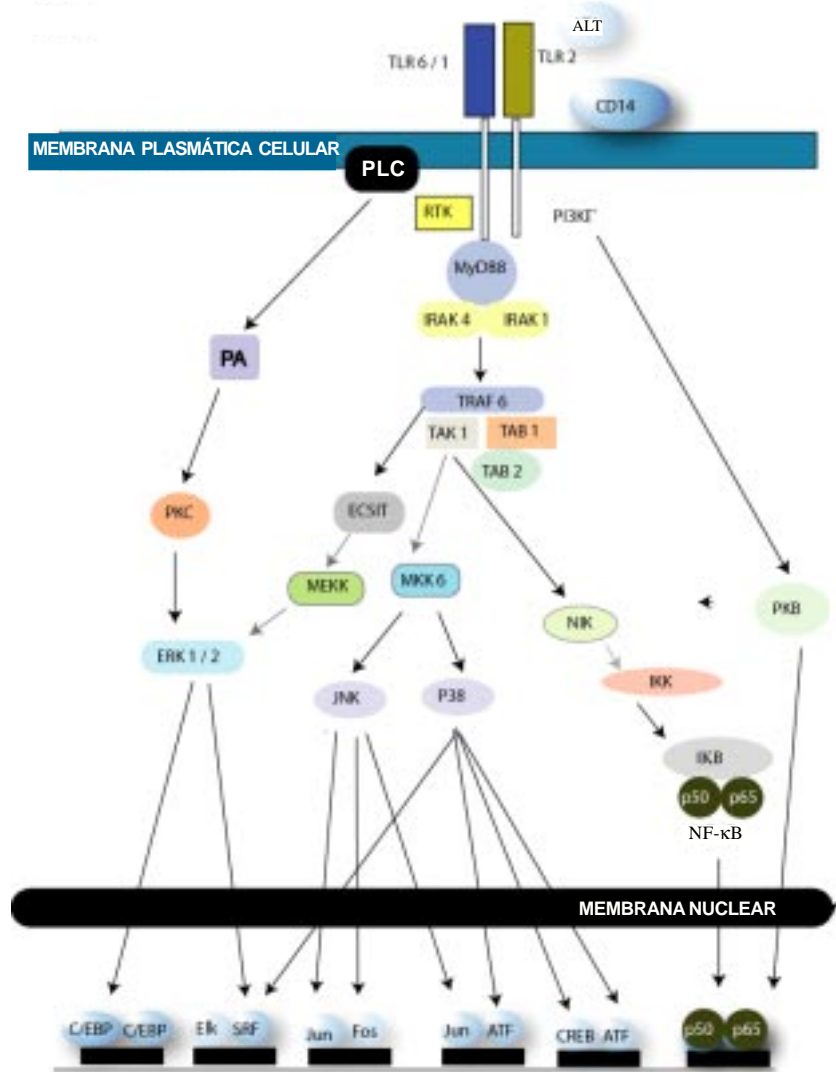
También se ha demostrado que PI3K $\gamma$  se activa por receptores acoplados a proteínas G durante procesos inflamatorios. Neutrófilos de ratón deficientes en PI3K $\gamma$  ( $-/-$ ) muestran isquemia, reducción en migración y peritonitis. Así mismo, se muestra también una reducción en la translocación de NF- $\kappa$ B y en la síntesis de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ . Estos estudios sugieren que PI3K $\gamma$  juega un importante papel en la activación de neutrófilos.

Después del reconocimiento entre TLR2 y el ALT se produce un amplio espectro de señales intracelulares como la activación de la familia de MAPK, de la proteína cinasa B (PKB) y de la cinasa del inhibidor- $\kappa$ B (IKK). El incremento en la actividad de estas cinasas consecuentemente activa a diversos factores de transcripción como NF- $\kappa$ B (en particular a los heterodímeros p50 y p65), Jun/Fos, factor de activación de transcripción (ATF), factor de respuesta a suero (SRF), proteína semejante a Ets (ELK), proteína de unión y aumento de CCAAT (C/EBP) y la proteína de fijación del elemento de respuesta a AMP cíclico (CREB). El primer evento que inicia la cascada de transducción consiste en la co-localización y agrupamiento de receptores y la generación de señales primarias de transducción en la membrana plasmática.

La señalización mediada por AMP cíclico inhibe la activación de la cinasa de respuesta extracelular (ERK), p38, MAPK y JNK en macrófagos peritoneales y también inhibe la expresión de TNF- $\alpha$ , NF- $\kappa$ B y la expresión de óxido nítrico sintasa inducible en células de Kupffer y monocitos (15).

En respuesta al tratamiento con *Streptococcus B*, los receptores TLR2, TLR6 y CD14 se agrupan y la primera molécula intracelular reclutada por el complejo es el factor de diferenciación mieloide (MyD88) el cual recluta y activa a la cinasa asociada al receptor de interleucina-1 (IRAK). IRAK forma multímeros que se autofosforilan y reclutan grandes complejos consistentes en el factor activado por el receptor a TNF (TNF/TRAF6), cinasa activadora del factor de crecimiento transformante  $\beta$ -1 (TAK1), proteína de asociación a TAK1 (TAB1) y TAB2.

IRAK 4 fosforila a IRAK1, esta fosforilación es indispensable para la activación de la transducción de señales, en contraposición, recientemente se ha descrito que la forma IRAK-M actúa como inhibidor. Así mismo, la activación de TAK1 promueve su liberación del complejo y de esta forma activa a IKK $\beta$  y a la MAPK cinasa cinasa 6 (MKK6). La cinasa inductora de NF- $\kappa$ B (NIK) se requiere para la activación de la cinasa de I $\kappa$ B (IKK) que promueve la fosforilación, ubiquitinación y degradación en el proteosoma 26S de I $\kappa$ B y la translocación de NF- $\kappa$ B al núcleo. La proteína cinasa MAP- $\beta$  (MKK $\beta$ ) es responsable de la activación de las MAPK, p38 y la cinasa terminal N-JUN (JNK). En presencia de la proteína adaptadora denominada intermediario conservado evolutivo de la vía de Toll (ECSIT) y MEK cinasa (1/MKK1), TRAF6 puede activar a ERK 1/2. Sin embargo, ERK 1/2 también puede activarse por un mecanismo independiente de TRAF6, que involucra a la forma atípica de PKC la PKC $\zeta$  que está asociada a la acumulación de ácido fosfatídico, lo que conlleva a la activación de ERK. Finalmente, se ha demostrado también la activación de la fosfatidilinositol-3 cinasa (PI3K) de una manera dependiente de PKB lo



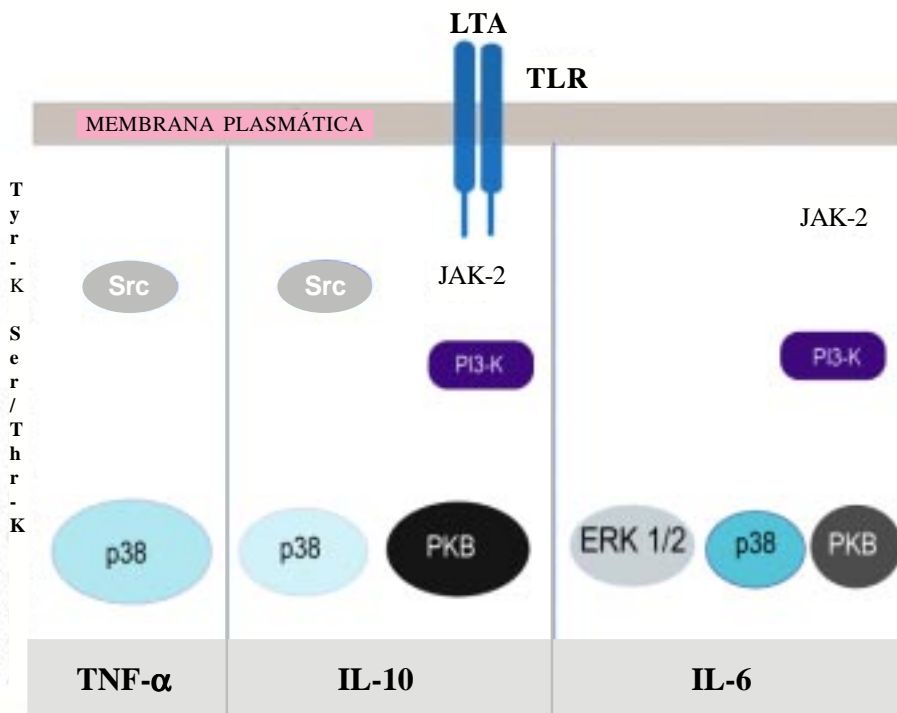
**Figura 2.** Vías de señalización activadas por TLR2. El ALT se asocia a la membrana del hospedero por medio de los receptores TLR2 interviniendo también los TLR1/6 y CD14. A partir de estos eventos se permite la activación de algunas cinasas de la familia de las MAPK (ERK1/2, JNK y p38) y de la PI3K además de algunos factores de transcripción (ATF; C/EBP, CREB, NF- $\kappa$ B). ALT, ácido lipoteicoico; TLR, receptor semejante a Toll; PLC, fosfolipasa C; PKB, proteína cinasa B; PKC, proteína cinasa C; PI3K, fosfatidilinositol 3 cinasa; RTK, receptor con actividad de cinasa de residuos de tirosina; MyD88, factor de diferenciación mieloide; IRAK, cinasa asociada al receptor de interleucina 1; TRAF, factor de receptor activado; TAK1 cinasa activada por factor de crecimiento transformante; TAB, proteína de asociación a TAK1; MAPK, proteína cinasa activada por mitógeno; MKK, MAPK-cinasa; MEKK, MAPK-cinasa-cinasa; ERK1/2, cinasa de respuesta a señales extracelulares; JNK, cinasa N terminal de Jun; I $\kappa$ B, inhibidor de kappa B; IKK, cinasa de I $\kappa$ B; ECSIT, intermediario conservado evolutivo en la vía de Toll; MEK cinasa (1/MKK1), TRAF6 puede activar a ERK 1/2. Sin embargo, ERK 1/2 también puede activarse por un mecanismo independiente de TRAF6, que involucra a la forma atípica de PKC la PKC $\zeta$  que está asociada a la acumulación de ácido fosfatídico, lo que conlleva a la activación de ERK. Finalmente, se ha demostrado también la activación de la fosfatidilinositol-3 cinasa (PI3K) de una manera dependiente de PKB lo

que conduce a la activación de NF- $\kappa$ B (Fig. 2).

Diversos reportes señalan que las células de Kupffer producen interleucina-6 (IL-6) y TNF- $\alpha$  durante el trauma, estas células también sintetizan citocinas anti-inflamatorias como

IL-10 en respuesta al tratamiento con ALT. La cinasa PKB que es activada a través de la vía de PI3K, así como la actividad de JAK-2, están involucradas en la expresión de IL-6 e IL-10, mientras que las cinasas de la familia Src participan en la expre-





**Figura 3.** Cinasas de señalización implicadas en la regulación de TNF- $\alpha$ , IL-10, e IL-6 en células de Kupffer. Se ha demostrado que a través de una señal de TLR inducida por ALT son activadas las MAPK p42/p44 (ERK1/2), MAPK p38, PI3-K/PKB, y las cinasas de residuos de tirosina Src y JAK-2 en macrófagos. Cada caja contiene las cinasas de señalización que se encuentran claramente implicadas en la regulación de la liberación de las citocinas que se muestran abajo (15). Tyr-K, cinasas de residuos de tirosina; Ser/Thr-K, cinasas de residuos de serina o treonina.

sión de TNF- $\alpha$  (16). Como se muestra en la figura 3, el ALT de *S.aureus* al asociarse al receptor TLR2 activa cinasas de residuos de tirosina y cinasas de residuos de serina y treonina lo que conduce a la expresión de TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10.

### EFFECTO DEL ALT EN LA SEPSIS Y DAÑO A ÓRGANOS

La falla múltiple de órganos se ha demostrado en ratas anestesiadas tratadas con ALT. Existen evidencias que señalan que ALT actúa de manera sinérgica con los peptidoglucanos para causar falla respiratoria y sepsis en puercos. Pero a pesar de que se han observado estas actividades biológicas con el ALT, algunos investigadores consideran que las preparaciones de ALT utilizadas pueden contener moléculas no ALT que tienen la habilidad de inducir la expresión de TNF- $\alpha$ . Se puede concluir que las interacciones entre el peptidoglucano y ALT en sus

implicaciones con el choque séptico y daño a órganos requieren de mayores estudios y de mejores métodos que permitan la obtención de muestras altamente purificadas, libres de otros productos bacterianos, en particular de LPS, para de esta forma realizar estudios que permitan una mejor caracterización de sus efectos.

### PERSPECTIVAS

Sin duda alguna la sepsis asociada a la falla múltiple de órganos es un problema de salud pública que ocasiona una alta morbilidad y mortandad. Por mucho tiempo al LPS se le ha considerado como el agente causal que desencadena la respuesta inflamatoria que se presenta en las etapas tempranas de la sepsis. Sin embargo, se ha comenzado a centrar la atención en dos componentes bacterianos tales como los peptidoglucanos y el ALT y sus efectos como moléculas promotoras de la inflamación y de inicio de sepsis.

Los peptidoglucanos y el ALT actúan como ligandos de los receptores TLR-2 y aunque ambos agentes inducen la expresión de moléculas proinflamatorias, se ha demostrado que estos ligandos producen respuestas biológicas diferentes. Por este motivo se deberá realizar un gran esfuerzo en el desarrollo de moléculas que actúen como inhibidores o antagonistas del ALT, peptidoglucanos y del LPS, con el propósito de establecer los efectos de cada ligando y su papel en la expresión de mediadores de procesos inflamatorios y a través de esta misma estrategia determinar el papel de los mismos en el desarrollo de sepsis. Sin embargo, no se han esclarecido las bases moleculares que expliquen de que forma los peptidoglucanos y el ALT actúan de forma sinérgica, lo que permitiría determinar cuales son los eventos en la señalización que conducen a la falla de órganos y de esta forma proponer nuevas terapias para contrarrestar estos efectos.

### CONCLUSIONES

El ALT es considerado como el principal factor de virulencia de las bacterias Gram-positivas. El ALT es una molécula anfifílica con un dominio lipídico que funciona como una molécula de adhesión que facilita la asociación de las bacterias a las células, la colonización y la invasión en tejidos. ALT se asocia los receptores TLR-2 lo que conduce a la activación de vías transducción que conducen a la translocación del factor NF- $\kappa$ B. Sin embargo, deben realizarse mayores estudios que apoyen el papel del ALT como un importante factor de virulencia. Se requiere de muestras puras de ALT ya que, como hemos señalado, las muestras se contaminan fácilmente con el LPS durante su extracción.

Por otra parte, es importante desarrollar mayores estudios clínicos que permitan abatir la lisis bacteriana en el torrente sanguíneo e impedir la liberación de LTA y peptidoglucanos.



## REFERENCIAS

1. Bhakdi S, Klonisch T, Nuber P, Fischer W (1991) Stimulation of monokine production by lipoteichoic acids. *Infect Immun* 59:4614-4620.
2. Armstrong JJ, Baddiley J, Buchanan JG, Davison AL, Keleman MV, Neuhaus FC (1959) Composition of teichoic acids from a number of bacterial walls. *Nature* 25:247-248.
3. Armstrong JJ, Baddiley J, Buchanan JG, Carss B (1958) Nucleotides and the bacterial cell wall. *Nature* 2:1692-1693.
4. Critcheley P, Archibald AR, Baddiley J (1962) The intracellular teichoic acid from *Lactobacillus arabinosus*. *Biochem J* 85:420-431.
5. Knox KW, Wicken AJ (1972) Serological studies on the teichoic acids of *Lactobacillus plantarum*. *Infect Immun* 6:43-49.
6. Lambert PA, Hancock IC, Baddiley J (1997) Occurrence and function of membrane teichoic acids. *Biochim Biophys Acta* 472:1-2.
7. Carruthers MM, Kabat WJ (1983). Mediation of staphylococcal adherence to mucosal cells by lipoteichoic acid. *Infect Immun* 58:315-319.
8. Horn DL, Morrison DC, Opal SM, Silverstein R, Visvanathan K, Zabriskie JB (2000 Oct) What are the microbial components implicated in the pathogenesis of sepsis? *Clin Infect Dis* 31(4):851-858.
9. Bhakdi S, Klonisch T, Nuber P, Fischer W (1991) Stimulation of monokine production by lipoteichoic acids. *Infect Immun* 59:4614-4620.
10. Cleveland MG, Gorham JD, Murphy TL, Tuomanen E, Murphy KM (1996) Lipoteichoic acid preparations of Gram-positive bacteria induce interleukin-12 through a CD14-dependent pathway. *Infect Immun* 64:1906-1912.
11. Gao JJ, Xue Q, Zuvanich EG, Haghi KR, Morrison DC (2001) Commercial preparations of lipoteichoic acid contain endotoxin that contributes to activation of mouse macrophages in vitro. *Infect Immun* 69:751-757.
12. Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA Jr. (1997) A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 388:394.
13. Cao Z, Henzel WJ, Gao X (1996) IRAK: a kinase associated with the interleukin-1 receptor. *Science* 271:1128-1131.
14. Ninomiya-Tsuji J, Kishimoto K, Hiyama A, Inoue J, Cao Z, Matsumoto K (1999) The kinase TAK1 can activate the NIK-I kappaB as well as the MAP kinase cascade in the IL-1 signalling pathway. *Nature* 398:252-256.
15. Cao Z, Xiong J, Takeuchi M, Kurama T, Goeddel DV (1996) TRAF6 is a signal transducer for interleukin-1. *Nature* 383:443-446.
16. Dahle MK, Overland G, Myhre AE, Stuestol JF, Hartung T, Krohn CD, Mathiesen O, Wang JE, Aasen AO (2004) The Phosphatidylinositol 3-Kinase/Protein Kinase B Signaling Pathway Is Activated by Lipoteichoic Acid and Plays a Role in Kupffer Cell Production of Interleukin-6 (IL-6) and IL-10. *Infect Immun* 72:5704-5711.
17. Hellman J, Loiselle PM, Tehan MM, Allaire JE, Boyle LA, Kurnick JT, Andrews DM, Sik Kim K, Warren HS (2000) Outer membrane protein A, peptidoglycan-associated lipoprotein, and murein lipoprotein are released by *Escherichia coli* bacteria into serum. *Infect Immun* 68(5):2566-2572.
18. Fischer W (1994 May) Lipoteichoic acid and lipids in the membrane of *Staphylococcus aureus*. *Med Microbiol Immunol (Berlin)* 183(2):61-76.
19. Van Amersfoort ES, Van Berkel TJ, Kuiper J (2003 Jul) Receptors, Mediators, and Mechanisms Involved in Bacterial Sepsis and Septic Shock. *Clin Microbiol Rev* 16(3):379-414.
20. Owen P, Salton MR (1975) A succinylated mannan in the membrane system of *Micrococcus lysodeikticus*. *Biochem Biophys Res Commun* 21;63(4):875-880.
21. Briles EB, Tomasz A (1973). Pneumococcal C-substance, a choline-containing lipoteichoic acid. *J Biol Chem* 248(18):6394-6397.
22. Fischer W (1987) Lipoteichoic acid of *Bifidobacterium bifidum* Subspecies pennsylvanicum DMS 20239. *Eur J Biochem* 165(3):639-646.
23. Hunter SW, Brennan PJ (1990) Evidence for the presence of a phosphatidylinositol anchor on the lipoarabinomannan and lipomannan of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Biol Chem* 265(16):9272-9279.
24. Koikeguchi S, Kato K, Ohta H, Fukui K, Tsujimoto M, Ogawa T, Takada H, Kotani S (1987). Isolation and characterization of an amphipathic antigen from *Corynebacterium diphtheriae*. *Microbios* 50:183-199.
25. Sutcliffe IC, Shaw N (1989). A novel inositol containing lipomannan from *Propionibacterium freudenreichii*. *FEMS Microbiol Lett.* 59:249-252.
26. Yamamoto T, Koga T, Mizuno J, Hamada S (1985). Chemical and immunological characterisation of a novel amphipathic antigen from biotype B *Streptococcus sanguis*. *J Gen Microbiol* 131(8):1981-1988.
27. Wicken AJ, Broady KW, Evans JD, Knox KW (1978) New cellular and extracellular amphipathic antigen from *Actinomyces viscosus* NY1. *Infect Immune* 22(2):615-616.