

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**



TESIS DOCTORAL

**Mecanismos moleculares de shock endotóxico : efectos "in vivo" e "in vitro" de la endotoxina de escherichia coli sobre la estructura y la función de las mitocondrias**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR

**Gabriel Conde Arias-Camisón**

DIRECTOR:

**Antonio Suárez Sanz**

Madrid, 2015

Gabriel Conde Arias-Camisón

TP  
1982.  
129



\* 5 3 0 9 8 5 8 8 9 2 \*

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

X-33-04402.2

MECANISMOS MOLECULARES DEL SHOCK ENDOTOXICO: EFECTOS  
"IN VIVO" E "IN VITRO" DE LA ENDOTOXINA DE ESCHERICHIA  
COLI SOBRE LA ESTRUCTURA Y LA FUNCION DE LAS MITOCONDRIAS

Departamento de Bioquímica  
Facultad de Ciencias Químicas  
Universidad Complutense de Madrid  
1982



BIBLIOTECA

Colección Tesis Doctorales. Nº 129/82

© Gabriel Conde Arias-Camisón  
Edita e imprime la Editorial de la Universidad  
Complutense de Madrid. Servicio de Reprografía  
Noviciado, 3 Madrid-8  
Madrid, 1981  
Xerox 9200 XB 480  
Depósito Legal: M-16193-1982

GABRIEL CONDE ARIAS-CAMISON

MECANISMOS MOLECULARES DEL SHOCK ENDOTOXICO: EFECTOS  
"IN VIVO" E "IN VITRO" DE LA ENDOTOXINA DE ESCHERICHIA  
COLI SOBRE LA ESTRUCTURA Y LA FUNCION DE LAS MITOCONDRIAS

DIRECTOR: ANTONIO SUAREZ SANZ  
DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
SEC. MEDICINA Y CIRUGIA EXPERIMENTAL  
CIUDAD SANITARIA PROVINCIAL MADRID

DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA  
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS  
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

1981



Esta tesis doctoral ha sido realizada en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Complutense de Madrid, bajo la dirección del Dr. D. Antonio Suarez Sanz y la supervisión del Prof. Dr. D. Angel Martín Muncio, catedrático y jefe del mencionado departamento, y del Prof. Dr. D. Pedro García Barreno, Jefe del Servicio de Cirugía y Medicina Experimental de la Ciudad Sanitaria Provincial. Agradezco a ellos el interés y la ayuda que me han prestado.

También deseo expresar mi agradecimiento a mis compañeros de laboratorio, en especial a D<sup>a</sup>. M<sup>a</sup>. del Carmen Méndez por su colaboración, al Dr. D. Rafael García del Departamento de Bioquímica de la Clínica Puerta de Hierro y a la Firma C.R. Marés, que nos permitió la utilización del espectrofotómetro DW-2a.

Esta tesis doctoral fué leída en la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Complutense de Madrid el día 9 de octubre de 1981 ante un tribunal formado por los siguientes profesores de dicha Universidad :

Presidente	Arsenio Fraile	(Facultad de Ciencias Biológicas)
Vocal	Amador Schüller	(Facultad de Medicina)
Vocal	Angel Martin	(Facultad de Ciencias Químicas)
Vocal	José L. Soto	(Facultad de Ciencias Químicas)
Secretario	Luis Franco	(Facultad de Ciencias Químicas)

La calificación obtenida fué de sobresaliente "cum laude"

INDICE

## INTRODUCCION

Shock circulatorio	1
Metabolismo lipídico en el shock	3
Composición y estructura química de las endotoxinas	8
Comportamiento y propiedades fisicoquímicas del LPS en disolución	13
Relación estructura-actividad biológica del LPS	14
Papel del LPS como componente de la pared externa de bacterias	14
Actividad tóxica	14
Interacción con membranas	16
Acción del LPS a nivel celular	20
Acción sobre las células del sistema inmunológico	20
Macrófagos	20
Leucocitos polimorfonucleares	22
Linfocitos	23
Acción sobre los eritrocitos	23
Acción sobre las plaquetas	24
Acción sobre las células retículo-endoteliales	25
Acción sobre el hígado	26
Características estructurales y funcionales de las membranas mitocondriales	29
Membrana externa	29
Membrana interna	30
Control respiratorio	35
Mecanismos y regulación del transporte de $Ca^{2+}$ mi- tocondrial	39
Actividad de la fosfolipasa $A_2$ mitocondrial	42
Acción del LPS sobre las mitocondrias	45
Efectos secundarios al shock circulatorio	46
Acción directa del LPS sobre los hepatocitos	47

Prostaglandinas en el shock	49
Biosíntesis de prostaglandinas en el hígado	51
MATERIALES Y METODOS	
Reactivos y productos químicos utilizados	54
Material biológico	55
Experimentación "in vivo"	56
Shock endotóxico	56
Medida de presión arterial	56
Shock hemorrágico	57
Aislamiento de la fracción mitocondrial de hígado	59
Estudio de la funcionalidad mitocondrial	61
Registro de consumo de O <sub>2</sub> : Electrodo de oxígeno	61
Técnicas espectrofotométricas	63
Determinación de la actividad de la succinato- citocromo c reductasa	63
Evaluación de la concentración de Ca <sup>2+</sup>	64
Aislamiento de la fracción microsomal de hígado	65
Estudio de la actividad de la prostaglandina sinte- tasa microsomal	65
Valoración de grupos tiólicos de la fracción micro- somal	66
Experimentación "in vitro" con fracción mitocondrial	67
Actividad de la fosfolipasa A <sub>2</sub>	68
Incorporación de ácidos grasos en los fosfolí- pidos mitocondriales	68
Análisis de lípidos	71
Extracción	71
Cromatografía en capa fina	71
Cromatografía gas-líquido	72
Valoración de fósforo	75
Medida de radiactividad	75

RESULTADOS Y DISCUSION

Experimentación "in vivo"	76
Shock endotóxico	76
Evolución del shock	76
Niveles de las clases de lípidos en suero y homogeneizado total de hígado	76
Composición en ácidos grasos de las clases de lípidos neutros	81
Contenido en clases de lípidos de la fracción mitocondrial de hígado	85
Composición en ácidos grasos de las clases de lípidos	89
Funcionalidad mitocondrial	92
Respiración	92
Actividad de la succinato-citocromo c re- ductasa	94
Relación composición lipídica-funcionalidad mitocondrial	95
Relaciones entre las alteraciones mitocondriales y la fisiopatología del shock endotóxico	95
Actividad de la prostaglandina sintetasa micro- somal de hígado	98
Shock hemorrágico	100
Contenido en clases de lípidos de la fracción mitocondrial de hígado	100
Funcionalidad mitocondrial: Respiración	101
Experimentación "in vitro" con fracción mitocondrial	102
Actividad de la fosfolipasa A <sub>2</sub>	103
Incorporación de ácidos grasos en los fosfolí- pidos mitocondriales	107
Actividad respiratoria	107

Estudio de la capacidad de retención de $\text{Ca}^{2+}$	110
CONCLUSIONES	113
BIBLIOGRAFIA	114

Nomenclatura de las clases de lípidos

Nombre sistemático	Nombre admitido	Abreviatura
x-monoacil-sn-glicerol	monoacilglicerol	MG
1,2(2,3)-diacil-sn-glicerol	diacilglicerol	DG
1,2,3-triacil-sn-glicerol	triacilglicerol	TG
1,2-diacil-sn-glicerol-3-fosfato	ac. sn-fosfatídico	
1,2-diacil-sn-glicero-3-fosfocolina	3-sn-fosfatidilcolina	PC
1(2)-monoacil-sn-glicero-3-fosfocolina	difosfatidilcolina	LPC
1,2-diacil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina	3-sn-fosfatidiletanolamina	PE
1(2)-monoacil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina	lisofosfatidiletanolamina	LPE
1,2-diacil-sn-glicero-3-fosfoinositol	3-sn-fosfatidilinositol	PI
1,2-diacil-sn-glicero-3-fosfoserina	3-sn-fosfatidilserina	PS
1,3-bis(3-sn-fosfatidil)glicerol	difosfatidilglicerol	DPG

RELACION DE LAS ABREVIATURA UTILIZADAS

<u>Nombre</u>	<u>Abreviatura</u>
Adenosin 5' mono-, di- y trifosfato	AMP, ADP, ATP
Coenzima A	Co A (o CoASH)
Acido etilendiaminotetracético	EDTA
Dinucleotido de flavina y adenina	FAD
Dinucleotido de nicotinamida y adenina y sus formas oxidada y reducida	NAD, NAD <sup>+</sup> , NADH
Fosfato del dinucleotide de nicotinamida y adenina y sus formas oxidada y reducida	NADP, NADP <sup>+</sup> , NADPH
Fosfato inorgánico	Pi
Tris(hidroximetil)aminometano	Tris
2,5-difeniloxazol	PPO
1,4-bis-(5-feniloxazolil-2)-benceno	POPOP
Heptosa	Hept
Galactosa	Gal
Glucosa	Glc
Glucosamina	Glc-NH <sub>2</sub>
Acidos grasos	AG
Acidos grasos libres	AGL
Etanolamina	EtNH
Colina	Col
Ac. 2-ceto-3-desoxioctanónico	KDO
Lipopolisacárido	LPS
Prostaglandina	PG
Tromboxanos	TX
Fosfolípidos	PL
Ac. 5,5-ditio-bis-2-nitrobenzólico	DTNB
Lipasa sensible a hormonas	LSH
Lipoproteina lipasa	LPL

Nombre

Abreviatura

Quilomicrones

QM

Lipoproteinas de baja densidad

LDL

Lipoproteinas de muy baja densidad

VLDL

Ditiotreitól

DTT

.INTRODUCCION



### SHOCK CIRCULATORIO

El shock ha sido reconocido como un síndrome clínico durante casi dos mil años, pero debido a su complejidad, en la actualidad, es todavía un fenómeno controvertido. Esencialmente es una manifestación patológica de amplitud sistémica, que aparece desde el momento en el que una lesión excede en intensidad o/y duración el nivel para el que los sistemas homeostáticos están adaptados. Ante tal lesión el organismo responde, intentando reequilibrar sus funciones vitales y sobrevivir, mediante una serie de cambios circulatorios y metabólicos de acuerdo con una dinámica, cuyas oscilaciones son inicialmente correctivas, pero pueden transformarse muy rápidamente en nocivas por sí mismas, con lo que el shock puede llegar a ser irreversible en ausencia de un tratamiento adecuado.

En realidad el shock no es un síndrome único desde el punto de vista etiológico, sino que bajo este término se incluyen una serie de síndromes que aparecen en casos de hemorragia grave, traumatismo, quemaduras, infarto de miocardio, obstrucción cardíaca, embolia pulmonar generalizada e infección bacteriana masiva, por mencionar sólo las causas más importantes. Por ello se utilizan corrientemente en clínica para los distintos tipos de shock clasificaciones y nomenclaturas relacionadas con su etiología.

Cualquiera que sea el mecanismo iniciador, el aspecto común a todo proceso de shock es la aparición de un fenómeno hemodinámico patológico, que implica una inadecuada perfusión tisular y se refleja en un metabolismo celular inadecuado. Este fenómeno, en combinación con otros factores, ocasiona lesiones celulares cuya magnitud determina la reversibilidad o irreversibilidad del shock.

Para intentar esclarecer la patofisiología del shock, se ha desarrollado en las últimas décadas una amplia labor de investigación basada fundamentalmente en estudios de modelos experimentales de shock. Los dos modelos más utilizados son:

- Endotóxico.- Se basa en la administración por vía intraperitoneal o intravenosa de endotoxinas bacterianas.
- Hemorrágico.- Consiste en provocar una hemorragia controlada.

Debido a la complejidad del shock, aunque existen numerosos datos sobre aspectos parciales de los procesos implicados en su patofisiología, no se conoce la relación entre ellos y, por tanto, no existe una teoría global que permita explicar dicho fenómeno.

METABOLISMO LIPIDICO EN EL SHOCK

En la última década se ha dedicado un esfuerzo creciente al estudio de las alteraciones metabólicas que acompañan al shock, pero la mayoría de las investigaciones han dirigido su atención a los cambios en el metabolismo de hidratos de carbono, mientras que relativamente pocas se han centrado en el metabolismo lipídico. Antes de pasar a comentar los resultados de estos estudios, repasaremos los órganos implicados en el metabolismo de los dos lípidos que actúan como sustratos energéticos principales, TG y AGL (figura 1). El tracto gastrointestinal y el tejido adiposo están representados como principales proveedores y el miocardio, el músculo esquelético y otros tejidos periféricos, incluido el adiposo, como principales consumidores y repositorios de metabolitos lipídicos. El hígado ocupa una posición intermedia, puesto que actúa como proveedor y consumidor.

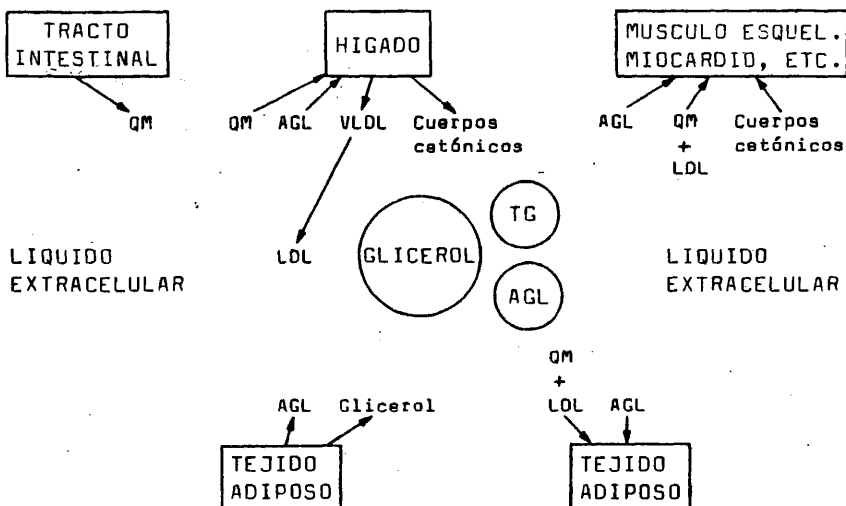


Figura 1.- Esquema del metabolismo de TG y AGL.

Tanto en el shock endotóxico como en el hemorrágico tienen lugar cambios en los niveles sanguíneos de TG y AGL. Se ha puesto de manifiesto en todos los tipos de shock estudiados una elevación en los niveles de TG (revisión de Spitzer, 1979), reflejada también en los niveles de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) responsables del transporte de TG (Sakaguchi y Sakaguchi, 1979). Sin embargo, con respecto a los niveles de AGL existen resultados contradictorios.

En el shock hemorrágico los resultados de los primeros estudios mostraron una elevación (Coran y cols., 1972), o bien la inexistencia de cambios en los niveles de AGL (Kovach y cols., 1970); pero en estudios posteriores se ha puesto de manifiesto una disminución en los mismos (Farago y cols., 1971; Kashyap y cols., 1975; Dánial y cols., 1978). El origen de estas discrepancias estriba probablemente en que en los primeros estudios para provocar la hemorragia se administró a los animales heparina, la cual ocasiona indirectamente la hidrólisis de TG en sangre con la consiguiente aparición de AGL. Este efecto de la heparina se basa en que origina la liberación a la sangre de la lipoproteína lipasa (LPL), que en condiciones normales no está presente en cantidades apreciables.

En lo que se refiere al shock endotóxico, Groves y cols. (1970), Kovach y cols. (1970) y Spitzer y cols. (1974) no encontraron cambio alguno en los niveles de AGL, mientras que Hirsch y cols. (1964) observaron una elevación inicial transitoria. En estudios más recientes Sakaguchi y Sakaguchi (1979) han observado el efecto de dos dosis distintas de LPS sobre los niveles de AGL en animales ayunados, encontrando con la dosis más baja un incremento inicial y después un descenso hasta valores por debajo de los controles. Con la dosis más alta, los niveles de AGL se mantuvieron siempre más bajos que los controles. Estas discrepancias se basan en unas condiciones experimentales distin-

tas, incluyendo diferentes dosis y forma de administración del LPS y fundamentalmente el que los animales hubieran sido sometidos o no a un tiempo de ayuno previo a la realización del experimento. Este aspecto es decisivo, pues los niveles de AGL en suero de animales no tratados se elevan gradualmente, a medida que aumenta el tiempo de ayuno (Sakaguchi y Sakaguchi, 1979).

La elevación de los niveles plasmáticos de TG después de la administración de LPS podría ser debida a un incremento en la producción o a una disminución en la utilización. Con respecto a la primera posibilidad, la elevación en los niveles de AGL provocada inicialmente por el LPS no es suficientemente grande, ni se mantiene un tiempo suficientemente largo, como para dar lugar a un incremento en la síntesis de TG en el hígado (Hirsch y cols., 1964; Sakaguchi y Sakaguchi, 1979). Sin embargo, la utilización de TG está disminuida, ya que se ha observado en corazón y tejido adiposo un descenso en la LPL, responsable de la hidrólisis de los TG plasmáticos para la incorporación de sus ácidos grasos en dichos tejidos (Spitzer, 1979; Sakaguchi y Sakaguchi, 1979). No se conoce el mecanismo de la disminución en la actividad de la LPL.

Aparte de la influencia de la dieta, los niveles de AGL en sangre están controlados por el balance entre su liberación y su captura y utilización. La liberación de AGL del tejido adiposo tiene lugar cuando predomina la lipólisis sobre la reesterificación. La velocidad con que se realiza la lipólisis depende fundamentalmente de la actividad de la lipasa sensible a hormonas (LSH) que está regulada por las catecolaminas y la insulina principalmente. Después de la administración de LPS, o de una hemorragia aguda, tiene lugar un aumento en los niveles de catecolaminas en sangre, que conduce a una disminución en la secreción de insulina. Tales cambios en los niveles de estas hormonas estimulan la lipólisis en el tejido adiposo, al igual que varias

prostaglandinas que se elevan en el shock endotóxico. Además, se ha observado un incremento en la actividad lipolítica bajo la estimulación con norepinefrina en adipocitos aislados de animales tratados con LPS, efecto que se reproduce "in vitro" exponiendo adipocitos aislados al LPS, lavándolos e incubándolos después en presencia de norepinefrina (Spitzer, 1974).

La explicación de que, a pesar de estos hechos, los niveles de AGL presenten un descenso probablemente está en los efectos de la disminución del flujo de sangre a través del tejido adiposo, que tiene lugar como consecuencia del shock tanto endotóxico (Spitzer, 1979) como hemorrágico (Kovach y cols., 1970; Nielson y Secher, 1970). En primer lugar, una inadecuada perfusión tisular podría retardar la transferencia de AGL del tejido a la circulación, como sugieren los resultados de Kashyap y col., (1975) que observaron una elevación en la concentración tisular de AGL en el shock hemorrágico. En segundo lugar, debido a la hipoxia la concentración tisular de lactato se eleva y el pH desciende. La acumulación de lactato y el pH bajo en el tejido adiposo disminuyen el efecto lipolítico de la norepinefrina e incrementan la reesterificación (Nahas y Poyart, 1967; Fredholm, 1971; Hjemdahl, 1976). De hecho, los resultados de Sakaguchi y Sakaguchi (1979) indican que la actividad de la LSH sólo se incrementa inicialmente después de la administración de LPS, para disminuir luego a valores por debajo de los controles.

Se ha puesto de manifiesto además, que en el shock endotóxico la velocidad de aparición del glicerol se incrementa considerablemente, mientras que la de AGL no cambia (Spitzer, 1979). La base de esta diferencia puede residir en que el incremento en la velocidad de reesterificación afecta a los AGL pero no al glicerol, que no participa en dicho proceso en el tejido adiposo.

Por otra parte, Daniel y cols. (1978) utilizando ácidos grasos marcados radioisotópicamente han observado en shock hemo-

rrágico y endotóxico una disminución en la velocidad de recambio de AGL en sangre, que indica tanto una menor movilización como una menor utilización. Además, han detectado una menor producción de CO<sub>2</sub> marcado que refleja una disminución en la oxidación de AGL. Paralelamente, Spitzer (1979) ha manifestado que después de la administración de LPS la contribución de los AGL a la energía en miocardio está notablemente disminuida y que este efecto se da también "in vitro" utilizando miocitos aislados incubados en presencia de LPS, lo cual sugiere una posible acción directa del LPS sobre dichas células.

### COMPOSICION Y ESTRUCTURA QUIMICA DE LAS ENDOTOXINAS

Las endotoxinas son lipopolisacáridos (LPS) que se encuentran en la pared celular de las bacterias gram negativas y se liberan al torrente circulatorio al ser fagocitadas estas. Cuando tiene lugar una invasión del organismo por este tipo de bacterias, las endotoxinas pueden alcanzar niveles en sangre capaces de ejercer una amplia gama de efectos biológicos sobre el organismo huésped (tabla 1) y de originar el shock. Por otra parte, introducidas en el torrente circulatorio de animales de experimentación, son capaces, incluso en cantidades mínimas, de inducir un shock circulatorio profundo.

NO TOXICAS	TOXICAS
Immunológicos	Pirogenicidad
Mitogenicidad para linfocitos B	Letalidad
Acción adyuvante	Fenómeno de Schwartzman
Activación de células B policlonales	Necrosis de médula ósea
Antigenicidad independiente del timo	Leucopenia
Activación de macrófagos	Leucocitosis
Incremento de la fagocitosis	Hipotensión
Incremento de la resistencia no específica a la infección	Aborto
Inducción de: síntesis de prostaglandinas, interferón, activador del plasminógeno, factor estimulante de colonias.	Necrosis tumoral
Activación del complemento	
Activación del factor Hageman	

Tabla 1: Actividades biológicas de las endotoxinas.

La extracción selectiva de productos de bacterias, que poseían actividad endotóxica, estableció la base para avances científicos significativos en la comprensión de su bioquímica (revisión de Wilkinson, 1977). Los dos métodos de extracción más extendidos son los descritos por Boivin y Mesrobeanu (1935) y Westphal y cols. (1952). El primero de ellos incluye una extracción con ácido tricloroacético 0.25M a 4°C y da lugar a preparaciones endotóxicas, que consisten fundamentalmente en LPS, pero contienen además proteínas y lípidos. El segundo procedimiento se basa en una extracción con fenol-agua (45:55, v/v) a 68°C, seguida de enfriamiento del extracto que separa dos fases. La fase acuosa contiene LPS en forma de complejo con ácidos nucleicos y su centrifugación posterior a 105.000xg rinde preparaciones libres de proteínas y ácidos nucleicos.

Además de estos procedimientos, otros investigadores han descrito distintos métodos igualmente útiles (tabla 2).

Tratamiento	Referencia bibliográfica
Diétilen glicol	Morgan y Partridge (1942)
Piridina-agua	Goebel y cols. (1945)
Diétil éter-agua	Ribi y cols. (1959)
Sulfóxido de dimetilo, 60°C	Adams (1967)
EDTA (pH 8.0-8.5), 37°C	Leive y cols. (1969)
Fenol-cloroformo-éter de petróleo	Galanos y cols. (1967)
NaCl 1M y citrato sódico 0.1M (pH 7.0), 0-4°C	Raynaud y cols. (1973)
Butanol-agua, 0-4°C	Morrison y Leive (1975)

Tabla 2. Otros métodos de extracción de LPS

Las preparaciones obtenidas con los distintos métodos de extracción contienen cantidades variables de impurezas, lo cual



oligosacárido, que contienen cada una tres o cuatro unidades diferentes de hexosa, entre las que se encuentran frecuentemente 6-desoxi- y 3,6-didesoxi-hexosas. En ellas residen los determinantes antigénicos y son específicas de especie.

La estructura básica del lípido A (figura 3) aislado de un amplio conjunto de bacterias es muy similar y está constituida por un esqueleto de glucosaminil- $\beta$ -1',6-glucosamina sustituido en las posiciones 1 y 4 por grupos fosfato, que pueden formar puentes pirofosfato con otro disacárido de glucosamina de otra unidad de lípido A. Los restantes grupos hidroxilo se encuentran generalmente esterificados por una amplia gama de ácidos grasos, entre los que predominan: 12:0, 14:0, 16:0, 18:0 y 18:1. Los grupos amino están formando enlaces amida con  $\beta$ -hidroxi-ácidos grasos, preferentemente OH-12:0 y OH-14:0, que son característicos de cada grupo de bacterias. En algunos casos los grupos hidroxilo de estos ácidos grasos están esterificados por otros ácidos grasos. Finalmente, es corriente la presencia de etanolamina en el lípido A.

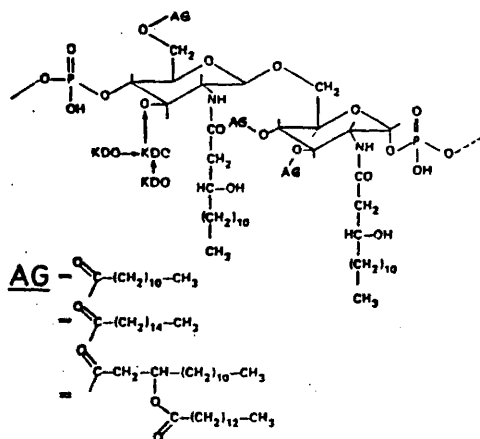


Figura 3.- Estructura del lípido A.

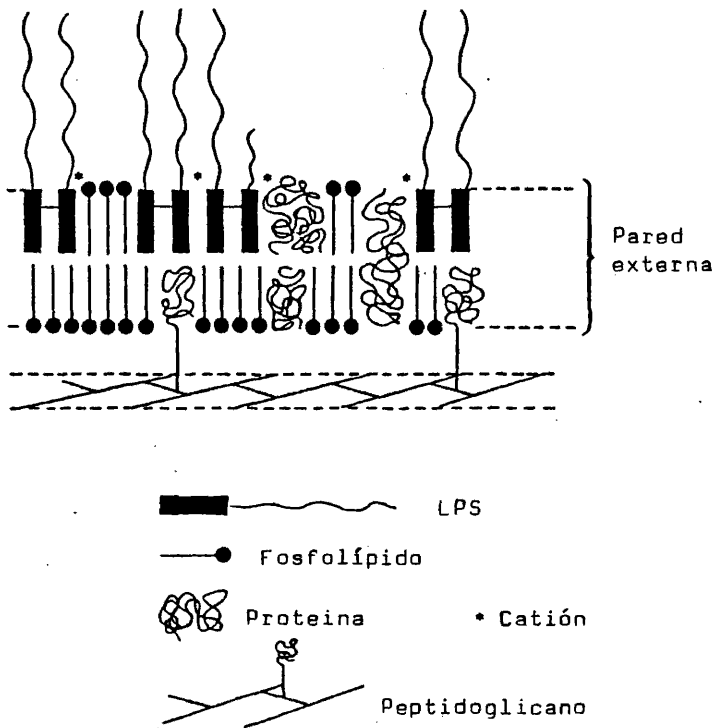


Fig. 4.- Modelo de la pared celular de bacterias Gram-negativas. Las moléculas de LPS pueden estar dispersas entre las moléculas de fosfolípidos y la repulsión electrostática entre las regiones de KDO-heptosa del núcleo de oligosacárido no existe debido a la presencia de moléculas de fosfolípidos que separan las de LPS. En otros casos los cationes bivalentes reducen esta repulsión. Cuando los fosfolípidos presentan grupos cargados negativamente la interacción requiere la participación de cationes. Las moléculas de proteínas también interaccionan con LPS y con los fosfolípidos quizá implicando a los cationes.

### COMPORTAMIENTO Y PROPIEDADES FISICOQUIMICAS DEL LPS EN DISOLUCION

Las moléculas de LPS poseen carácter anfipático, pues contienen una región hidrófila (polisacárido) y otra hidrófoba (lípidos A). En solución acuosa a pH 7 se encuentran en forma de polianión, debido a la ionización de los grupos fosfato, y tienden a formar agregados polidispersos con un tamaño de partícula de varios millones de Dalton. La microscopía electrónica ha revelado la existencia de estructuras características que recuerdan fragmentos de membrana y pueden presentar varias formas, en dependencia del organismo de origen y del procedimiento de extracción: discos, lamelas, vesículas (revisión de Kabir y cols., 1978). A partir de estos estudios se han propuesto modelos moleculares, según los cuales los agregados están constituidos por bicapas de LPS semejantes a las membranas biológicas (figura 5).

Las fuerzas, que intervienen en la autoagregación de las moléculas de LPS, son similares probablemente a las implicadas en la unión de estas macromoléculas a los otros componentes de la pared celular externa de las bacterias, como interacciones hidrofóbicas, fuerzas mediadas por cationes metálicos y puentes de hidrógeno (figura 4). Así los agregados pueden dispersarse mediante el tratamiento con detergentes, como dodecilsulfato sódico, Triton X-100 y desoxicolato sódico o con agentes quelantes, como EDTA (revisión de Wilkinson, 1977). Todos estos tratamientos dan lugar a cambios, tanto en las propiedades fisicoquímicas del LPS, como en su actividad biológica.

Los estudios más recientes de Shands y Chun (1980) han indicado que la subunidad básica de LPS de *S. typhimurium* es un dímero.

### RELACION ESTRUCTURA ACTIVIDAD BIOLOGICA

#### A. PAPEL DEL LPS COMO COMPONENTE DE LA PARED EXTERNA DE BACTERIAS.

La pared externa de bacterias es muy rica en PE y bastante deficiente en glicerofosfolípidos ácidos en comparación con otras membranas (Osborn y cols., 1972). Esto hace suponer que quizá la proporción KDO-lípido A cargada negativamente posea un papel en el ensamblaje de dicha pared, similar al que desempeñan los glicerofosfolípidos ácidos en otros tipos de membranas.

También parece claro que el LPS es necesario para el funcionamiento de la pared externa como barrera de permeabilidad y que contribuye a su rigidez (revisión de Nikaido, 1973).

#### B. ACTIVIDAD TOXICA.

El primer paso en la elucidación del mecanismo primario de acción de las endotoxinas fué la caracterización de la porción activa de las moléculas de LPS. Las investigaciones en este campo avanzaron considerablemente con el descubrimiento de la existencia de ciertos mutantes rugosos de bacterias, que son deficientes en determinadas glucosiltransferasas y por ello producen un LPS con la región de polisacárido incompleta. Uno de estos mutantes (Salmonella minnesota R595) es deficiente en heptosas y su LPS contiene únicamente lípido A y KDO. La demostración de que las preparaciones de LPS obtenidas a partir de este mutante manifestaban todas las propiedades tóxicas de las preparaciones obtenidas de bacterias lisas, estableció firmemente que el lípido A desempeña un papel dominante en la endotoxicidad (revisión de Kabir y cols., 1978).

Por otra parte, se han utilizado algunos procedimientos físicoquímicos para modificar selectivamente determinadas porciones de la molécula de LPS, estudiando las variaciones en la acti

	Estructura	Agregado en disolución	Actividad tóxica	Unión a membranas
<u>LPS nativo</u>		n (bicapa)	+	+
Lisa Estirpe Rugosa		bicapa	+	++
<u>Tratamiento LPS</u>		No forma	-	-
Hidrólisis ácida suave (Acético 1% 100°C, 2-3 h)		~10n	+	+
Hidrólisis alcalina suave (NaOH 0.25 N 56°C, 1 h)		~n/10 (monocapa)	++	++
Hidroxiilamina en medio alcalino		No forma	-	-
Polimixina B (equimolar)		>2n	-	-
<u>Tratamiento Lípido A</u>		bicapa	+	+
Succinilación				

Tabla 3. Efectos de las modificaciones químicas sobre las propiedades del LPS

vidad tóxica que se producían (tabla 3). Los resultados de estos estudios sugieren que la porción de polisacárido del LPS no es fundamental para la toxicidad, pero sirve de transportador para la porción lipídica insoluble en agua. Además, participa en las interacciones del LPS con ciertos tipos de células y de proteínas humorales que influyen sobre su distribución en un animal y sobre las reacciones inmunes que provoca. Así mismo, los ácidos grasos aparecían como componentes funcionales fundamentales de la molécula de LPS, lo cual está apoyado por estudios posteriores, en los que se han encontrado ciertas actividades tóxicas propias de las endotoxinas en: varios N-acil derivados de glucosamina (Behling y cols., 1976) y complejos de ácido mirístico con albúmina y concanavalina A, dimetilmiristamida con concanavalina A y esfingosina con albúmina (Bradley, 1976; Bradley y cols., 1977).

Nowotny y cols. (1975) han aislado una fracción de polisacárido que posee ciertas actividades biológicas adscritas a las endotoxinas. No es extraño que varias fracciones de la molécula de LPS presenten actividad biológica, teniendo en cuenta que las endotoxinas ejercen sobre el huésped una colección de efectos (tabla 1). Por otra parte, es necesario indicar también que existen diferencias entre la actividad biológica de las preparaciones de LPS libres de proteínas y las obtenidas por extracción con TCA o butanol, fundamentalmente en lo que se refiere a la respuesta inmune (revisión de Morrison y Ryan, 1980).

#### C. INTERACCIÓN CON MEMBRANAS.

La interacción de las endotoxinas con las membranas celulares es de una importancia considerable, pues constituye el primer paso en el desarrollo de su acción tóxica a nivel celular.

Se ha observado que los LPS presentan afinidad por las membranas de numerosos tipos de células de mamíferos (revisiones de

Kabir y cols., 1978; Morrison y Ulevitch, 1978; Bradley, 1979). Los resultados de numerosos estudios de modificación química del LPS han permitido concluir que su porción lipídica es esencial para la unión a membranas (tabla 3). Esta idea está apoyada además por el hecho de que los fosfolípidos y el colesterol inhiben la unión del LPS a la membrana de eritrocitos (Neter y cols., 1955).

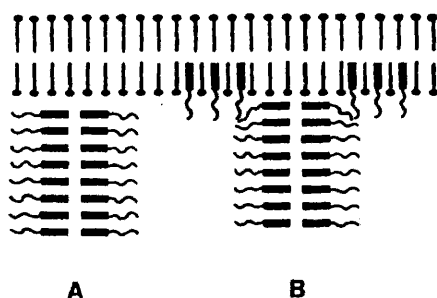
Se han propuesto dos hipótesis para explicar la base de la unión del LPS a membranas: a/ interacción con un receptor específico de membrana y b/ incorporación en la bicapa lipídica de la membrana.

Con respecto a la existencia de receptores de membrana específicos para el LPS existen pocos datos. Únicamente, Springer y Auye (1977) han aislado y caracterizado una lipoglucoproteína de membrana de eritrocitos, que une LPS específica y reversiblemente y sus resultados sugieren que sólo el componente proteico de este receptor de LPS está implicado en la unión.

Shands (1973) explicó la interacción del LPS con las membranas de los eritrocitos sobre la base de su modelo molecular de los agregados de LPS y de estudios de microscopía electrónica, en los que demostró que el LPS se unía a la membrana por los bordes de las bicapas que forman sus moléculas (figura 5). Considera este autor que este proceso implica interacciones hidrofóbicas entre grupos de las moléculas de LPS y grupos o receptores de la membrana.

Figura 5.- Modelo de la interacción del LPS con una bicapa lipídica de membrana.

- A. Unión por los bordes de la bicapa de LPS en la que algunos ácidos grasos de la región de lípido A podrían solubilizarse en la membrana.
- B. Apertura de la bicapa de LPS para permitir la interacción de los ácidos grasos.



El mecanismo planteado concuerda con los resultados de varios estudios. En primer lugar, se observó que los LPS tratados con álcalis presentaban una mayor afinidad hacia los eritrocitos (Neter, 1956) y además causaban su lisis (Ciznar y Shands, 1971) actividad que no poseían los LPS nativos. Shands (1971) explicó estas diferencias considerando que en los LPS nativos los ácidos grasos unidos por enlace éster y los unidos por enlace amida se encuentran recluidos en el interior de la estructura en bicapa, mientras que en los LPS tratados, reducidos a monocapa, podrían quedar expuestos hacia el exterior más grupos acilo.

Paralelamente se puso de manifiesto que el calentamiento a 100°C de los LPS también incrementaba su afinidad hacia los eritrocitos (Lüderitz y cols., 1958) y linfocitos (Kabir y Rosentreich, 1977), si bien en menor magnitud que el tratamiento con álcali. La explicación de este hecho no está totalmente clara, pero es posible que se base en que debido al calentamiento los LPS sufran una desagregación, o bien un cambio conformacional.

En el caso de monocitos, polimorfonucleares neutrófilos, linfocitos B y T y plaquetas se ha concluido que la interacción de su membrana con el LPS reside en una fracción lipídica compuesta fundamentalmente por glicerofosfolípidos (revisión de Morrison y Ulevitch, 1978). Gimber y Rafter (1969) propusieron que la interacción LPS-fosfolípidos puede implicar cationes bivalentes, o bien basarse simplemente en interacciones hidrofóbicas entre grupos acilo.

Por otra parte, se han realizado estudios con monocapas y bicapas fosfolipídicas y liposomas, los cuales han demostrado que el LPS posee afinidad por dichos sistemas y es capaz de incorporarse en ellos. Este hecho apoya la idea de que la unión del LPS con las membranas celulares implique una atracción entre la región lipídica del mismo y los lípidos de membrana.

Schuster y cols. (1970) y Benedetto y cols. (1973) observaron que el LPS tenía un efecto desestabilizador sobre bicapas compuestas por PC y colesterol. Tales resultados sugieren la posibilidad de que la interacción del LPS con las membranas celulares de mamíferos también de lugar a su desestabilización.

Recientemente Onji y Liu (1979) han demostrado que el LPS provoca cambios en la carga superficial de liposomas fosfolipídicos, siendo necesaria la presencia de  $Ca^{2+}$  en el caso de liposomas con carga negativa, pero no en el de liposomas con carga positiva o neutra. Estos resultados indican que el LPS interacciona con los liposomas tanto hidrofóbica como electrostáticamente. Además, sugieren la posibilidad de que la interacción del LPS con la membrana celular provoque cambios en la carga superficial de la bicapa fosfolipídica, alterando así sus propiedades biológicas.

#### ACCION DEL LPS A NIVEL CELULAR

Practicamente todos los órganos se ven afectados en la endotoxemia, pero aún no está completamente claro en cuales el efecto se basa en una acción tóxica directa del LPS y en cuales se basa más bien en la acción de otros efectores, cuya aparición es secundaria a dicho fenómeno. Asimismo, tampoco se conoce bien la participación de la lesión de los distintos órganos en el desarrollo del shock endotóxico.

Debido a su importancia central en los mecanismos de reacción del organismo se ha centrado gran atención sobre la acción tóxica del LPS sobre el hígado, las células del endotelio vascular, las plaquetas y las células del sistema inmunológico (revisiones de Utili y cols., 1977; Morrison y Ulevitch, 1978; Bradley, 1979).

#### ACCION SOBRE LAS CELULAS DEL SISTEMA INMUNOLOGICO

Macrófagos, leucocitos polimorfonucleares y linfocitos son sensibles al LPS.

##### Macrófagos

Los macrófagos liberan selectivamente enzimas lisosomales después de la exposición al LPS (Welscher y Cruchoaud, 1976). Activados "in vitro" por LPS, destruyen células tumorigénicas por un mecanismo no fagocítico que requiere un contacto directo y en el cual se transfieren los lisosomas del macrófago al citoplasma de la célula susceptible que subsecuentemente se lisa. Esta acción citotóxica es inhibida por hidrocortisona, agente estabilizador de membranas, que impide la fusión de las mismas requerida para la transferencia. Asimismo, es inhibida por el azul trypan, inhibidor de enzimas lisosomales. Por todo ello, Hibbs (1974) ha propuesto que dichas enzimas son los efectores de los macrófagos

activados.

Bradley (1979) sugiere que tanto la citotoxicidad sobre células humerales mediada por macrófagos, como la mitogenicidad, inducidas ambas por el LPS, implican la acción de los lisosomas en el ciclo celular. Si tal acción se centra en el núcleo de su propia célula (figura 6), la consecuencia es mitogenicidad, pero si se centra en el núcleo de otro tipo de célula el resultado es la citotoxicidad.

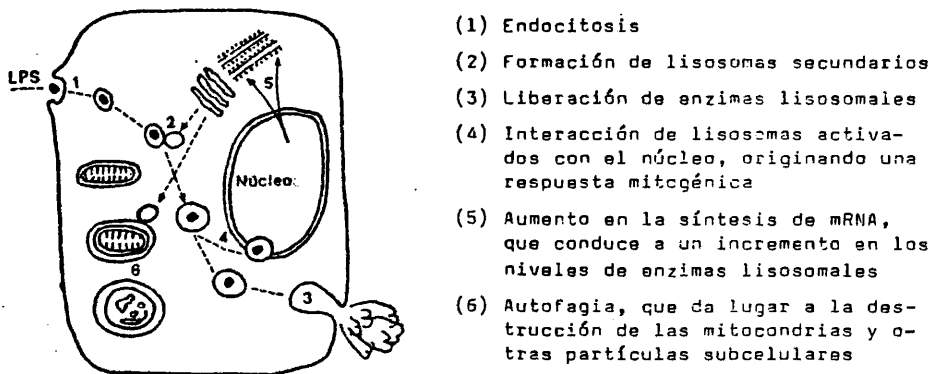


Figura. 6.- Consecuencias celulares de las interacciones entre el LPS y los lisosomas.

Rosenstreich y cols. (1977) observaron que macrófagos de ratón sintetizaban y liberaban grandes cantidades de prostaglandinas  $PGE_2$  y  $PGF_{2\alpha}$  después de la exposición "in vitro" al LPS, mientras que los de una estirpe resistente al LPS no presentaron esta respuesta. Kurland y Bockman (1978) también han descrito la producción de  $PGE_1$  y  $PGE_2$  bajo la acción del LPS. Este fenómeno podría tener una gran importancia, considerando que, como se detallará mas adelante, existen datos que sugieren que las prosta-

glandinas participan en la patofisiología del shock endotóxico y que durante el desarrollo del mismo se elevan los niveles sanguíneos de PGE<sub>2</sub> y PGF<sub>2α</sub>.

Otros mediadores liberados por los macrófagos en respuesta a la endotoxina son sustancias procoagulantes, pirógenos, colagenasa y el factor estimulante de colonias, necesario para el crecimiento "in vitro" de colonias de monocitos y granulocitos.

A la vista de estos datos y de otros experimentos "in vivo" (revisión de Morrison y Ulevitch, 1978) es tentador especular sobre un papel central de los macrófagos en la elaboración de mediadores responsables de muchos de los efectos de las endotoxinas "in vivo".

#### Leucocitos polimorfonucleares

El LPS es capaz de inducir "in vitro" la liberación de enzimas lisosomales en leucocitos polimorfonucleares (White y Montgomery, 1977). Este hecho tiene importancia, considerando que dichas células están implicadas como mediadores de la lesión tisular en muchos procesos inflamatorios, incluyendo la reacción de Shwartzman. La lesión tisular está ocasionada en su mayor parte por los constituyentes lisosomales de leucocitos polimorfonucleares (Dean y Barret, 1976), sustancias que son capaces de digerir los componentes del tejido conectivo, incrementar la permeabilidad vascular y activar otros mediadores de la inflamación como las quininas.

La participación de este fenómeno en el desarrollo del shock está apoyada por la observación de que si se eliminan de la circulación los leucocitos polimorfonucleares en algunas especies animales, se altera profundamente su respuesta a la administración intravenosa de LPS. Sin embargo, esto no ocurre en primates (Pingleton y cols., 1975).

Por otra parte se han descrito otros efectos "in vitro" del LPS sobre estas células, como la inhibición de la actividad ATP-

asa de la membrana plasmática y ciertos cambios en sus funciones y en determinadas actividades metabólicas (revisión de Morrison y Ulevitch, 1978).

#### Linfocitos

Los linfocitos B sufren mitogénesis bajo la acción del LPS, que provoca una serie de cambios bioquímicos después de su unión. Estos cambios incluyen una elevación de los niveles de c-GMP y un aumento en la captura de aminoácidos e iones, preferentemente  $Ca^{2+}$ . Este ión parece jugar un papel importante, pues el ionóforo de cationes bivalentes A23187 también induce la transformación y además, este efecto no tiene lugar cuando el  $Ca^{2+}$  está ausente en el medio (Luckasen y cols., 1974). A su vez, el c-GMP es mitogénico por sí mismo, lo cual ha conducido a Watson (1975) a sugerir que dicho compuesto actúe como segundo mensajero de la acción de los LPS sobre los linfocitos B.

Por otra parte, el LPS puede inducir la diferenciación de los linfocitos B "in vitro", dando lugar a la aparición de células que sintetizan inmunoglobulinas G y M (Kearney y cols., 1976)

También es capaz el LPS de influir sobre la función tanto de los linfocitos T cooperadores como de otros tipos de linfocitos.

#### ACCION SOBRE LOS ERITROCITOS

Altas concentraciones de LPS sometido a hidrólisis alcalina suave causan la lisis de los eritrocitos (Ciznár y Shands, 1971). Sin embargo, concentraciones mas bajas del mismo producto, provocan una alteración en el contenido de  $K^+$  y  $Na^+$  de los eritrocitos, debido quizá a un incremento en la permeabilidad de estos iones a través de ciertas regiones de la membrana de los eritrocitos, posiblemente combinado con un efecto indirecto sobre la actividad ATPasa dependiente de  $Na^+$  y  $K^+$  presente en la membrana.

#### ACCION SOBRE LAS PLAQUETAS

A partir de los resultados de distintos tipos de experimentación, tanto "in vivo" como "in vitro", se han propuesto (revisión de Morrison y Ulevitch, 1978 y Walker, 1979) tres mecanismos a través de los cuales las interacciones de las endotoxinas con las plaquetas pueden contribuir al síndrome del shock: a/ liberación de sustancias vasoactivas tales como histamina y serotonina; b/ formación de agregados plaquetarios intravasculares oclusivos; c/ inducción de coagulación intravascular diseminada por generación de la actividad del factor plaquetario 3.

Existen diferencias fundamentales entre distintas especies animales en la importancia relativa de esta respuesta, ya que los mecanismos de interacción endotoxina-plaqueta dependen críticamente de la presencia de sitios de adherencia inmunológica en la membrana de las plaquetas, la cual no se da en todas las especies animales. La respuesta en las plaquetas que poseen dichos sitios, se inicia con la unión de la endotoxina a la membrana plaquetaria a través de la región de lípido A. Esta unión permite la asociación de los componentes de la ruta alternativa del complemento sobre la porción de polisacárido de la endotoxina, que en el microentorno de la membrana plaquetaria origina el ensamblamiento de los componentes terminales del complemento y la subsecuente lisis de las plaquetas.

Además de esta respuesta lítica, Gades y Morrison (1978) han descrito una respuesta secretora "in vitro" independiente del complemento, que es dependiente de energía y parece basarse en un efecto ionóforo para el  $Ca^{2+}$  llevado a cabo por el LPS. Esta respuesta sólo se manifiesta con el LPS del mutante rugoso S. minnesota R595 deficiente en polisacárido.

La respuesta de las plaquetas carentes de sitios de adherencia inmunológica a las endotoxinas está definida mucho menos claramente y existen resultados conflictivos en la literatura. Parece que la mayoría de las endotoxinas ejercen pocos o ningún efecto

to sobre este tipo de plaquetas, entre las que se incluyen las humanas (revisión de Morrison y Ulevitch, 1978).

#### ACCION SOBRE LAS CELULAS RETICULO-ENDOTELIALES

Existen evidencias experimentales que sugieren que los efectos de la interacción de la endotoxina con las células retículo-endoteliales pueden contribuir a la patogénesis del shock endotóxico. En primer lugar, los estudios de inmunofluorescencia indirecta han mostrado que el LPS se localiza en el endotelio de los capilares y ciertos vasos en varios tejidos, incluido el hígado, transcurrido cierto tiempo después de su inyección. En segundo lugar, se ha demostrado la lesión de las células retículo-endoteliales mediante estudios morfológicos y de recambio por administración de <sup>3</sup>H-timidina seguida de autorradiografía, ambos "in vivo". Además esta lesión es independiente del complemento (revisión de Morrison y Ulevitch, 1978).

Por otra parte, la perfusión "in situ" de un riñón con endotoxina, seguida de administración sistémica de una segunda dosis de endotoxina, da lugar a la aparición de una reacción de Schwartzman unilateral en el riñón perfundido (Raiji y cols., 1977). Estos autores sugieren que el fenómeno inicial en el desarrollo de la necrosis cortical del riñón podría ser un efecto local de la endotoxina sobre el endotelio vascular del mismo.

MacIntyre y cols. (1978) han demostrado que las células retículo-endoteliales son capaces de capturar y transformar la PGH<sub>2</sub> de origen plaquetario en PGI potente agente antiagregante plaquetario e hipotensor. La lesión de las células retículo-endoteliales puede dar lugar a que la PGH<sub>2</sub> se acumule en el medio y en la plaqueta siendo transformado en tromboxano TXA<sub>2</sub>, potente agente vasoconstrictor y agregante plaquetario, que es liberado al torrente circulatorio. De hecho Cook y cols. (1980) han demostrado una marcada aparición en sangre de TXA<sub>2</sub> después de la administración de endotoxina y sus resultados sugieren que este compuesto

es un factor primario en la patogénesis del shock.

Alternativamente, la lesión de las células puede exponer la membrana basal vascular y aportar así un lugar de activación del factor Hageman de la coagulación. Si esto ocurriese, no sólo se iniciaría una coagulación localizada, sino también la elaboración de potentes agentes vasoactivos, como la bradiquinina. Por tanto, la lesión original podría quedar amplificada enormemente a través de un conjunto de mediadores.

#### ACCION SOBRE EL HIGADO

En la endotoxemia se ven alternadas numerosas actividades metabólicas del hígado, habiéndose observado una desaparición de las reservas de hidratos de carbono, una inhibición de la inducción de ciertas enzimas y de la gluconeogénesis (revisiones de Utili y cols., 1977 y Goodrum y cols., 1978). El LPS induce inicialmente una hiperglucemia transitoria que resulta de una salida incrementada de glucosa hepática, debida a un aumento en la glucogenolisis. Pero seguidamente se desarrolla una hipoglucemia marcada, como consecuencia de una captura elevada de glucosa por los tejidos periféricos y de la imposibilidad del hígado para compensarla con un aumento en la salida de glucosa (Wolfe y cols. 1977). Estos efectos sobre el metabolismo hepático han sido relacionados por muchos autores con los cambios observados en la actividad de enzimas implicadas en las rutas metabólicas de los hidratos de carbono (revisión de Bradley, 1979).

Se ha propuesto que el LPS actúa indirectamente por mediación de la liberación de epinefrina, pero esta hipótesis no ha sido corroborada por los resultados de varios estudios experimentales (Zwadyk y Snyder, 1973). De cualquier forma, los estudios de Filkins y cols. (1975) y Filkins y Cornell (1974) sugieren que la mayoría de los cambios en el metabolismo de hidratos de carbono son secundarios al shock. Estos autores observaron inicialmente que en el transcurso del shock traumático tenían lugar

cambios en la glucemia semejantes a los observados en el shock endotóxico. Posteriormente, midiendo la conversión de alanina en glucosa "in vitro" en hepatocitos aislados e "in vivo", concluyeron que la gluconeogénesis está disminuida en ambos tipos de shock.

Un aspecto fundamental en la dilucidación del papel del hígado en la patofisiología del shock endotóxico es si las células parenquimatosas son afectadas directamente por el LPS o no. Existen datos de distintas líneas de investigación que sugieren una respuesta afirmativa, como se comenta en detalle a continuación.

Estudios de distribución de  $^{51}\text{Cr}$ -LPS han demostrado que el hígado juega un papel principal en la eliminación de la endotoxina circulante de la sangre y además, parece ser el órgano más importante en la inactivación de la toxicidad del LPS (rev. de Utili y cols., 1977). Así, el hígado de ratón captura en una hora más del 80% del LPS inyectado por vía intravenosa (Walker y Snyder, 1978). Cerca del 45% del LPS se encuentra asociado con la fracción nuclear, el 20% con la mitocondrial-lisosomal y el 30% con la soluble, si bien, no se ha establecido definitivamente que estos valores reflejen una verdadera distribución intracelular del LPS, pues puede tener lugar una redistribución durante la preparación y separación de las fracciones subcelulares. De cualquier forma, más del 75% del LPS está asociado con los hepatocitos (Zlydaszyk y Moon, 1976), lo cual prueba que el LPS tiene acceso a dichas células e interacciona con ellas.

La interacción del LPS con la membrana plasmática de los hepatocitos ha sido demostrada en estudios "in vitro" con hepatocitos aislados de conejo mediante técnicas de inmunofluorescencia (Ramadori y cols., 1979) y también en estudios de unión de  $^{14}\text{C}$ -LPS a hepatocitos aislados de rata realizados recientemente en nuestro laboratorio (Portolés, 1980). A la vista de los re

sultados de estos últimos estudios, puede concluirse que en el proceso de unión del LPS a hepatocitos aislados no parecen estar implicados receptores específicos de membrana; por ello puede pensarse en un mecanismo de unión inespecífico en el que la porción lipídica del LPS se pone en contacto con los grupos hidrofóbicos presentes en la membrana celular. Teniendo en cuenta la actividad fagocitárea de los hepatocitos, esta unión podría estar relacionada con los procesos normales de endocitosis celular.

Los estudios morfológicos por microscopía óptica y electrónica han puesto de manifiesto la aparición de una serie de cambios a nivel celular y subcelular después de la inyección de dosis de LPS letales o próximas a ellas en distintos animales de experimentación (revisión de Utili y cols., 1977; Nordstoga y Aasen, 1979). Las células se hinchan y lo mismo ocurre con estructuras subcelulares como el retículo endoplásmico y las mitocondrias. Estas últimas llegan finalmente a presentar una ruptura de sus membranas y una completa desaparición de la estructura interna mitocondrial. En los lisosomas disminuye el número de partículas densas. La lesión de los hepatocitos puede llegar en las etapas finales a la liberación de materiales citoplasmáticos y a la muerte celular.

Se ha dedicado la máxima atención a las alteraciones en las mitocondrias debido a su importancia capital para la célula. Antes de profundizar en este campo, se describirán los aspectos estructurales y funcionales de las mitocondrias, necesarios para su comprensión.

CARACTERISTICAS ESTRUCTURALES Y FUNCIONALES DE LAS MEMBRANAS MITOCONDRIALES

La mitocondria posee una membrana externa, un espacio intermembranoso, una membrana interna y una matriz.

1) Membrana externa:

Solamente una minoría de las enzimas mitocondriales se encuentra localizada en la membrana externa (tabla 4) (revisión de De-Pierre y Ernster, 1977).

Enzimas	
Membrana externa	NADH-citocromo $b_5$ reductasa
	Citocromo $b_5$
	Monoamino oxidasa
	Acil graso-CoA sintetasa
	Fosfolipasa $A_2$
	Glicerol-P-acil transferasa
	Lisofosfatidato-acil transferasa
Membrana interna	Componentes de la cadena respiratoria
	Sistema de fosforilación ligado a la cadena respiratoria (ATPasa $F_1$ )
	NADH deshidrogenasa (sensible a antimicina)
	Succinato deshidrogenasa
	$\beta$ -hidroxibutirato deshidrogenasa
	Fosfolipasa $A_2$
Carnitina-acil transferasa	

Tabla 4.- Localización de los catalizadores en las membranas de las mitocondrias de hígado de rata.

Se acepta de forma general que la membrana externa es permeable a moléculas de pesos moleculares de varios miles, si bien

esta permeabilidad no refleja su composición, pues posee una relación fosfolípidos/proteína doble que la correspondiente a la de la membrana interna. Además contiene una cantidad significativa de colesterol, componente que disminuye la permeabilidad de membranas artificiales a sustancias no lipídicas (Ernster y Kuylenstierna, 1970). Por ello, se ha planteado la posibilidad de que esta alta permeabilidad de la membrana externa sea un artefacto, debido quizá a la distensión de su estructura durante el aislamiento de la fracción mitocondrial (Tedeschi, 1971).

#### Membrana interna:

En la membrana interna mitocondrial residen la cadena respiratoria, sistema enzimático, que transfiere al oxígeno los electrones recogidos de una gran variedad de sustratos metabólicos (figura 9) y además, otros procesos de transducción de energía relacionados con ella, como la síntesis de ATP (tabla 4). Debido a ello posee una complicada organización estructural y es muy rica en enzimas.

La membrana mitocondrial interna es posiblemente la membrana mas rica en proteína, pues contiene aproximadamente un 75% de proteína y un 25% de lípidos. La proteína estructural representa el 60-70% del total de proteína y probablemente constituye un esqueleto para la colocación específica de los componentes de la cadena respiratoria en la membrana. Los lípidos de esta membrana son en un 90% fosfolípidos (tabla 5) y constituyen un requerimiento esencial para la función de todas sus estructuras.

Los fosfolípidos de la membrana interna difieren en su composición de los de la externa, presentando la peculiaridad de un alto contenido en DPG (revisión de McMurray, 1973). Además, dichos fosfolípidos poseen una distribución asimétrica en las dos caras de la bicapa (Krebs y cols., 1979), de forma que el orden de abundancia en la cara externa o citoplasmática es: PC>PE>DPG

y en la interna o de la matriz es PE>DPG>PC (tabla 5).

	Mitoc. completa	Membrana interna		Membrana externa	
		Cara interna	Cara externa	Total	
PC	40.5	11.0	28.0	37.9	45.4
LPC	1.4			0.6	1.8
PE	34.7	21.0	13.0	38.3	30.4
PI	6.6			2.0	8.4
SM	2.4			0.8	4.4
DPG	14.8	18.0	6.0	20.4	9.5

Tabla 5. Composición en fosfolípidos de las membranas mitocondriales de hígado de rata.

También en la composición en ácidos grasos de los fosfolípidos existen diferencias entre las dos membranas mitocondriales pues los constituyentes de la interna son más ricos en ácidos grasos insaturados (revisión de McMurray, 1973) (tabla 6). En este aspecto son interesantes además, las diferencias entre las distintas clases de fosfolípidos en cuanto al contenido en ácidos grasos insaturados, ya que PC es muy rica en 18:2 y 20:4, PE lo es más en 20:4 y DPG sólo es rica en 18:2, el cual es, por otra parte, su ácido graso mayoritario.

Con respecto a la distribución posicional de los grupos acilo en los fosfolípidos de las membranas mitocondriales (tabla 7) cabe resaltar que, como ocurre en general en las demás membranas, la posición sn-1 está ocupada preferentemente por ácidos grasos saturados o monoinsaturados, mientras que en la posición sn-2 se encuentran los de mayor número de insaturaciones. La excepción está en el DPG, que presenta 18:2 en las dos posiciones (Pfeiffer y cols., 1979).

		Acidos grasos (como % del total de ac. grasos en peso)								
		14:0	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	20:3	20:4	22:6
PC	Mitoc. completa	0.4	27.0	3.9	21.6	13.0	12.4	1.3	17.7	2.9
	Memb. interna	0.3	27.1	3.6	18.0	16.2	15.8	1.0	18.5	3.8
	Memb. externa	0.4	27.0	4.1	21.0	13.5	13.5	1.1	15.7	3.5
DPG	Mitoc. completa	0.2	7.0	7.6	3.6	19.9	58.8	1.2	1.8	
	Memb. interna	0.7	7.0	6.5	4.3	19.7	58.6	2.4	1.5	
PE	Mitoc. completa	0.3	26.6	3.2	27.3	12.0	5.4		22.0	3.2
	Memb. interna	1.2	19.6	1.0	24.8	13.0	8.5	1.9	23.5	5.6
	Memb. externa	0.6	25.3	2.5	25.5	10.0	4.7	0.1	22.8	8.0
PI	Mitoc. completa		26.3	5.8	38.4	14.0	4.2		7.6	3.2
	Memb. externa	2.0	28.7	4.9	33.0	16.2	6.6		7.2	4.5

Tabla 6. Composición en ácidos grasos de las clases de fosfolípidos predominantes en las membranas mitocondriales de hígado de rata.

		Acidos grasos (nmoles/mg proteína mitocondrial)										
		14:0	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	20:3	20:4	20:5	22:5	22:6
PC	C <sub>1</sub>	0.6	37.8	3.5	27.7	7.3	3.5	0.1	0.3		0.1	0.1
	C <sub>2</sub>	0.2	3.7	1.5	1.9	5.6	17.9	2.4	31.6	3.5	2.6	11.5
PE	C <sub>1</sub>	0.2	31.4	1.1	24.2	6.2	0.8	0.1				
	C <sub>2</sub>	0.1	1.1	0.4	0.6	1.8	6.4	0.8	27.7	3.0	4.5	19.7
DPG	C <sub>1</sub>	0.2	1.0	1.3		0.4	26.0	0.1				
	C <sub>2</sub>		0.5	1.2		8.3	19.0					
PI	C <sub>1</sub>	0.2	2.5	0.2	5.8		0.1	0.1	0.5			
	C <sub>2</sub>		0.4		0.8	0.2	0.3	0.2	7.4			0.2
Total	C <sub>1</sub>	1.2	72.7	6.1	57.7	13.9	30.4	0.4	0.8		0.1	0.1
	C <sub>2</sub>	0.3	5.7	3.1	3.3	15.9	43.6	3.4	66.7	6.5	7.1	31.4

Tabla 7.- Distribución posicional de los grupos acilo de las clases principales de lípidos mitocondriales.

El papel de los fosfolípidos en la función de la membrana interna mitocondrial parece residir a nivel de los sistemas enzimáticos organizados. Por ejemplo, la cadena respiratoria está compuesta por cuatro complejos, cada uno formado por un mosaico de lípidos y proteínas. Los fosfolípidos son esenciales para el funcionamiento de los complejos como un todo, ya que su organización requiere un estado conformacional especial de las proteínas componentes, que se mantiene gracias a las interacciones con el entorno fosfolipídico. Al mismo tiempo, la organización de los complejos representa una disposición adecuada de las proteínas dentro del mosaico, que se basa en la presencia de las moléculas de los fosfolípidos intercaladas entre ellas (revisiones de Depierre y Ernster, 1977 y Gemmel, 1978).

La demostración de la dependencia de los sistemas de transporte electrónico de la presencia de los fosfolípidos de membrana, requirió métodos de extracción bajo condiciones suficientemente suaves para permitir la posterior reintroducción de los lípidos en el complejo. Se han utilizado dos métodos, el primero implica la extracción con una mezcla de acetona y agua (90:10; v/v) y elimina un 80% del total de fosfolípidos (Brierley y col. 1962). El segundo método (Fleischer y cols., 1954) se basa en el tratamiento con fosfolipasa A bajo condiciones controladas y da lugar a la degradación de los fosfolípidos a lisofosfátidos y ácidos grasos libres, productos que se eliminan mediante lavados con albúmina, ya que pueden actuar como inhibidores. La recuperación de las actividades se efectuó al adicionar suspensiones micelares de fosfolípidos mitocondriales y estaba acompañada por la unión de los fosfolípidos a las membranas empobrecidas en lípidos (revisión de McMurray, 1973).

Así mismo, la solubilización del sistema ATPasa responsable de la fosforilación oxidativa da lugar a la pérdida de actividad y de su sensibilidad a la inhibición por oligomicina y lo mismo ocurre cuando se tratan con fosfolipasa A<sub>2</sub> partículas sub-

mitocondriales, derivadas de la membrana interna por sonicación. Ambas propiedades se recuperan cuando se adicionan fosfolípidos a los dos tipos de preparaciones (revisión de McMurray, 1973).

Una de las características de la membrana interna mitocondrial es su muy baja permeabilidad, incluso a moléculas relativamente pequeñas. Así, compuestos no electrolitos insolubles en lípidos con un peso molecular superior a 100-150 son virtualmente incapaces de cruzar esta membrana por difusión pasiva y en el caso de moléculas cargadas, incluso iones tan simples como  $H^+$ ,  $K^+$ ,  $Na^+$  y  $Cl^-$  no pueden difundir libremente a través de la membrana interna (Ernster y Kuylenstierna, 1970). Esta propiedad tiene gran importancia por su relación con los procesos metabólicos que tienen lugar en los medios a ambos lados de la membrana. Por ello existen en ella varios transportadores, que controlan el flujo de metabolitos implicados en la transferencia de equivalentes de reducción y el transporte de ATP, ADP, fosfato inorgánico e iones entre los dos compartimientos (revisión de DePierre y Ernster, 1977).

Por otra parte, la membrana interna mitocondrial se comporta como un sistema de transducción de energía consistente en varias unidades que pueden interconvertir reversiblemente la energía almacenada en forma de potencial redox, enlaces de alta energía o gradientes de concentración (figura 7). Así la cadena respiratoria y el sistema ATPasa pueden servir como fuerzas motrices para la transhidrogenasa de nucleótidos de nicotinamida e igualmente para los sistemas translocadores de iones (revisión de Ernster, 1977).

Las unidades transductoras de energía pueden generar de forma reversible un gradiente de concentración de protones o un potencial de membrana, que pueden servir de base para la transferencia de energía entre distintas unidades, es decir, constituir el fondo común de energía para las unidades de transducción de

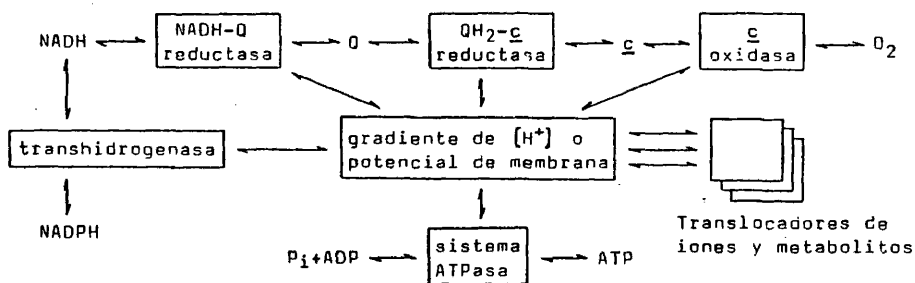


Figura 7.- Unidades de transducción de energía de la membrana interna mitocondrial.

energía. Esta es la base de la hipótesis quimiosmótica que fué sostenida inicialmente por Mitchell (1976) y en la actualidad es la más extendida. De acuerdo con esta hipótesis, la membrana interna constituye una parte integral del mecanismo de la transducción de energía y debe hallarse intacta como barrera de permeabilidad (revisiones de Wikström y Krab, 1980 y Fillingame, 1980).

#### CONTROL RESPIRATORIO

Gracias a la existencia de las técnicas polarográficas de medida del consumo de oxígeno en preparaciones de mitocondrias aisladas, los conocimientos sobre las propiedades de la respiración y el acoplamiento con la fosforilación se han desarrollado considerablemente.

La respiración se efectúa a una velocidad máxima en las mitocondrias aisladas, solamente cuando hay P<sub>i</sub> y ADP en el medio. Cuando falta ADP, la velocidad de respiración es muy baja y no se produce fosforilación, debido a la inexistencia de aceptor de fosfato. Esta situación se conoce como estado 2 de la respiración. Al añadir posteriormente una cantidad conocida de ADP a este sistema, el consumo de oxígeno experimenta un brusco incremento hasta un valor máximo y simultáneamente el ADP añadido se

fosforila. Este estado recibe el nombre de estado 3. Cuando se ha fosforilado todo el ADP añadido, la velocidad de consumo de oxígeno desciende bruscamente alcanzándose el estado denominado 4 (figura 9).

El control de la velocidad de respiración por la concentración de ADP se denomina control respiratorio. La relación o índice de control respiratorio (RCR) es el cociente de las velocidades de respiración mitocondrial en estado 3 y en estado 2 o 4. Esta relación constituye un control útil de la integridad de las mitocondrias aisladas, ya que cuando se hallan lesionadas o envejecidas, pierden su capacidad de fosforilación del ADP y en su ausencia se produce transporte electrónico a una velocidad máxima. En este caso  $RCR = 1$ ; no obstante, en mitocondrias intactas la relación es generalmente muy elevada, pudiendo alcanzar valores de hasta 10.

Por otra parte, la oxidación mitocondrial de los sustratos dependientes de  $NAD^+$  conduce a la fosforilación de hasta tres moléculas de ADP por átomo de oxígeno reducido (figura 8). Como consecuencia, la relación P/O (nº de moléculas de fosfato inorgánico utilizadas para fosforilar ADP por átomo de oxígeno consumido) puede alcanzar un valor máximo de 3. Sin embargo, algunos metabolitos, como por ejemplo el succinato, son deshidrogenados por las flavoproteínas y aportan sus electrones a la coenzima Q, soslayando así el centro I de fosforilación (figura 8). Por ello dan como resultado la fosforilación de solo dos moléculas de ADP por átomo de oxígeno reducido, es decir, la relación P/O puede alcanzar un valor máximo de 2.

En estudios de respiración con mitocondrias aisladas, la relación ADP/O (nº de moles de ADP añadidos dividido por el nº de átomos de oxígeno adicionales consumidos) es igual a la relación P/O. La proximidad del valor calculado para dicha relación al valor teórico correspondiente al sustrato utilizado, refleja

el grado de acoplamiento de la fosforilación oxidativa en la preparación mitocondrial.

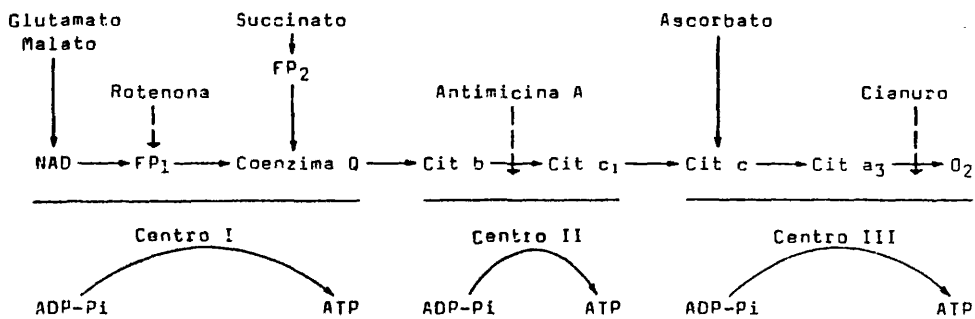


Fig. 8.- Diagrama de la cadena respiratoria que muestra los tres centros de fosforilación oxidativa. Mediante el uso de inhibidores (flechas discontinuas) dichos centros pueden estudiarse por separado. Cada centro es responsable de la síntesis de una molécula de ATP por átomo de oxígeno.

La fosforilación oxidativa resulta influida por agentes químicos que pueden agruparse en tres clases principales:

a/ Agentes desacoplantes: Permiten la realización del transporte electrónico, pero impiden la fosforilación del ADP. Además, provocan un gran aumento en la actividad hidrolítica sobre el ATP, que en ausencia de estos agentes es muy débil. Estimulan la velocidad de consumo de oxígeno de las mitocondrias en ausencia de ADP (figura 9).

La mayor parte de los agentes desacoplantes conocidos son sustancias liposolubles que contienen un grupo ácido y su mecanismo de acción se basa probablemente en la eliminación de los gradientes de concentración de H<sup>+</sup> a través de la membrana interna mitocondrial.

b/ Inhibidores de la formación de ATP: Impiden, tanto la estimula

ción del consumo de oxígeno por el ADP, como la fosforilación del ADP, ya que bloquean la transducción de energía entre la cadena respiratoria y la ATPasa. A consecuencia de ello, se alcanza un nivel energético que hace imposible la continuación del transporte electrónico. Sin embargo, la presencia de un agente desacoplante anula la acción de los inhibidores sobre el consumo de oxígeno, ya que provocan la desaparición del mencionado nivel energético (figura 9).

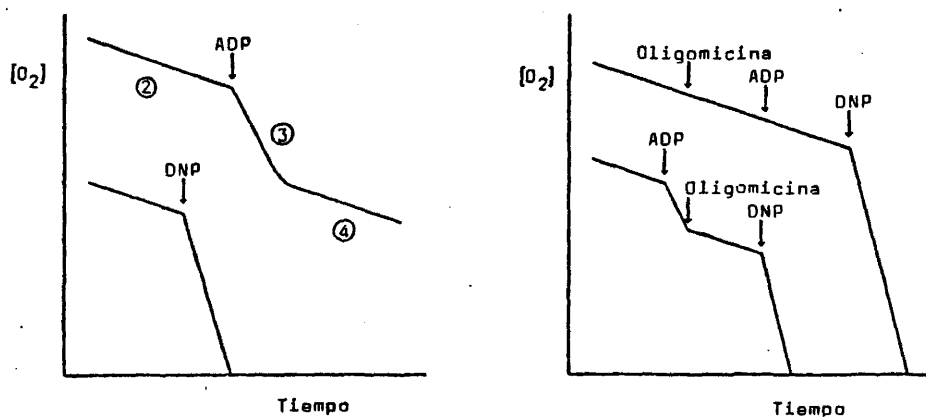


Fig. 9.- Acción de los agentes desacoplantes (DNP) y los inhibidores (Oligomycin).

c/ Ionóforos: En su mayoría forman complejos liposolubles con cationes específicos, los cuales son transportados de este modo a través de las membranas. Impiden la fosforilación oxidativa, porque obligan a las mitocondrias a utilizar la energía de la respiración para bombear cationes al interior de la matriz. Este proceso se mantiene indefinidamente, ya que los cationes salen de la mitocondria a la misma velocidad con que son bombeados hacia su interior.

#### MECANISMOS Y REGULACION DEL TRANSPORTE DE $\text{Ca}^{2+}$ MITOCONDRIAL

Las mitocondrias de los tejidos animales pueden acumular  $\text{Ca}^{2+}$  en contra de gradiente mediante un bombeo dependiente de energía catalizado por una glucoproteína específica de la membrana interna e inhibido por rojo de rutenio y lantánidos. Se ha propuesto que el  $\text{Ca}^{2+}$  se une a la superficie de la membrana mitocondrial antes de alcanzar el sistema transportador, de forma que la interferencia de esta unión afecta a la cinética de captura de  $\text{Ca}^{2+}$  (revisión de Saris y Akerman, 1980). Después de la extracción con acetona de los fosfolípidos de la membrana mitocondrial, los sitios de unión desaparecen (Scarpa y Azzi, 1968; Jacobus y Brierley, 1969); pero reaparecen con la adición de fosfolípidos, lo cual sugiere que la unión del  $\text{Ca}^{2+}$  se realiza principalmente sobre las cabezas polares de las moléculas de fosfolípidos de la membrana mitocondrial (revisión de Saris y Akerman, 1980).

Por otra parte, existen datos (revisión de Saris y Akerman, 1980) que sugieren que la captura de  $\text{Ca}^{2+}$  se ve afectada significativamente por el estado físico de la membrana, a través de un efecto sobre la difusión desde la superficie de la membrana hasta el transportador localizado en el interior de la membrana. De hecho, los cambios en la temperatura y en la fluidez de los lípidos afectan notablemente a la difusión de iones a través de liposomas (Blok y cols., 1975). Del mismo modo, cationes bivalentes como el  $\text{Mg}^{2+}$  (Papahadjopoulos, 1972) y otros agentes que modifican la fluidez o la densidad de carga de las membranas afectan a la permeabilidad de liposomas. Pero, además, las mitocondrias poseen un mecanismo independiente responsable de la liberación del  $\text{Ca}^{2+}$  acumulado, aún cuando el potencial de membrana es suficientemente alto como para impedir la salida de  $\text{Ca}^{2+}$  por la inversión de la acción del transportador mencionado anteriormente. La base molecular de esta vía de salida de  $\text{Ca}^{2+}$  está todavía po-

co clara (revisión de Fiskum y Lehninger, 1980). Únicamente Blon din (1975) y Roman y cols. (1979) han presentado datos que indican que los ácidos grasos insaturados y los saturados de longitud de cadena media pueden estar implicados en la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  de las mitocondrias, sugiriendo además, que los ácidos grasos insaturados liberados por la fosfolipasa  $A_2$  mitocondrial podrían ser esenciales en la regulación de dicho proceso.

Existe un acoplamiento entre los procesos de captura y liberación de  $\text{Ca}^{2+}$ , tal que ambos pueden funcionar al mismo tiempo bajo condiciones fisiológicas, dando lugar a un ciclo de  $\text{Ca}^{2+}$  que permite el establecimiento de un estado estacionario en las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  intra y extramitocondriales. Parece que este sistema junto con el retículo endoplásmico participa en el control de la concentración citoplásmica de  $\text{Ca}^{2+}$  y, en consecuencia, está implicado en la regulación de las actividades celulares sensibles al  $\text{Ca}^{2+}$  (Nichols, 1978; Becker y cols., 1980).

La capacidad de retención del  $\text{Ca}^{2+}$  acumulado en las mitocondrias aumenta en presencia de agentes que estabilizan la membrana interna mitocondrial, como el  $\text{Mg}^{2+}$  y la espermina. Estos agentes actúan probablemente previniendo los efectos nocivos del  $\text{Ca}^{2+}$  para la mitocondria, tales como aumento de la permeabilidad y consecuente hinchamiento, así como la activación de la fosfolipasa  $A_2$  (revisión de Saris y Akerman, 1980). La eliminación del  $\text{Mg}^{2+}$  provoca un incremento en la permeabilidad de dicha membrana y la liberación del  $\text{Ca}^{2+}$  acumulado en las mitocondrias (revisión de Saris y Akerman, 1980). Estos efectos se basan quizá en la formación de complejos con los grupos aniónicos presentes en la membrana, de forma que los fosfolípidos cargados negativamente y ciertas proteínas tenderían a quedar inmovilizadas (Binet y Volfin, 1975). Lo mismo podría ocurrir con los ácidos grasos libres, que son capaces de actuar como ionóforos para cationes monovalentes (Wojtczak, 1974) y para  $\text{Ca}^{2+}$  (Roman y cols.,

1979).

La liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  puede ser inducida "in vitro" en mitocondrias aisladas por una serie de factores (tabla 8) cuya participación en la célula intacta bajo condiciones fisiológicas no se conoce.

Agente	Mecanismo de acción sugerido
Rojo de rutenio	Inhibe el transporte hacia el interior
Fosfoenolpiruvato	Libera el ATP mitocondrial
Relación NAD(P)/NAD(P)H	Activa el flujo de salida
N-etil-maleimida y otros reactivos con grupo -SH	
Oxalacetato	Incrementan la permeabilidad
Pi	
Palmitoil-CoA	
Acidos grasos libres	Actúan como ionóforos
Prostaglandinas	
EDTA	Elimina el $\text{Mg}^{2+}$ de la membrana interna
Desacoplantes	Disminuyen el gradiente de pH o el potencial de membrana

Tabla 8.- Factores que estimulan la liberación del  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial.

Las perspectivas son buenas para una regulación de la concentración citoplásmica de  $\text{Ca}^{2+}$  por el estado de oxidación de los nucleótidos de piridina, puesto que este parámetro sufre considerables variaciones en función del estado energético celular. El  $\text{Ca}^{2+}$  estimula ciertas enzimas, como la fosforilasa-quinasa, responsable de la activación de la glucogenolisis, promoviendo así la movilización de las reservas de energía. Por ello, es posible que en las células con un bajo nivel energético se produzca un cambio en la distribución del  $\text{Ca}^{2+}$ , que eleve la concentración ci

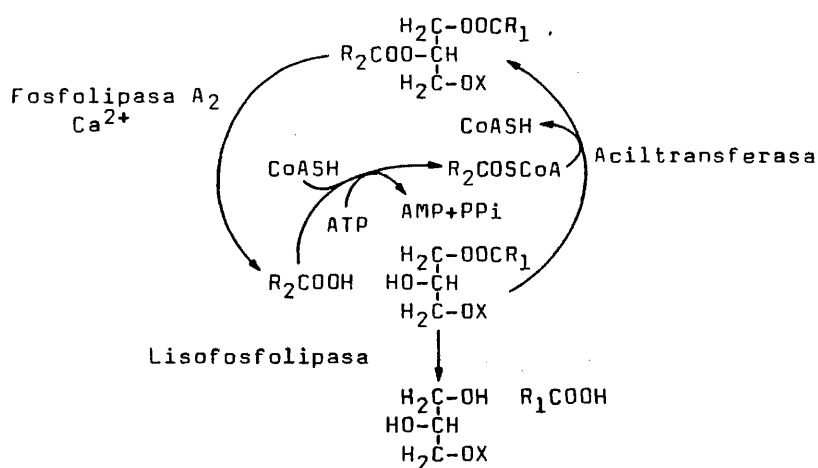
toplásmica de  $\text{Ca}^{2+}$ . Este cambio estaría promovido por el estado relativamente oxidado de los nucleótidos de piridina, que acompaña a un nivel de energía bajo en el citoplasma.

#### ACTIVIDAD DE LA FOSFOLIPASA $A_2$ MITOCONDRIAL

Considerando que la fosfolipasa  $A_2$  mitocondrial, al igual que las demás fosfolipasa  $A_2$  de membrana, es activada por  $\text{Ca}^{2+}$  (White y cols., 1969), que los fosfolípidos mitocondriales unen cationes bivalentes (Saris y cols., 1969) y que esta unión representa la primera etapa para su transporte a través de la membrana (Rossi y Lehninger, 1964) es interesante comentar los aspectos que se conocen sobre la relación de la mencionada actividad con los movimientos del  $\text{Ca}^{2+}$ .

Parce y cols. (1978) han sugerido que en las mitocondrias, en las que la oxidación y la fosforilación están acopladas, la actividad de la fosfolipasa  $A_2$  no se manifiesta, porque es inaccesible al  $\text{Ca}^{2+}$  debido a la localización de la enzima en las membranas mitocondriales. También es posible que la mencionada actividad esté compensada normalmente por una reactivación concomitante de los lisoderivados resultantes (figura 10) y que, únicamente cuando hay un desbalance de los dos procesos, la actividad de la fosfolipasa  $A_2$  se haga patente. Esto es lo que ocurre en el envejecimiento mitocondrial "in vitro", proceso en el que tienen lugar simultáneamente una pérdida de la capacidad de las mitocondrias para retener el  $\text{Ca}^{2+}$  acumulado en su interior y una elevación en sus niveles de lisofosfolípidos (Siliprandi y cols., 1979). Se ha propuesto que un incremento en la actividad de la fosfolipasa  $A_2$  está implicado en la distorsión de la funcionalidad que acompaña a dicho proceso de envejecimiento (Parce y cols., 1978; Siliprandi y cols., 1979).

Por otra parte, la adición de  $\text{Ca}^{2+}$  al medio de una suspensión de mitocondrias estimula la liberación de ácidos grasos por



- R<sub>1</sub> = Cadena saturada o monoinsaturada
- R<sub>2</sub> = Cadena poliinsaturada
- X = Fosfoetanolamina (colina, etc.)

Figura 10.- Metabolismo de fosfolípidos en las membranas mitocondriales.

la acción de la fosfolipasa A<sub>2</sub> mitocondrial (Pfeiffer y cols., 1979).

Recientemente, Pfeiffer y cols. (1979) y Beatrice y cols. (1980) han puesto de manifiesto el papel de la actividad de la fosfolipasa A<sub>2</sub> en el mecanismo subyacente a la acción de N-etil-maleimida, diamida, Pi y palmitoil-CoA. Estos agentes provocan la liberación de Ca<sup>2+</sup> mitocondrial por un mecanismo común, que se basa en un incremento en la permeabilidad de la membrana interna.

La acción de dichos agentes requiere la presencia específica de Ca<sup>2+</sup> exógeno, cuyo lugar de actuación debe estar localizado en la cara interna o en el interior de la membrana interna, ya que la mencionada acción es impedida por el rojo de rutenio,

que inhibe la penetración del  $\text{Ca}^{2+}$  en la membrana y por tanto su transporte hacia el interior de las mitocondrias. Además, el cambio en la permeabilidad no se manifiesta en presencia del anestésico nupercaina, inhibidor de la actividad de la fosfolipasa  $\text{A}_2$ , y los mencionados autores han observado la aparición de ácidos grasos poliinsaturados, que son el producto de dicha actividad, paralelamente al desarrollo del cambio en la permeabilidad. Sin embargo, la adición de ácidos grasos exógenos, en cantidades comparables o sustancialmente más altas que las producidas por  $\text{Ca}^{2+}$  y los agentes mencionados, no provocó efectos nocivos sobre las mitocondrias (Beatrice y cols., 1980). Esto sugiere a dichos autores que, quizás, los responsables primarios del incremento en la permeabilidad sean los lisofosfolípidos resultantes de la actividad de la fosfolipasa  $\text{A}_2$ , aunque no han sido determinados los cambios en los niveles de dichos compuestos.

Es posible también, que los agentes mencionados den lugar a una inhibición de la reutilización de lisofosfolípidos, que sea la responsable del incremento en los niveles de AGL.

#### ACCION DEL LPS SOBRE LAS MITOCONDRIAS

Se ha demostrado que, paralelamente a los cambios morfológicos, LPS procedentes de distintas bacterias provocan una serie de perturbaciones en la funcionalidad mitocondrial, cuando se inyectan en animales de experimentación y cuando se añaden a células en cultivo o preparaciones de mitocondrias aisladas de hígado de rata o humano. Además, estos efectos son llevados a cabo por cantidades biológicamente significativas de LPS en el curso de unas horas e "in vitro" bajo condiciones en las que la participación de mediadores humorales u hormonas está minimizada (revisión de Utili y cols., 1977 y Bradley, 1979).

Entre los efectos inducidos por el LPS sobre las mitocondrias hay que destacar la inhibición del metabolismo oxidativo, con una disminución en la velocidad respiratoria en estado 3 y en el RCR que indica un desacoplamiento de la oxidación y la fosforilación. Este efecto se ha observado también, tratando mitocondrias aisladas con lípido A (revisión de Bradley, 1979), por lo que quizá la actividad desacoplante reside en la porción de ácidos grasos del LPS. Además, se ha sugerido que el mencionado efecto se basa en alteraciones de la membrana interna mitocondrial (Harris y cols., 1968; Nicholas y cols., 1974). Por otra parte, el LPS altera la captura de  $Ca^{2+}$  por las mitocondrias, independientemente de la inhibición de la oxidación de los sustratos (Mela y cols., 1970).

Las alteraciones en la funcionalidad mitocondrial de los hepatocitos podrían ser las responsables de los profundos cambios metabólicos del hígado descritos anteriormente. La disminución de la actividad malato deshidrogenasa reduce el aporte de oxalacetato citoplásmico, que es el sustrato de la fosfoenolpiruvato-carboxiquinasa durante la gluconeogénesis. A medida que la

relación ATP/ADP desciende, se estimulan las actividades de la fosfofructoquinasa y la piruvatoquinasa de la ruta glucolítica. Tiene lugar una elevación de los niveles de NADH en el citoplasma que es responsable de un incremento en la reducción de piruvato a lactato. Debido a su conexión con los niveles de NADH, los de NADPH citoplásmico se elevan, de forma que para establecer una relación NAD(P)/NAD(P)H favorable se origina peróxido de hidrógeno al actual la NADPH-oxidasa.

Los mecanismos mediante los cuales el LPS provoca los efectos descritos en las mitocondrias no están claros y tampoco se conoce su situación en el esquema global de la lesión celular, si es primario o secundario a otras alteraciones patofisiológicas del shock. Sin embargo, existen algunas hipótesis, que se comentan a continuación.

#### I. Efectos secundarios al shock circulatorio

a/ La inadecuada perfusión tisular que acompaña al shock circulatorio puede ser responsable de una hipoxia, la cual origina una deficiente producción de energía que indudablemente implica una incapacidad de las bombas de iones. El resultado es una entrada de iones extracelulares y entre ellos el  $Ca^{2+}$  acompañada de una imposibilidad de bombeo hacia su interior por parte de las mitocondrias y retículo endoplásmico y consecuentemente una elevación en los niveles citoplásmicos de  $Ca^{2+}$  (Chien y cols., 1977), capaz de activar la fosfolipasa  $A_2$  de membranas. Así, se ha descrito una pérdida de fosfolípidos, como consecuencia de la isquemia, en homogeneizado total y sobrenadante postmitocondrial de hígado de rata (Chien y cols., 1978) y en mitocondrias de riñón de rata (Smith y cols., 1980), y de cerebro de cobaya (Majeuska y cols., 1977). También se pierde en la isquemia la funcionalidad mitocondrial (Mergner y cols., 1977 a y b).

b/ Algunos mediadores humorales, que aparecen como consecuencia de la endotoxemia, podrían ser responsables de las alteraciones mitocondriales a través de una elevación en la concentración citoplásmica de  $\text{Ca}^{2+}$ . Así, las catecolaminas, cuyos niveles sanguíneos se elevan en la endotoxemia (Heiffer y cols., 1958; Esdahl, 1959), parece que son capaces de incrementar los niveles citoplásmicos de  $\text{Ca}^{2+}$  (Rasmussen, 1970). También las prostaglandinas cuya síntesis y liberación es inducida por el LPS y por las quininas que aparecen en la endotoxemia, actúan como ionóforos de  $\text{Ca}^{2+}$  (Kirtland y Baum, 1972; Carsten, 1973) pudiendo alterar el control de la concentración citoplásmica de este ión.

c/ Como se mencionó anteriormente, en el shock endotóxico se ha observado una elevación inicial transitoria en los niveles sanguíneos de AGL. James (1977) ha sugerido que estos ácidos grasos podrían ser capturados por los hepatocitos y actuar como agentes desacoplantes (Björntorp y cols., 1964) o favorecer la salida de  $\text{Ca}^{2+}$  de las mitocondrias.

## II. Acción directa del LPS sobre los hepatocitos

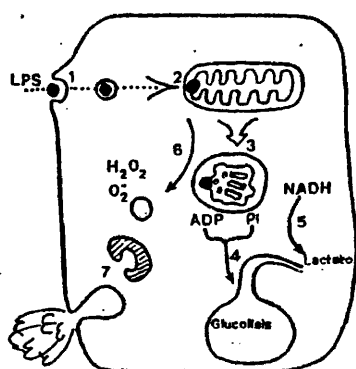
a/ La unión del LPS a la membrana plasmática podría incrementar el flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de la misma, como sugieren los resultados de Connors y cols. (1973). Este efecto podría incidir sobre los niveles citoplásmicos de dicho ión, con las consecuencias mencionadas.

b/ Existen evidencias de que durante el shock inducido por LPS, las mitocondrias pierden el  $\text{Mg}^{2+}$  unido a su membrana interna y que esta pérdida acompaña a la modificación en la estructura y función de la misma (Mela y cols., 1970 y 1971). Además Greer y cols. (1973) observaron que la presencia de  $\text{Mg}^{2+}$  en el medio previene la pérdida del control respiratorio provocada "in vitro" por el LPS en preparaciones de mitocondrias aisladas y han sugerido que el LPS actúa secuestrando el  $\text{Mg}^{2+}$  endógeno de la membrana mitocondrial. Teniendo en cuenta que, como se veía ante-

riormente, el  $Mg^{2+}$  tiene una gran importancia para la función de dicha membrana y que parece que el LPS penetra en los hepatocitos, esta hipótesis resulta en principio bastante sólida.

Otra hipótesis igualmente interesante es la propuesta por Bradley (1979) (figura 11), que sugiere que el LPS es introducido en las células por endocitosis, de forma que el fagosoma resultante se une con un lisosoma primario. El LPS es transferido a la membrana mitocondrial y en la interacción con ella el lípido A altera su estructura, desplazando a algún complejo de la cadena respiratoria o a la ATPasa.

c/ El LPS puede provocar "in vivo" la liberación de enzimas lisosomales en el hígado (revisiones de Utili y cols., 1977 y Bradley, 1979) y se sugirió que los cambios en el pH y las concentraciones citoplásmicas de cationes inducidas por el LPS podrían activar estas enzimas (Mela y cols., 1972). Mela y cols. (1973) comprobaron que la adición de enzimas lisosomales a mitocondrias aisladas provoca la aparición de la mayoría de los efectos inducidos por los LPS, por lo que han propuesto que son responsables parcialmente de la lesión mitocondrial.



- (1) Endocitosis
- (2) Unión del LPS a la membrana interna mitocondrial
- (3) Alteración de la funcionalidad mitocondrial.
- (4) ADP y  $P_i$  se acumulan en el citoplasma estimulando la ruta glucolítica
- (5) El NADH acumulado se reoxida mediante la reducción del piruvato a lactato
- (6) Los radicales  $O_2^-$  y el  $H_2O_2$  dañan a los constituyentes celulares
- (7) Se estimula la autofagia y se liberan las enzimas lisosomales

Figura 11.- Modelo para explicar los efectos del LPS (Bradley, 1979)

### PROSTAGLANDINAS EN EL SHOCK

Las prostaglandinas son agentes vasoactivos potentes que se forman en la mayoría de los tejidos de mamíferos a partir de ácidos grasos poliinsaturados de veinte átomos de carbono, simultáneamente a la aparición de los mismos.

La acción de la fosfolipasa A<sub>2</sub> sobre los fosfolípidos de las membranas es de una importancia considerable, ya que una gran parte de los ácidos grasos liberados corresponde al ácido araquidónico (McMurray, 1973) y su disponibilidad limita la velocidad de la biosíntesis de prostaglandinas (Lands y Samuelsson 1968). Por ello, la liberación de este ácido graso, en respuesta a una elevación en los niveles de Ca<sup>2+</sup>, podría representar un punto de conexión entre el Ca<sup>2+</sup> celular y el metabolismo de prostaglandinas. Esta hipótesis está apoyada por el hecho de que el Ca<sup>2+</sup> estimula en cortes de médula renal simultáneamente la producción de prostaglandinas y la liberación de los ácidos linoleico y araquidónico de los fosfolípidos tisulares (Erman y cols., 1979); estos ácidos se encuentran predominantemente en la posición sn-2 de las moléculas de los fosfolípidos.

En general, las prostaglandinas pueden actuar como mediadores, pero entrando en la circulación sistémica ejercen también efectos en lugares distantes de su origen. La degradación de las prostaglandinas circulantes se realiza en gran parte por la acción de enzimas presentes en el hígado, los pulmones y los riñones.

Aunque su papel no está claro todavía, se ha puesto de manifiesto la participación del sistema ácido araquidónico-prostaglandinas en la patofisiología del shock, tanto endotóxico y séptico como hemorrágico. Varios grupos de investigación han observado un incremento en los niveles sanguíneos de PGE y PGF en el shock experimental endotóxico y hemorrágico, al igual que en ca-

tos clínicos de shock séptico (revisión de Fletcher y Ramwell, 1980). Los resultados de Flynn y Lefer (1977) sugieren que la de gradación de prostaglandinas no está disminuida significativamente en el hígado, los pulmones y el riñón durante los dos tipos de shock experimental ya mencionados; por lo que el incremento en los niveles de prostaglandinas circulantes ha de ser consecuencia de un aumento en su síntesis y liberación.

Algunas hormonas y mediadores, como la bradiquinina, y pro cesos, como la isquemia, que acompañan al shock circulatorio, ori ginan la liberación de prostaglandinas en tejidos aislados per fundidos (Block y cols., 1974; Isackson y cols., 1976 y 1977; Schwartzman y Raz, 1979). Teniendo en cuenta este hecho, cabe pensar en esos factores como posibles responsables del mencionado incremento en los niveles de prostaglandinas; pero en el shock endotóxico no se puede descartar la posibilidad de la par ticipación del LPS que, como se vio anteriormente, es capaz de inducir la síntesis y liberación de prostaglandinas en los macró fagos.

La indometacina y otros fármacos, que inhiben la síntesis de prostaglandinas, utilizados profiláctica o terapéuticamente, incrementan la supervivencia y atenúan los fenómenos hemodinámicos en los dos tipos de shock experimental, excepto cuando se utilizan dosis masivas de endotoxinas.

Parece que la  $PGF_{2\alpha}$ , potente agente vasoconstrictor, está relacionada con la hipertensión de la arteria pulmonar que tiene lugar en la endotoxemia experimental, pero no se conoce la relación de las prostaglandinas con la hipotensión arterial sistémica y tampoco si participan en la irreversibilidad del shock.

BIOSINTESIS DE PROSTAGLANDINAS EN EL HIGADO

El complejo prostaglandina sintetasa microsomal de hígado de rata genera PGE<sub>2</sub> y PGF<sub>2α</sub> (Morita y Murota, 1978) según un mecanismo ampliamente estudiado (Samuelsson y cols., 1975 y 1978) (figura 12).

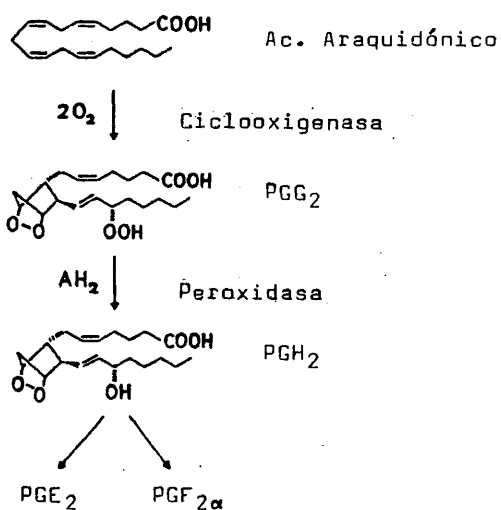


Figura 12.- Biosíntesis de prostaglandinas.

Durante la transformación del ácido araquidónico en PGH<sub>2</sub>, se adicionan al mismo dos moléculas de oxígeno, pero sólo tres átomos de oxígeno quedan finalmente en la molécula de PGH<sub>2</sub>. Como consecuencia, se liberan equivalentes de oxidación en forma de radicales reactivos que son los responsables de la autodesactivación irreversible de la ciclooxigenasa, que tiene lugar en el curso de la reacción "in vitro" (Egan y cols., 1976). Estos autores han planteado a partir de sus resultados experimentales un esquema para explicar el mecanismo de la autodesactivación y el efecto protector del fenol y otros antioxidantes sobre la activi

dad de la ciclooxigenasa (figura 13). La base de este esquema es tá en la existencia en la enzima de un puente disulfuro necesá- rio para la actividad catalítica; dicha existencia se sugirió por la observación de que la inhibición provocada por el ditiotrei- tol no se da en presencia de N-etil-maleimida. Este puente disul- furo podría actuar como aceptor del átomo de hidrógeno del ácido araquidónico, o bien ser necesario para el manténimiento de la conformación activa de la enzima.

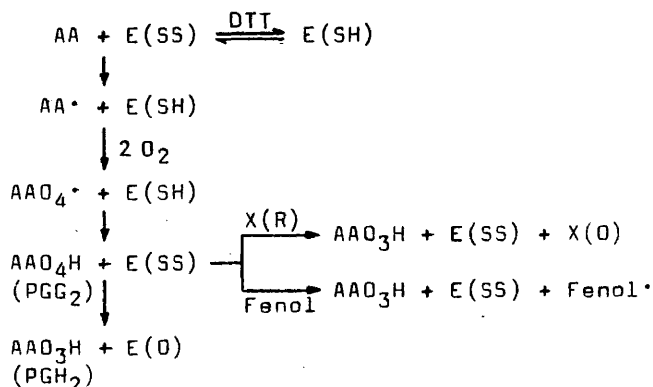


Figura 13.- Mecanismo propuesto para explicar la autodesactiva- ción y el efecto protector del fenol sobre la activi- dad de la ciclooxigenasa (Morita y Murota, 1978).

La forma activa de la enzima E(SS) recoge el hidrógeno del ácido araquidónico para generar la forma reducida inactiva E(SH) y el radical AA·. La reducción reversible de la enzima con ditiot- reitol (DTT) genera la misma forma inactiva. El radical AA· reacciona con el oxígeno dando lugar al radical AAO<sub>4</sub>· que se re- duce subsecuentemente a AAO<sub>4</sub>H (PGG<sub>2</sub>), al mismo tiempo que la en- zima se reoxida a la forma activa E(SS). La PGG<sub>2</sub> puede ocasional- mente oxidar irreversiblemente la enzima a E(O), al reducirse a PGH<sub>2</sub>, lo cual da lugar a su desactivación. Sin embargo, esto ocu-

re en muy pequeña proporción (1 de 5.000) lo cual hace suponer que otros componentes celulares X(R) se oxidan a X(O) en la reducción de PGG<sub>2</sub>; este proceso "in vivo" puede ser la causa de una lesión celular. El fenol impide parcialmente la formación de E(O) aportando equivalentes de reducción adicionales para generar PGH<sub>2</sub> y un radical fenol·, sin la producción concomitante de equivalentes de reducción. Ambos procesos horizontales mantienen a la enzima en su forma activa.

Por otra parte, la actividad biosintética de prostaglandinas de microsomas de hígado de rata resulta inhibida por la adición de la fracción soluble a la mezcla de reacción, mientras que la incorporación de ácido araquidónico a fosfolípidos se incrementa (Morita y Murota, 1978). Todas las evidencias sugieren que el factor presente en la fracción soluble de hígado, responsable de este efecto, es el ATP (Morita y Murota, 1980). Asimismo el pH influye de forma decisiva en la actividad biosintética de prostaglandinas (figura 14), quizá debido a que a pH elevado el sistema enzimático responsable de la incorporación del ácido araquidónico a fosfolípidos resulta inhibido (Morita y Murota, 1978)

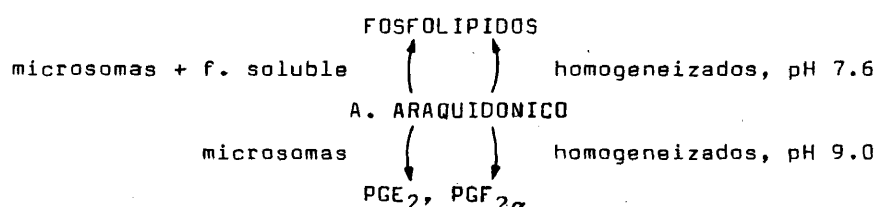


Figura 14.- Rutas predominantes de utilización del ácido araquidónico "in vitro" dependiendo del pH y de la preparación utilizada.

200

REACTIVOS Y PRODUCTOS QUIMICOS UTILIZADOS

Ferricitocromo c de corazón de ternera, Sigma Chem. Co., USA.  
Kieselgel-G, E. Merck, R.F.A.  
Acido pentadecanóico, E. Merck, R.F.A.  
Acido araquidónico, E. Merck, R.F.A.  
Patrones de esteres metílicos de ácidos grasos, Applied Science  
Lab., USA.  
Rodamina 6G, B.D.H. Chem. LTD., G.B.  
Trifluoruro de boro, Fluka, R.F.A.  
PPO, Sigma Chem. Co., USA.  
POPOP, Sigma Chem. Co., USA.  
Murexida, E. Merck, R.F.A.  
Safranina, E. Merck, R.F.A.  
Cromosorb W/AW, Hewlett-Packard, USA.  
Succinato de dietilenglicol, Hewlett-Packard, USA.  
Productos marcados con radioisótopos, Radiochemical Center, G.B.  
Sacarosa, Sigma Chem. Co., USA.  
Manitol, Sigma Chem. Co., USA.  
Ionóforo A 23187, cedido por D. Vazquez.  
Albúmina bovina, Sigma Chem. Co., USA.  
Albúmina bovina libre de ácidos grasos, Sigma Chem. Co., USA.  
Lipopolisacárido W de E. coli 0127:88, Difco Lab., USA.  
DTNB, Calbiochem. USA.  
Reactivo de Folin-Ciocalteu, E. Merck, R.F.A.  
Glutation, Sigma Chem. Co., USA.

El resto de los productos no reseñados en este apartado  
fueron de grado analítico.

MATERIAL BIOLÓGICO

Se han utilizado ratas macho de raza albina Wistar, de 200-300 g de peso, ayunadas durante la noche.

Cuando se requerían muestras de sangre, los animales se descerebraron y a continuación se realizó la toma de las mismas mediante punción cardíaca. En los demás casos los animales se sacrificaron por decapitación y después se sangraron exhaustivamente.

## EXPERIMENTACION "IN VIVO"

### SHOCK ENDOTOXICO

La inducción del estado de shock se realizó inyectando por vía endovenosa (en vena de la cola) LPS disuelto en solución salina fisiológica a una concentración de 20 mg/ml. Las dosis de LPS utilizadas fueron 1 y 2 mg/100 g peso del animal, la segunda de las cuales corresponde a la dosis letal determinada en experimentos previos.

A los controles se inyectó un volumen igual de suero salino y después se mantuvieron todos los animales con agua "ad libitum" y bajo observación.

### Medida de la presión arterial

Con el fin de conocer la evolución del shock se realizaron sucesivas medidas de presión arterial sistólica desde la inducción del mismo hasta la muerte de los animales. Se utilizó un sistema W+W Electronics que consta de un manguito que se aplica en la base de la cola de la rata y va unido a un dispositivo neumático que genera una presión que varía cíclicamente. Cuando la presión del manguito supera la presión sistólica de la arteria caudal, esta se colapsa e interrumpe la transmisión de la pulsación a la parte periférica de la cola. Asimismo, cuando la presión del manguito desciende la pulsación retorna; esta pulsación viene detectada por un transductor que se coloca también en la cola. La señal eléctrica generada, una vez amplificada, sirve para accionar un galvanómetro que esta conectado a una plumilla; el registro se efectúa sobre un papel convenientemente calibrado en mm de mercurio (figura 15).

La presión en el manguito está generada por un pistón alojado en el interior de un cilindro y accionado por un motor. Las dimensiones del cilindro son tales que la presión transmitida al

manguito varía de 0 a 290 mm Hg. Por otra parte, el cilindro está también comunicado con la atmósfera, de manera que al iniciarse la traslación del pistón la presión del manguito es la atmosférica, es decir, el cero está igualado a la presión atmosférica.

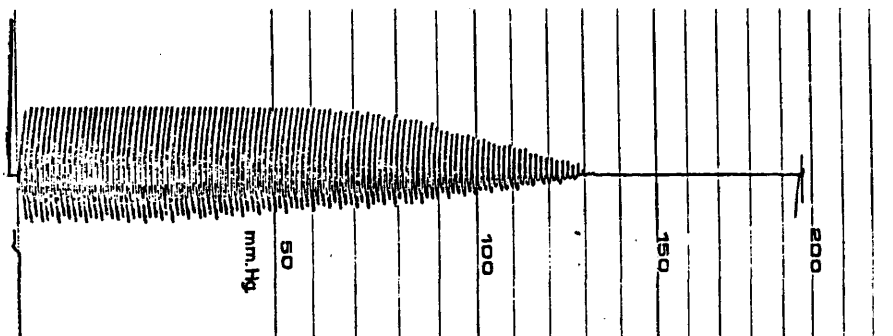


Figura 15.- Registro gráfico de medida de presión arterial.

Antes de realizarse las medidas, la rata se mantiene durante unos 40 min a la temperatura de 35°C, para provocar una cierta vasodilatación. Durante la medida el animal se mantiene inmovilizado para evitar interferencias en la señal.

#### SHOCK HEMORRAGICO

El modelo experimental de hemorragia controlada seguido fué el propuesto por Whigham y Weil (1966). Las ratas se anestesiaron con eter o mediante inyección intraperitoneal de tiobarbital sódico (60 mg/Kg peso animal) y se colocaron en la mesa de operaciones. Entonces se expusieron bilateralmente las arterias femorales y se insertó en cada una un catéter de polietileno lleno con una disolución de heparina (5 U/ml) en suero salino. Finalizada la operación se colocó una compresa de algodón empapada en suero salino cubriendo cada herida y se introdujeron 300 U de

heparina/Kg peso por uno de los catéteres. Por otra parte, el catéter correspondiente a la arteria derecha se conectó a una jeringa de plástico que contenía 1 ml de solución salina con 5 U de heparina y sirvió de reservorio de sangre. La velocidad de sangrado fué de 0.25 ml/min y el volumen de sangre extraído fué 1-1.3 % del peso del animal.

### AISLAMIENTO DE LA FRACCION MITOCONDRIAL

La fracción mitocondrial se aisló según el método de Schneider (1948) con ligeras modificaciones. Los medios utilizados fueron siempre de reciente preparación y su composición fué:

- Medio de homogeneización:

Sacarosa	75	mM
Manitol	225	mM
EDTA	0.1	mM

- Medio de lavado:

Igual al de homogeneización pero sin EDTA.

Durante todo el proceso de aislamiento se trabajó a 0-4°C.

Procedimiento:

Una vez sacrificado el animal se extrajo el hígado inmediatamente, se troceó con una tijera en el medio de homogeneización y se lavó otra vez con el mismo medio para eliminar en lo posible la sangre. Los trozos de tejido se suspendieron en unos 30 ml del medio y se homogeneizaron en un homogeneizador tipo Potter-Elvehjem (vidrio-teflón) de 0.2 mm de holgura mediante dos ciclos de émbolo.

El homogeneizado se repartió en cuatro tubos de centrifuga donde se diluyó con unos 170 ml de medio de homogeneización. A continuación se centrifugó a 1.000xg durante 10 min en una centrifuga Sorvall RC-5. El sobrenadante se filtró a través de gasa doble y se volvió a centrifugar a 6.500xg durante 10 min. El sedimento obtenido (fracción mitocondrial) se resuspendió cuidadosamente, con un tubo de vidrio de fondo redondo que contenía hielo picado en su interior, en 80 ml de medio de lavado y se centrifugó a 7.000xg durante 10 min. La operación se repitió una vez más y el sedimento obtenido se resuspendió en 1.5-2 ml de medio de lavado, empleando un homogeneizador de vidrio tipo Dounce (Blaessig, USA) de 0.076 mm de holgura y se conservó en frío has

ta su utilización.

Las preparaciones obtenidas por este procedimiento contienen alrededor de 100 mg de proteína mitocondrial/hígado y 25-50 mg proteína/ml suspensión. La valoración de proteínas de las preparaciones mitocondriales y de los homogeneizados de hígado se realizaron según el método de Lowry y cols. (1951).

### ESTUDIO DE LA FUNCIONALIDAD MITOCONDRIAL

#### I. REGISTRO DE CONSUMO DE O<sub>2</sub>: ELECTRODO DE OXIGENO

Para estudiar la velocidad de consumo de O<sub>2</sub> de las preparaciones mitocondriales se ha seguido el método descrito por Estabrook (1964) con varias modificaciones y se ha empleado un sistema compuesto por:

- Electrodo de oxígeno tipo Clark (Yellow Springs Instruments Co USA).
- Cubeta de metacrilato de 3 ml de capacidad.
- Agitador magnético de velocidad regulable.
- Circuito de amplificación de señal y de polarización del electrodo.
- Registrador de papel continuo, con diferentes escalas para el voltaje, varias velocidades de recorrido del papel y respuesta lineal.

La cubeta posee un pequeño orificio que permite la introducción de la preparación, los sustratos y cofactores sin necesidad de abrirla, aumentando la superficie de contacto del medio de ensayo con el aire, lo cual modificaría su contenido en oxígeno. La agitación permite la mezcla continua del medio de reacción y facilita el establecimiento del equilibrio entre el oxígeno disuelto en el medio y el que difunde a través de la membrana del electrodo.

El sistema eléctrico permite variar la sensibilidad de la detección de oxígeno hasta valores máximos sin aumento del ruido de fondo y además carece de tiempo muerto apreciable.

Los inhibidores, sustratos oxidables y cofactores se introducen en cantidades de 5-10 µl disueltos en agua destilada o etanol absoluto.

El medio de ensayo empleado para el registro del consumo de oxígeno, fué siempre de preparación reciente y contenía:

Sacarosa 250 mM  
MgCl<sub>2</sub> 7 mM  
KCl 40 mM  
KHPO<sub>4</sub> 5 mM  
Tris-HCl 20 mM (pH 7.2-7.4)

Por otra parte, dicho medio estaba saturado de O<sub>2</sub>, lo cual corresponde a una concentración de 250 μM a la temperatura de en sayo 25°C.

El ensayo de consumo de oxígeno de las preparaciones mitocondriales consistió en:

- Registro del nivel de oxígeno del medio hasta estabilidad.
- Adición de una alícuota de 25-100 μl de la suspensión mitocondrial, correspondiente a una cantidad de proteína de 1.25-2.5 μg. Se registra el consumo de O<sub>2</sub> con sustrato endógeno.
- Adición de sustrato, glutamato-malato o succinato, correspondientes a los centros I y II de fosforilación respectivamente (concentración en cubeta 0.33 mM). En los ensayos con succinato se adicionaba previamente rotenona para inhibir el centro I. Registro de consumo de O<sub>2</sub> en estado 2.
- Adición de ADP (166.6 μM en cubeta) y registro de consumo de O<sub>2</sub> en estado 3 hasta que se alcanza el estado 4, al consumirse el ADP.
- Registro de consumo de O<sub>2</sub> en estado 4.

Para calibrar la escala del registro se determinó el nivel cero de contenido en O<sub>2</sub> del medio, dejando que una preparación mitocondrial lo consumiese todo, o bien, de forma más rápida, adicionando unos microlitros de una solución saturada de ditioni to sódico.

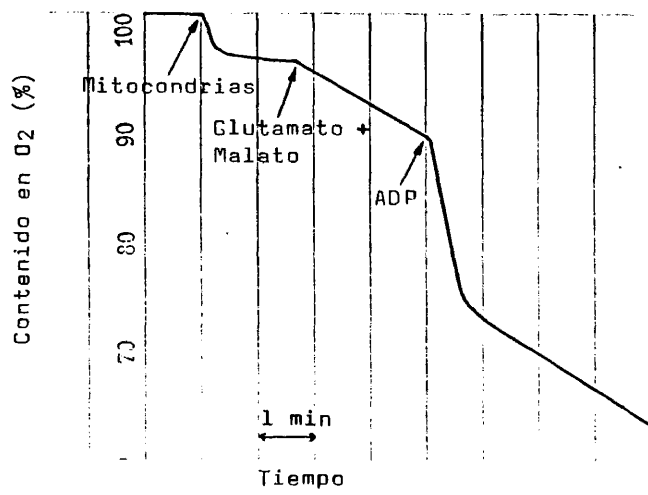


Figura 16.- Registro de consumo de oxígeno correspondiente a un ensayo de actividad respiratoria con glutamato + malato como sustratos.

## II. TECNICAS ESPECTROFOTOMETRICAS

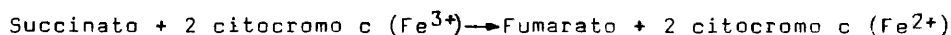
### Determinación de la actividad succinato-citocromo c reductasa

Se realizó según el método descrito por Tisdale (1967). El medio de ensayo contenía:

EDTA	0.2 $\mu$ M
NaN <sub>3</sub>	1.0 $\mu$ M
Albúmina	75.0 nM
Succinato potásico	10.0 $\mu$ M
Fosfato potásico	10.0 $\mu$ M (pH 7.4)

(Concentraciones finales en la mezcla de reacción).

La reacción es:



La reducción del citocromo se siguió espectrofotométricamente a través del incremento en la absorbancia a 550 nm que lleva consigo y presenta una velocidad constante durante los primeros minutos. En los ensayos realizados se utilizó un espectrofotómetro de doble haz Varian modelo Cary 118 con registro incorporado.

Procedimiento:

En la cubeta de medida, que contiene medio de ensayo, se adiciona una alícuota de suspensión de mitocondrias preparada recientemente, obteniendo una concentración de proteína en cubeta de alrededor de 0.07 mg/ml. A su vez, se adiciona en la cubeta de referencia el mismo volumen del medio en el que estaban suspendidas las mitocondrias. A continuación, se adiciona en ambas cubetas ferricitocromo c, alcanzando en la mezcla de reacción una concentración de 4 mg/ml.

El coeficiente de extinción usado para el citocromo c (reducido-oxidado) es  $18.5 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

#### Evaluación de la concentración de $\text{Ca}^{2+}$

Se estudiaron las variaciones de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en el medio de las suspensiones mitocondriales en presencia de murexida como indicador, monitorizando la formación o desaparición del complejo  $\text{Ca}^{2+}$ -murexida a través de los cambios en la absorbancia a 540 nm, según el método descrito por Mela y Chance (1968).

En las suspensiones de mitocondrias se producen variaciones en la absorbancia, debidas a los cambios en la turbidez que tienen lugar como consecuencia de modificaciones en el volumen mitocondrial al capturar o liberar  $\text{Ca}^{2+}$ . Para minimizar estas interferencias los ensayos se realizaron en un espectrofotómetro de doble haz y doble longitud de onda Aminco DW-2a, en el que pasan por la misma cubeta dos haces de longitudes de onda diferentes. Se utilizaron 540 y 510 nm como longitudes de onda de medida y de referencia respectivamente, ya que 510 nm corresponde al punto isosbético. El valor de la diferencia entre las absorbancias a ambas longitudes de onda refleja únicamente la magnitud de la concentración de complejo  $\text{Ca}^{2+}$ -murexida.

El medio base de ensayo fue el mismo que el utilizado en las incubaciones, pero contenía murexida 30  $\mu\text{M}$ . La concentración de proteína mitocondrial en el medio de ensayo fue de 2 mg/ml.

#### AISLAMIENTO DE LA FRACCION MICROSOMAL

Para la obtención de la fracción microsomal se homogeneizó una porción de hígado de cada rata, previamente troceado y lavado, en tampón fosfato potásico 100 mM (pH 7.5) utilizando un homogeneizador Potter-Elvehjem (vidrio-teflón). El homogeneizado se centrifugó a 2.000xg (centrífuga Sorvall RCS) y el sobrenadante obtenido se decantó a través de gasa doble para eliminar lípidos y luego se sometió a centrifugación a 113.000xg durante 2 h (ultracentrífuga Beckman L5-65B). Una vez eliminados los lípidos de la pared de los tubos de centrifuga, el sedimento (fracción microsomal) se resuspendió en el tampón fosfato, resultando una concentración de alrededor de 40 mg proteína/ml. La concentración de proteína se determinó por el método de Lowry y cols. (1951).

#### ESTUDIO DE ACTIVIDAD DE PROSTAGLANDINA SINTETASA MICROSOMAL

El estudio de la actividad de prostaglandina sintetasa microsomal se llevó a cabo a través del consumo de oxígeno de las preparaciones microsomales, que se registró utilizando el mismo sistema que en el caso de las preparaciones mitocondriales. Los ensayos se realizaron, siguiendo el método descrito por Egan y cols. (1976), en tampón fosfato potásico 100 mM (pH 8.5) a 37°C. Para el mantenimiento de esta temperatura la cubeta de ensayo se introdujo en una camisa por la que circulaba agua termostaticada.

Una vez adicionada una alícuota de preparación microsomal, que daba lugar a una concentración de proteína en cubeta de 0.25 mg/ml, se inició la reacción mediante la adición de ácido araquidónico disuelto en sulfóxido de dimetilo a una concentración de 55 mM. La velocidad de la reacción se determinó a partir de la porción lineal de la curva obtenida al registrar el consumo de

oxígeno (figura 17).

Los reactivos, ensayados para observar su influencia sobre la actividad enzimática, se adicionaron antes que el ácido araquidónico.

La sangre de los animales en shock irreversible exhibía una acusada hemólisis y la hemoglobina liberada aparecía como contaminante de la fracción microsomal pudiendo actuar como cofactor de la reacción. Por ello, los ensayos se realizaron en presencia de un exceso de hemina (2 $\mu$ M) para evitar el error provocado por la hemoglobina.

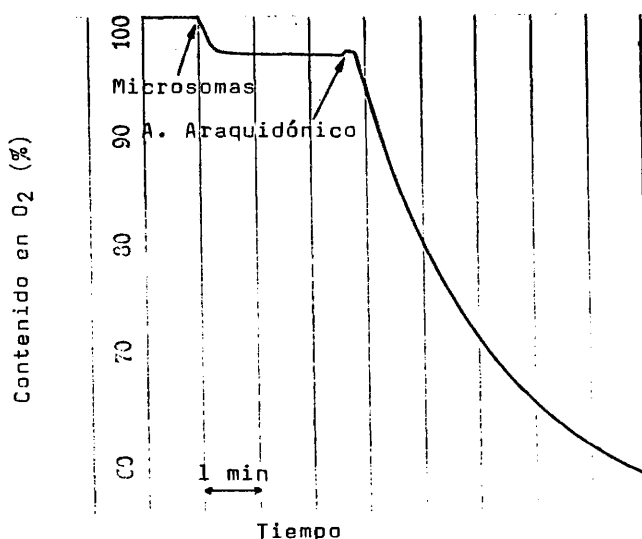


Figura 17.- Registro de consumo de oxígeno correspondiente a un ensayo de actividad de la prostaglandina sintetasa.

VALORACION DE GRUPOS TIOLICOS DE LA FRACCION MICROSOMAL

La valoración de grupos tiólicos de proteínas de la fracción microsomal se realizó según el método colorimétrico descrito por Ellman (1959) utilizando el siguiente medio de reacción:

EDTA            1 mM

Tris-HCl    0.1 M    pH 7.5

El procedimiento seguido consistió en la incubación de alícuotas de las preparaciones microsomales, que contenían a 0.2-0.4 mg de proteína, en 3 ml de medio de reacción en presencia de 0.1 ml de solución del reactivo DTNB a una concentración de 0.4 mg/ml. Después de 15 minutos a temperatura ambiente se leyó la absorbancia a 412 nm frente a un blanco sin reactivo.

La curva patrón se realizó con una solución de glutation 5 mM.

#### EXPERIMENTACION "IN VITRO" CON FRACCION MITOCONDRIAL

La experimentación consistió en la incubación de preparaciones de mitocondrias recién obtenidas, en un medio base cuya composición dependía del tipo de estudio a realizar. En los estudios de actividad fosfolipasa A<sub>2</sub> la composición del medio fue:

Sacarosa 65.7 mM  
Manitol 197.3 mM  
Tris-HCl 20.0 mM (pH 7.4)

En los estudios de actividad acil-transferasa el medio base contenía:

Sacarosa 61.4 mM  
Manitol 184.0 mM  
NaCl 8.6 mM  
Tris-HCl 20.0 mM (pH 7.4)

La composición de ambos medios se diseñó para que tuviera una osmolaridad de 300, que es la calculada para la matriz mitocondrial. El medio de incubación tuvo en los dos tipos de estudios un volumen total de 1 ml, consistente en 0.5 ml de medio base y otros tantos de suspensión de mitocondrias en el mismo medio. De esta forma, la concentración de proteína mitocondrial fue de 20-40 mg/ml.

Las incubaciones se llevaron a cabo en una incubadora de agua, previamente acondicionada a 18°C, con agitación constante. Una vez transcurrido el tiempo de incubación previsto, se adicionaron a los tubos 5 ml de cloroformo-metanol (2:1, v/v) para proceder a la extracción de lípidos y con otra alícuota se realizó un ensayo de respiración.

Los distintos experimentos, realizados por duplicado, difieren en la presencia o ausencia en el medio de incubación de uno de los siguientes productos:

CaCl<sub>2</sub> 8 mM  
LPS 10 mg/ml ( 66 µg/mg proteína mitocondrial)  
A 23187 4 µM

También se ensayaron conjuntamente CaCl<sub>2</sub>-LPS y CaCl<sub>2</sub>-A23187.

El ionóforo A-23187 se disolvió en dimetil sulfóxido a una concentración de 25 mM y en esta forma se almacenó. A partir de esta solución se realizaba, momentos antes de cada experimento, una dilución en agua hasta una concentración de 0.2 mM, con lo cual se evitaba la formación de agregados del ionóforo debido a su baja solubilidad en agua.

#### I. ACTIVIDAD DE LA FOSFOLIPASA A<sub>2</sub>

Con el fin de evaluar la actividad fosfolipasa A<sub>2</sub> mitocondrial "in vitro", a través de los niveles de lisoderivados de glicerofosfolípidos, se procedió a su marcaje "in vivo" con un radioisótopo. El precursor elegido fue etanolamina que se incorpora en PE y en menor extensión en PC.

Una hora antes del sacrificio se inyectaron a las ratas por vía intravenosa 925 KBq de cloruro de [2-<sup>14</sup>C]-Etan-1-ol-2-amina (actividad específica 1849.9 MBq/mmol) disuelto en suero salino a una concentración de 462.5 KBq/ml.

#### II. INCORPORACION DE ACIDOS GRASOS EN LOS FOSFOLIPIDOS

##### MITOCONDRIALES.

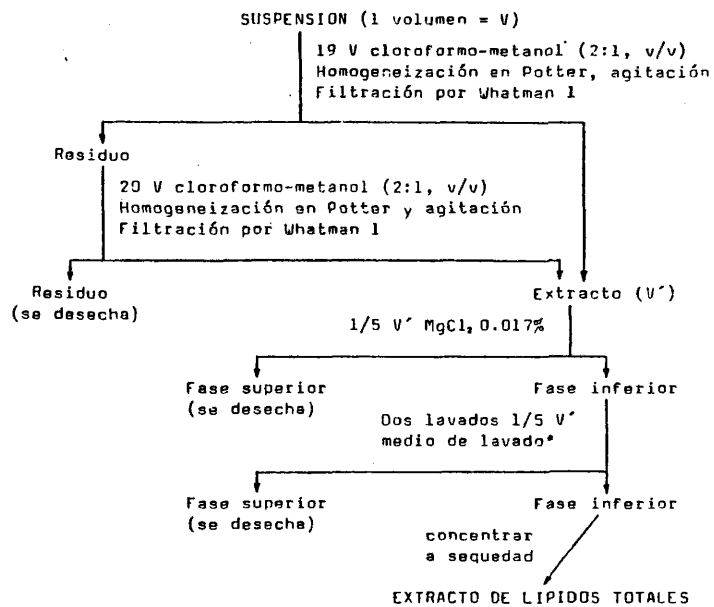
Se llevaron a cabo estudios de incorporación de ácidos grasos marcados radiactivamente en los fosfolípidos mitocondriales. Se ensayaron por separado los siguientes ácidos grasos:

<u>Acido graso</u>	<u>Actividad específica</u>
(1- <sup>14</sup> C)-Araquidónico	2.14 HBq/mmol
(U- <sup>14</sup> C)-Palmítico	14.91 HBq/mmol

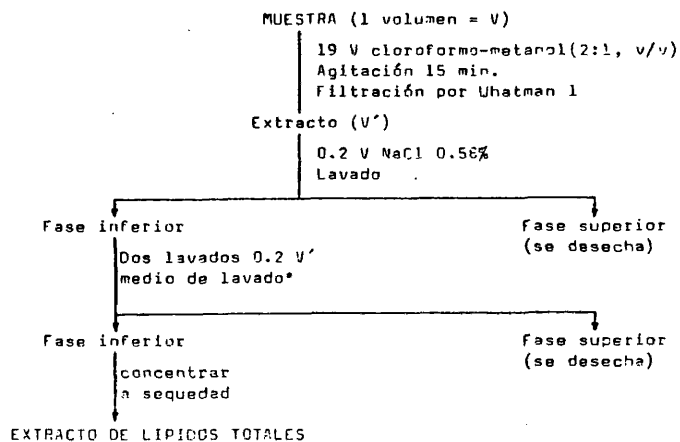
Cada ácido graso se introdujo en el medio de incubación en forma de sal sódica, la cual se preparó neutralizando con NaOH 1 N el ácido graso disuelto en etanol y calentando a 50°C después, mientras se llevaba a sequedad con corriente de nitrógeno. Entonces se disolvió en una solución de albúmina en NaCl al 0.5% en la proporción de 1 mol de albúmina por cada 5 moles de ácido graso (Evans y Moeller, 1963). La actividad de cada ácido graso introducida en el medio de incubación fué:

Ac. Araquidónico	74.06 KBq
Ac. Palmítico	6.18 KBq

Esquema de extracción para microsomas, mitocondrias y homogenizado total:



Esquema de extracción para plasma:



\*Medio de lavado: cloroformo-metanol-NaCl 0.58% (3:49:47, v/v)

## ANALISIS DE LIPIDOS

### EXTRACCION

La extracción de lípidos totales se llevó a cabo con cloroformo-metanol (2:1, v/v), siguiendo el método de Folch y cols. (1957) con modificaciones adecuadas para cada tipo de material biológico (esquemas 1 y 2). Los extractos lipídicos obtenidos se llevaron a sequedad en evaporador rotatorio a presión reducida y a temperatura ambiente y se conservaron hasta su análisis bajo atmósfera de nitrógeno y a una temperatura de -20°C.

### CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA

El fraccionamiento de lípidos se realizó por cromatografía en capa fina de silicagel G, monodimensional para la separación de clases de lípidos neutros (Kelley, 1966) y bidimensional para la de clases de glicerofosfolípidos (Rouser y cols., 1970). Los sistemas de desarrollo utilizados fueron:

Lípidos neutros: Hexano-éter-ac. acético (70:30:1, v/v/v)

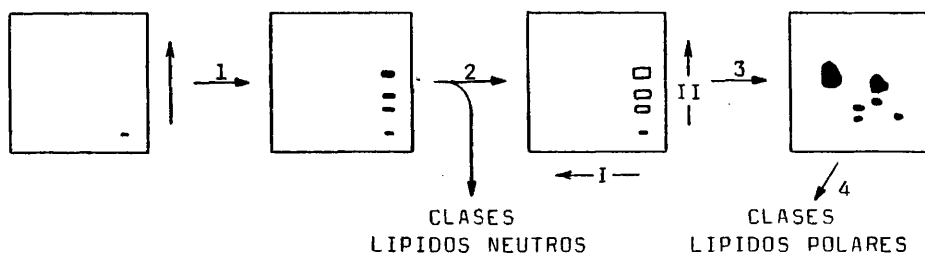
Glicerofosfolípidos:

I Cloroformo-metanol-amoniaco conc. (65:25:5, v/v/v)

II Cloroformo-acetona-metanol-ac. acético-agua (3:4:1:1:0.5, v/v)

El tiempo comprendido entre los desarrollos en las dos dimensiones y entre el final de las cromatografías y el análisis posterior se redujo al máximo, secando las placas con corriente de nitrógeno.

En la experimentación "in vitro" las cantidades de extracto lipídico que se obtenían eran muy pequeñas; por lo que para su total aprovechamiento se realizaron los fraccionamientos de lípidos neutros y polares en la misma placa, según el siguiente esquema:



1. Desarrollo en el sistema de lípidos neutros.
2. Se rascan las bandas correspondientes a clases de lípidos neutros, visualizadas revelando con rodamina 6G la zona de la placa en que se encuentran.
3. Desarrollo bidimensional en los sistemas de lípidos polares.
4. Se rascan las bandas correspondientes a clases de lípidos polares.

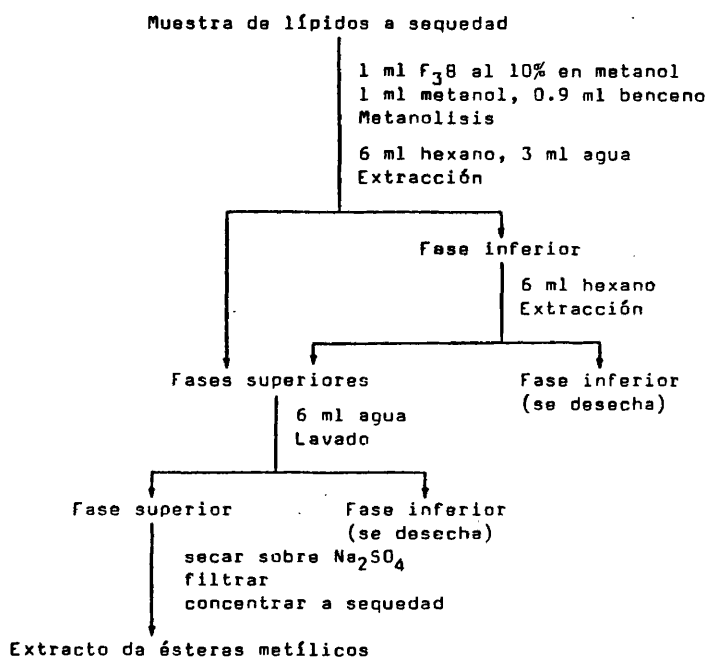
Para la visualización de las clases de lípidos en las placas de cromatografía se revelaron estas con vapores de yodo (Mangold y Malinc, 1961; Sims y Larose, 1962) cuando el análisis posterior fue conteo de centelleo líquido o valoración de fósforo y con rodamina 6G al 1% en metanol (Mangold y Malinc, 1961) siempre que el análisis posterior requería una cromatografía gas-líquido de ésteres metílicos de los ácidos grasos constituyentes.

La identificación de las manchas aparecidas en los cromatogramas se realizó mediante la utilización de patrones de las distintas clases de lípidos.

#### CROMATOGRAFIA GAS-LIQUIDO

La obtención de los ésteres metílicos de los ácidos grasos componentes de los lípidos se llevó a cabo según el método de Metcalfe y cols. (1966). Para ello los extractos lipídicos secos o las porciones de silicagel correspondientes a las clases de lípidos, separadas por cromatografía en capa fina, se sometieron a tratamiento con  $\text{BF}_3$  en metanol bajo atmósfera de nitrógeno (en

tubo cerrado con soplete) a 110°C durante 90 min. Seguidamente se extrajeron los ésteres metílicos de la mezcla de reacción según el siguiente esquema:



Para el análisis de ésteres metílicos el extracto seco se redisolvió en un pequeño volumen de hexano y se inyectó en un cromatógrafo de gases Hewlett-Packard 5750, equipado con un detector de ionización de llama y columnas de acero inoxidable de 2 m de longitud y 0.25 mm de diámetro interno, rellenas con succinato de dietilenglicol al 15% sobre cromosorb W/AW (80-100 mallas). Como fase móvil se utilizó helio con un flujo de 30 ml/min y las temperaturas de trabajo fueron 180°C en el horno, 250°C en el detector y 300 en el inyector. Las áreas de los picos resultantes en el análisis se determinaron con un integrador Hewlett-

Packard 3370A acoplado al equipo y la identidad de los mismos se estableció por comparación con patrones de ésteres metílicos de los diferentes ácidos grasos.

Para la determinación cuantitativa de clases de lípidos se ha seguido el método de Christie y cols. (1970), que se basa en la adición de un ácido graso conocido, como patrón interno, en cada muestra. Debido a que la respuesta de los detectores de ionización de llama es proporcional a la masa de cada componente, la cantidad total de ácidos grasos de cada clase de lípidos puede calcularse a partir de la suma de las áreas de sus picos, utilizando el factor de proporcionalidad área-masa obtenido para el patrón, cuya masa se conoce. La masa de la muestra se obtiene multiplicando la de sus ácidos grasos por un factor, calculado dividiendo el peso molecular del lípido, considerado como si fuera una especie molecular del ácido graso patrón, por el producto del peso molecular del éster metílico del ácido graso patrón por el número de restos de ácidos grasos que posea la molécula de lípido.

En los análisis realizados se utilizó como patrón interno ácido pentadecanoico, dado que no existe como componente de los lípidos de mamíferos.

Factores:

$$\text{TG: } F = \frac{\text{PM}(\text{Glicerol-3xPM 15:0})}{3 \times \text{PM EM 15:0}} = 0.994$$

$$\text{DG: } F = 1.054$$

$$\text{MG: } F = 1.233$$

$$\text{AGL: } F = 0.945$$

$$\text{PL: } F = 1.378$$

$$\text{LT: } F = 1.078$$

Para el cálculo del factor de glicerofosfolípidos se ha considerado la molécula de PC. El factor para lípidos totales se

ha obtenido teniendo en cuenta la contribución en tanto por ciento de cada una de las clases de lípidos.

El patrón se adicionó, como ácido graso libre disuelto en benceno, antes de la metanolisis adecuándose su cantidad a la de los lípidos a valorar.

#### VALORACION DE FOSFORO

La valoración del fósforo presente en las distintas clases de fosfolípidos se realizó siguiendo el método colorimétrico descrito por Rouser y cols. (1966) con ligeras modificaciones.

#### MEDIDA DE RADIOACTIVIDAD

La medida de la radiactividad incorporada en las distintas clases de lípidos se llevó a cabo por contaje de centelleo líquido en un espectrómetro Packard Tri-Carb 3255. Para ello se pasó el silicagel con los lípidos, separados por cromatografía en capa fina, a los viales con 10 ml de líquido de centelleo compuesto por:

PPD        4 g  
POPOP    100 mg  
Tolueno   1 l

Los viales se agitaron antes de las medidas para que el líquido de centelleo extrajera los lípidos del silicagel.

77

RESULTADOS Y DISCUSION

## EXPERIMENTACION "IN VIVO"

### SHOCK ENDOTOXICO

#### Evolución del shock

Transcurrido un tiempo después de la administración del LPS, las ratas presentaron una serie de manifestaciones de la aparición del shock, algunas de las cuales se acentuaban progresivamente. Entre ellas cabe destacar fiebre, postración, disnea e ingestión frecuente de agua. Las ratas que entraron en la fase de shock irreversible, al llegar al colapso circulatorio presentaron fuertes convulsiones que solían preceder a la muerte, la cual tenía lugar entre las 3 y las 6 h después de la administración del LPS.

El estudio de la variación de la presión arterial en seis de los animales permitió concluir el establecimiento de un shock circulatorio profundo. Las oscilaciones cíclicas de presión que aparecen en algunos casos son características del shock (figura 18).

Por otra parte, hay que resaltar que la respuesta al LPS exhibe variaciones individuales de importancia. Por ello en los estudios realizados "in vivo", los resultados correspondientes a los animales tratados con LPS se han distribuido en dos grupos distintos, según los animales hubieran alcanzado o no la fase irreversible del shock en el momento de sacrificarlos.

#### Niveles de clases de lípidos en suero y homogeneizado total de hígado

Una de las hipótesis propuestas (Jones, 1977), para explicar la lesión de las mitocondrias que tiene lugar en el shock endotóxico, se basa en la existencia de cambios en el metabolismo lipídico. Esta hipótesis sugiere que los AGL, cuyos niveles

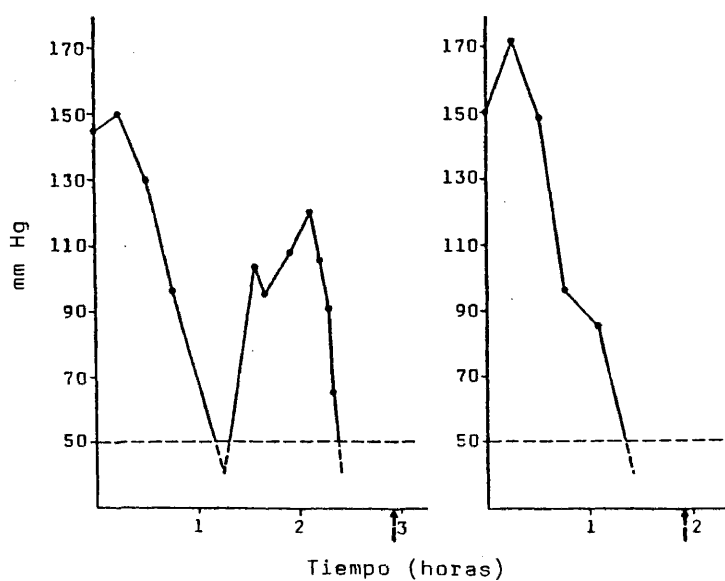
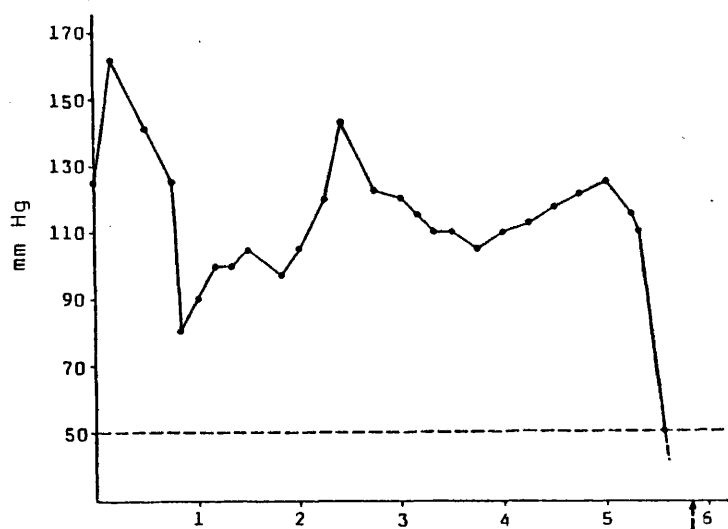


Figura 18.- Tres ejemplos representativos de la variación de presión arterial después de la administración de LPS. Las flechas indican el momento en que tuvo lugar la muerte y la línea discontinua el límite de sensibilidad de la técnica de medida.

presentan una elevación en sangre durante el shock, podrían ser capturados por los hepatocitos alterando la funcionalidad mitocondrial.

Sobre la base de dicha hipótesis se planteó un estudio de los cambios en los niveles de las diferentes clases de lípidos en suero y homogeneizado total de hígado, que tienen lugar en el shock endotóxico. Los resultados obtenidos se presentan en la figura 19.

Los niveles séricos de LT, TG, PL y AGL se elevan como consecuencia del shock y la elevación es más acusada en los animales que alcanzaron la fase irreversible (figura 19). Estos resultados concuerdan con los existentes en la literatura, a excepción de lo referente a los niveles de AGL, que según Sakaguchi y Sakaguchi (1979) presentan una elevación inicial, para luego descender a valores más bajos que los de los controles. La aparente discrepancia se basa en las diferencias del modelo de shock utilizado, ya que dichos autores administran el LPS por vía intraperitoneal, con lo cual el desarrollo del shock es mucho más lento. En nuestro modelo se alcanzan unos niveles elevados de LPS en sangre inmediatamente después de su administración y parece que el fenómeno predominante es la liberación de AGL del tejido adiposo, como consecuencia del efecto estimulante del LPS sobre la activación de la LSH por las catecolaminas, descrito por Spitzer (1979).

En homogeneizado total de hígado (figura 20) los niveles de LT presentan durante el shock una ligera disminución que se basa en su mayor parte en el descenso en los niveles de TG. También existe una disminución en los niveles de PL en los casos de shock irreversible, lo cual concuerda con la idea de que la extensión de esta disminución es crítica para la irreversibilidad de la lesión celular, como sugirieron Chien y cols. (1978) en sus estudios sobre la isquemia hepática. Los niveles de AGL

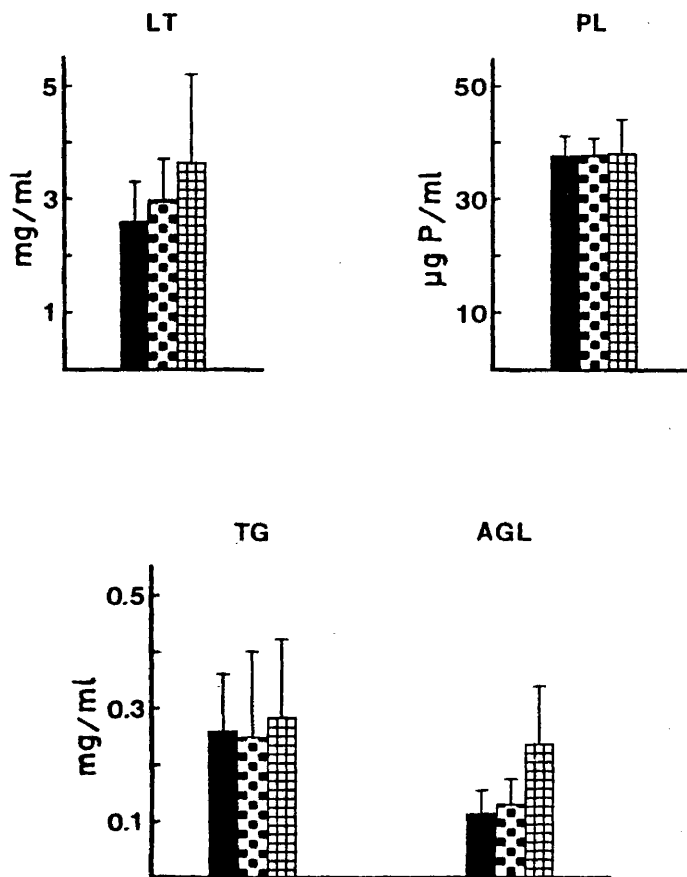


Figura 19.- Niveles de lípidos totales y de las principales clases de lípidos en suero (Media  $\pm$  desviación estandar).

- Control (n=8)
- ▣ Shock reversible (n=10)
- ▤ Shock irreversible (n=5)

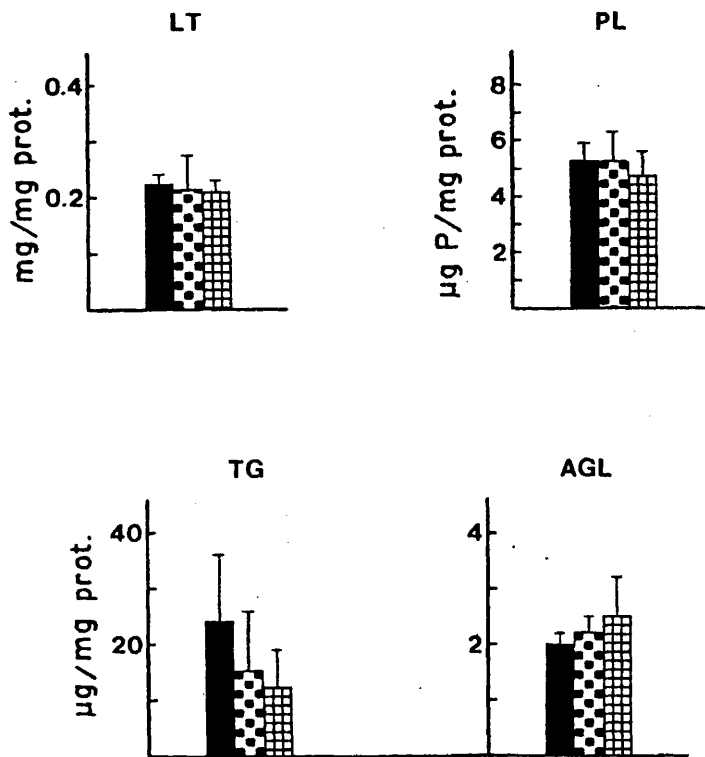


Figura 20.- Niveles de lípidos totales y de las principales clases de lípidos en homogeneizado total de hígado (Media  $\pm$  desviación estandar). El significado de las barras y los valores de n son los mismos que en la figura 19.

muestran una elevación que puede deberse a la lipólisis del tejido, o a un incremento en la captura de AGL originado por el aumento en sus niveles sanguíneos.

Composición en ácidos grasos de diferentes clases de lípidos neutros

Con el fin de estudiar las relaciones entre los cambios observados en los niveles de lípidos en suero y homogeneizado total de hígado, se ha determinado la composición en ácidos grasos de las clases de lípidos neutros más importantes. En el caso de los AGL los resultados obtenidos se muestran en la figura 21, expresados como cantidades absolutas de cada ácido graso por ml de suero y por mg de proteína de homogeneizado total, para analizar individualmente los cambios existentes. La figura 22 presenta las composiciones en ácidos grasos de los TG de suero y homogeneizado total y la tabla 9 las de los DG y MG de homogeneizado total, expresadas como % del total de ácidos grasos componentes. Solo se incluyen los ácidos grasos más importantes.

Considerando los niveles de cada AGL individual existen diferencias entre los presentes en suero y homogeneizado total, aunque en ambas localizaciones los niveles de los ácidos grasos saturados aumentan. El ácido oléico disminuye en el suero y aumenta en homogeneizado total en la fase irreversible del shock y esto podría ser el resultado de una captura incrementada por parte del tejido, ya que aumenta además el contenido en este ácido graso de los TG, DG y MG del tejido. Asimismo, en los casos de shock irreversible el ácido linoléico disminuye en suero pero no en homogeneizado total, lo cual podría explicarse suponiendo que la captura de este ácido graso por el tejido sea superior a su salida del mismo.

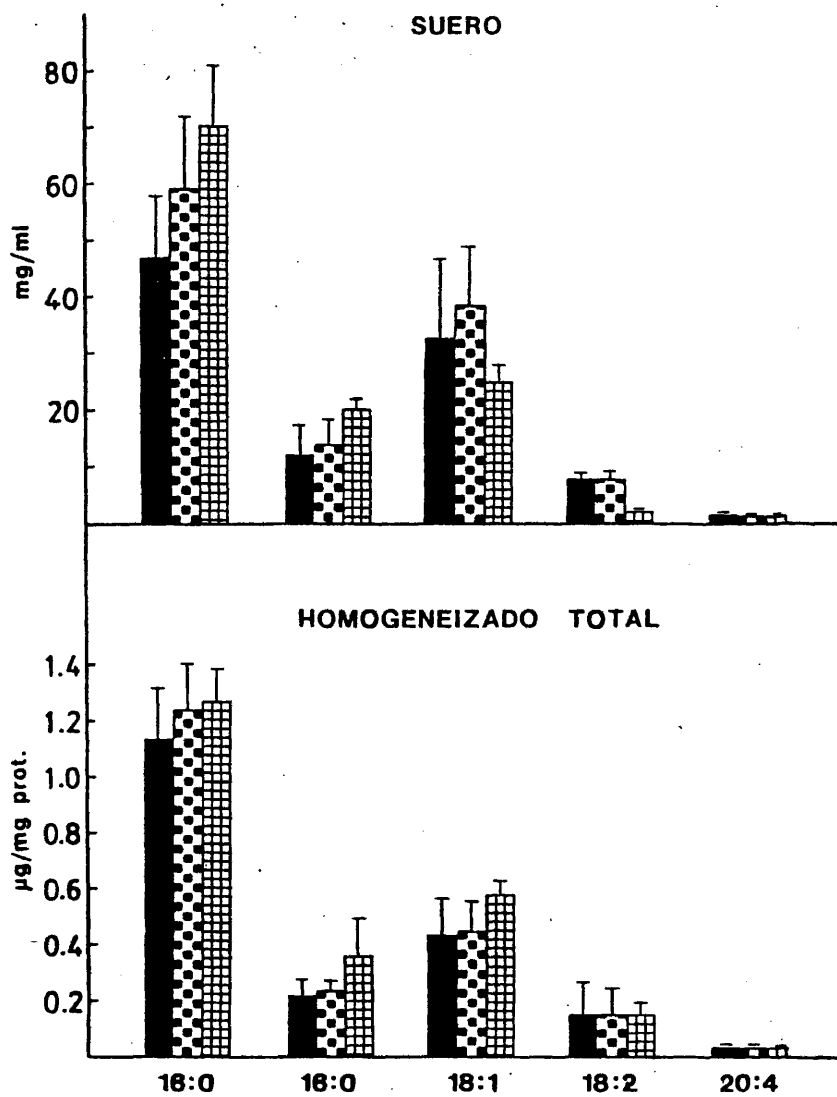


Figura 21.- Niveles de los principales ácidos grasos libres en suero y en homogeneizado total de hígado (media  $\pm$  desviación estándar). El significado de las barras y los valores de n son los mismos que en la figura 19.



Figura 22.- Composición en ácidos de los triglicéridos de suero y homogeneizado total de hígado (media  $\pm$  desviación estandar). El significado de las barras y los valores de n son los mismos que en la figura 19.

Acidos grasos (como % del total de ácidos grasos en peso)		MONOGLICERIDOS					
AG	DIGLICERIDOS			MONOGLICERIDOS			
	Control	Shock rever.	Shock irrever.	Control	Shock rever.	Shock irrever.	
16:0	43.1±3.8	45.5±3.8	42.9±3.1	41.6±2.2	40.4±5.4	41.2±0.2	
16:1	3.9±1.5	4.1±0.9	6.2±0.6	4.3±1.6	2.6±0.9	4.0±0.5	
18:0	7.1±2.5	7.0±1.3	8.2±2.5	10.9±2.8	10.9±2.9	14.8±0.4	
18:1	20.6±5.3	18.3±5.6	23.1±8.4	13.9±2.3	15.4±3.2	25.6±1.7	
18:2	16.9±5.4	13.8±2.9	8.8±1.3	7.5±4.2	7.8±7.5	5.1±0.4	
20:4	7.2±1.3	10.7±5.7	6.4±1.1	19.4±1.1	12.5±1.8	8.3±0.5	

Tabla 9.- Composición en ácidos grasos de los diglicéridos y monoglicéridos de homogeneizado total de hígado.

Hay que tener en cuenta, además, que en el hígado la hidrólisis de los lípidos del tejido puede contribuir también al mantenimiento de dichos niveles y de hecho, en los casos de shock irreversible el contenido en los ácidos linoléico y araquidónico de TG, DG y MG en homogeneizado total disminuye en el shock.

En la experimentación los animales estaban ayunados y en estas condiciones los AGL de suero proceden fundamentalmente de los depósitos de TG en el tejido adiposo, que están compuestos principalmente por ácidos grasos saturados. Por ello, es lógico que, si suponemos una lipólisis incrementada como consecuencia del shock, se eleven los niveles de los AGL saturados en suero. Además, la explicación de la disminución en los niveles del ácido linoléico en suero no debe estar en una menor liberación, sino en una mayor captura por parte de los tejidos.

Las variaciones en la composición en ácidos grasos de los TG de suero reflejan las de los niveles de cada AGL del mismo, como cabía esperar, ya que los AGL sanguíneos son los precursores para la síntesis de TG en el hígado, que luego pasan a la sangre.

#### Contenido en clases de lípidos de la fracción mitocondrial de hígado

Puesto que, como se comentó con detalle en la introducción, existían alguna hipótesis que proponían que la lesión de las mitocondrias podría basarse en una hidrólisis de los fosfolípidos de sus membranas, se han estudiado los cambios en el contenido en las principales clases de lípidos de la fracción mitocondrial de hígado que se producen como consecuencia del shock. Los resultados obtenidos se presentan en las figuras 23 y 24.

El contenido en LT de la fracción mitocondrial de hígado

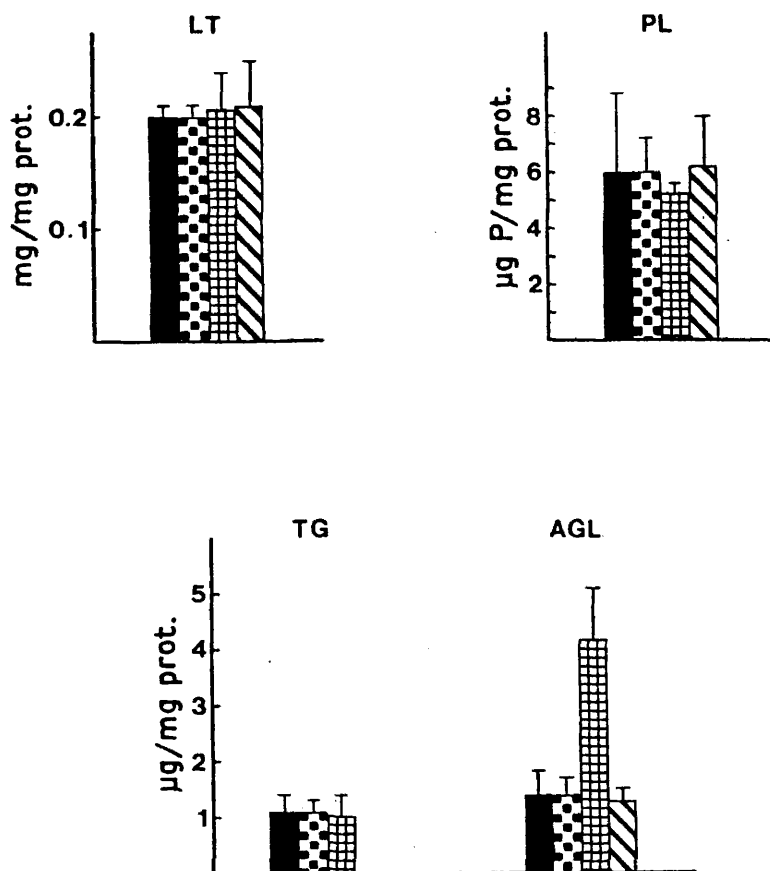


Figura 23.- Niveles de lípidos totales y de las principales clases de lípidos de la fracción mitocondrial de hígado (media  $\pm$  desviación estandar).

- Control (n=8)
- ▣ Shock reversible (n=10)
- ▤ Shock irreversible (n=5)
- ▥ Shock hemorrágico (n=7)

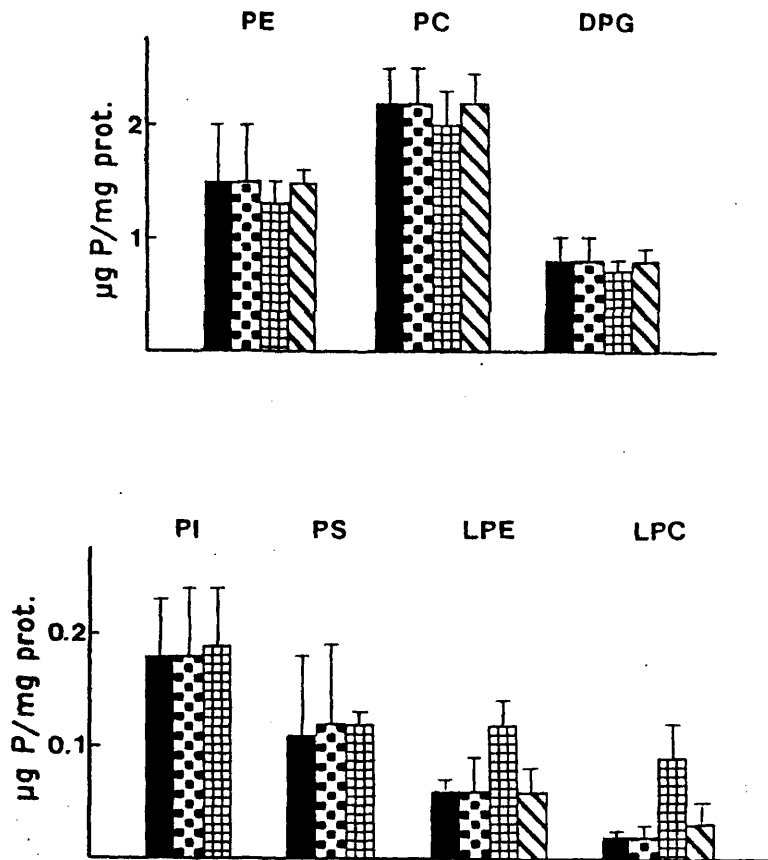


Figura 24.- Niveles de las principales clases de fosfolípidos de la fracción mitocondrial de hígado (media  $\pm$  desviación estandar). El significado de las barras y los valores de n son los mismos que en la figura 23.

no presenta variaciones significativas como consecuencia del shock. En lo que se refiere a las clases de lípidos no hay cambios en los casos de shock reversible, pero en los de shock irreversible aparece un aumento en el contenido en AGL y una disminución en el de fosfolípidos, que podría tener gran importancia considerando el papel fundamental de estos últimos componentes para la funcionalidad mitocondrial. El aumento en los niveles de AGL podría también tener efectos nocivos para la funcionalidad mitocondrial, ya que se ha descrito su actuación "in vitro" como desacoplantes (Bjorntorp y cols., 1964) y como ionóforos (Roman y cols., 1979).

El análisis de las distintas clases de fosfolípidos (figura 24) indica que la disminución en los casos de shock irreversible se centra principalmente en los componentes mayoritarios, PE y PC, en los que representa un 13.4 % y un 10 %, respectivamente; pero, además, se observa una disminución de un 12.5 % en DPG. Teniendo en cuenta que el DPG es un componente específico de la membrana interna, esta disminución también puede ser clave para la funcionalidad mitocondrial.

Por otra parte, hay que resaltar en los casos de shock irreversible la elevación en el contenido en LPE y LPC, que ha de ser el resultado de la desaparición de las formas diaciladas por la acción de una fosfolipasa A. Esta elevación también puede influir sobre la funcionalidad mitocondrial, suponiendo que se produzca en las zonas donde actúa la fosfolipasa A<sub>2</sub> un aumento local de la concentración, que pueda modificar la fluidez de la membrana, provocando un aumento en su permeabilidad.

Composición en ácidos grasos de clases de lípidos de la fracción mitocondrial

Teniendo en cuenta, por una parte, la importancia de los ácidos grasos poliinsaturados componentes de los fosfolípidos de las membranas para la fluidez de las mismas y para la funcionalidad de las enzimas presentes en ellas y, por otra parte, el interés por dilucidar el tipo de fosfolipasa responsable de la disminución observada en las principales clases de fosfolípidos de la fracción mitocondrial de hígado, se procedió al análisis cuali y cuantitativo de los ácidos grasos presentes en dichas clases de fosfolípidos. Las figuras 25 y 26 muestran los resultados obtenidos para los ácidos grasos mayoritarios. También se realizaron las valoraciones de los niveles de los AGL presentes en la fracción mitocondrial; los resultados de estas valoraciones aparecen en la figura 27.

En los casos de shock irreversible aparece una notable disminución en el contenido en los ácidos linoléico y araquidónico de la PE y la PC mitocondriales, mientras que los ácidos grasos saturados y monoinsaturados no presentan más que ligeras variaciones. También en el DPG disminuye el contenido en ácido linoléico, que es su ácido graso mayoritario.

Los resultados están expresados como cantidades absolutas de ácidos grasos/peso de proteína mitocondrial, por lo que representan las variaciones en el contenido de cada ácido graso individual. Así pues, estos resultados, al igual que los obtenidos mediante la valoración de fósforo, indican un predominio de la hidrólisis de PE, PC y DPG sobre la reacidación de los lisoderivados resultantes, que tiene lugar en condiciones normales en las mitocondrias.

Teniendo en cuenta que los ácidos linoléico y araquidónico ocupan casi exclusivamente la posición sn-2 de las moléculas de

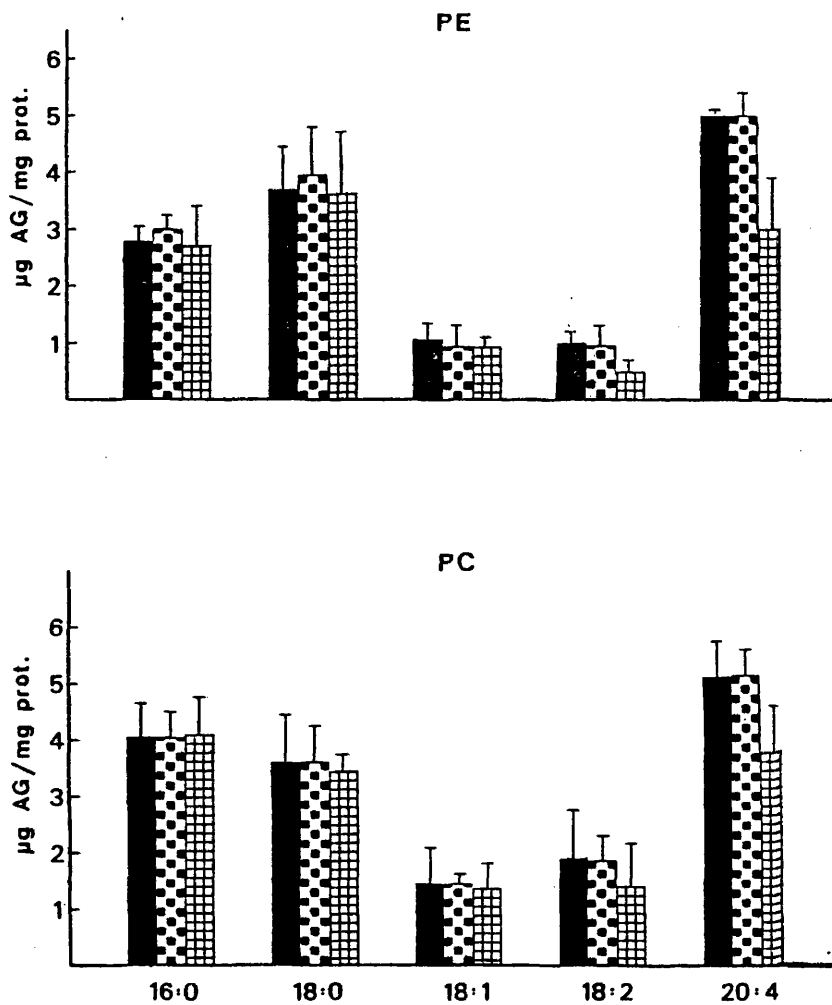


Figura 25.- Niveles de los principales ácidos grasos componentes de PE y PC de la fracción mitocondrial (media  $\pm$  desviación estandar). El significado de las barras y los valores de  $n$  son los mismos que en la figura 19.

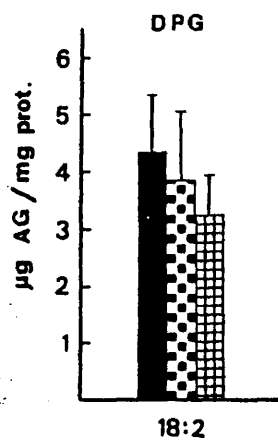


Figura 26.- Niveles de ácido linoléico del DPG de la fracción mitocondrial (media  $\pm$  desviación estandar). El significado de las barras y los valores de n son los mismos que en la figura 19.

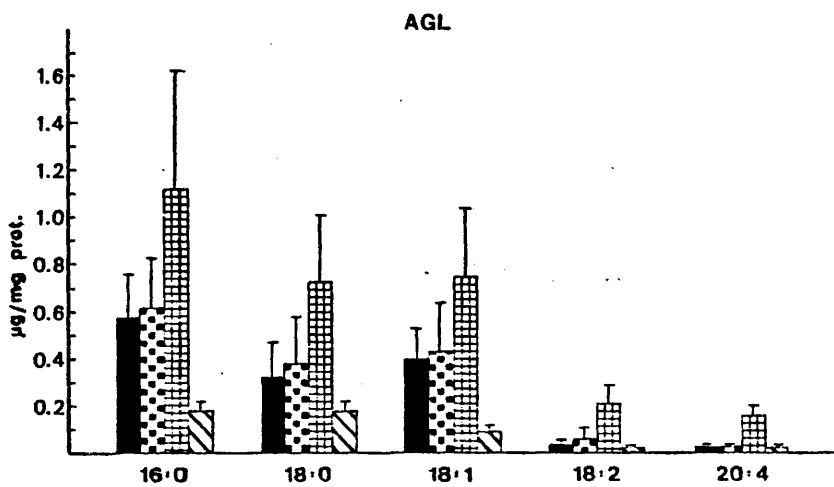


Figura 27.- Niveles de los principales ácidos grasos libres de la fracción mitocondrial (media  $\pm$  desviación estandar). El significado de las barras y los valores de n es igual que en la figura 23.

PE y PC, su desaparición ha de basarse en la actuación de la fosfolipasa A<sub>2</sub> mitocondrial.

La fracción de AGL presenta en los casos de shock irreversible una elevación de los niveles de todos los ácidos grasos, cuyo origen, a la vista de los resultados anteriores, no se puede explicar de la misma forma para los ácidos linoléico y araquidónico y para los restantes ácidos grasos. La elevación en los niveles de los primeros ha de ser el resultado de su liberación de las moléculas de fosfolípidos mitocondriales, mientras que la de los segundos podría basarse en un incremento en la captura por parte de las mitocondrias, debido al aumento en los niveles de dichos ácidos grasos en suero y, consecuentemente, en el tejido. La hidrólisis de los TG mitocondriales no podría dar cuenta de la elevación en los AGL, debido a que están presentes en muy pequeña cantidad.

Es necesario indicar que la elevación en los niveles de ácido araquidónico libre no es equivalente a su disminución en los fosfolípidos, lo cual indica una pérdida del mismo en la fracción mitocondrial.

#### Funcionalidad mitocondrial

Paralelamente a las determinaciones de composición lipídica se realizaron con otras alicuotas de las preparaciones mitocondriales estudios de funcionalidad, a fin de analizar las relaciones entre los cambios producidos en ambos parámetros. Los aspectos de la funcionalidad estudiados fueron: la respiración y la actividad de la succinato-citocromo c reductasa.

##### I. Respiración

En la figura 28 pueden observarse los valores de RCR y ADP/O calculados a partir de los registros de consumo de oxígeno realizados utilizando glutamato + malato y succinato como sustratos.

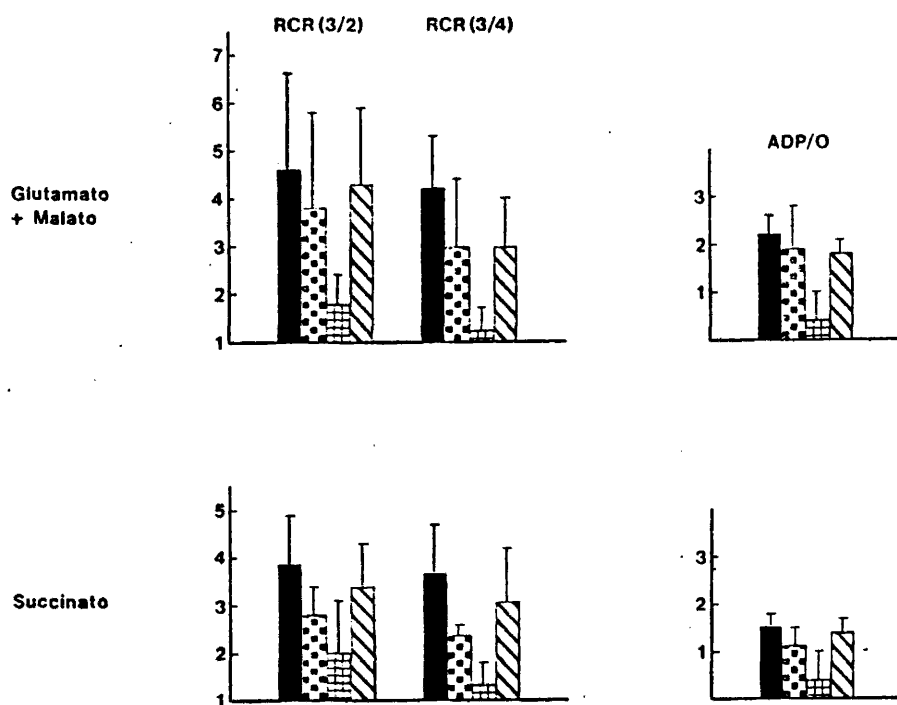


Figura 28.- Valores de RCR y ADP/O utilizando glutamato + malato y succinato como sustratos (media  $\pm$  desviación estándar). El significado de las barras y de los valores de n es el mismo que en la figura 23.

Como se deduce de los cambios en el RCR y en la relación ADP/O, la administración de LPS provoca una notable disminución en el grado de acoplamiento entre la respiración y la fosforilación, que se hace más patente en los casos de shock irreversible. Teniendo en cuenta que tales cambios se manifestaban utilizando sustratos correspondientes a los centros I y II de fosforilación, cabe pensar que reflejen no una disfunción parcial de uno de los centros de fosforilación, sino una alteración de la membrana interna mitocondrial que afecta a los dos centros mencionados.

Los resultados obtenidos concuerdan con los descritos por Mela y cols. (1969).

#### II. Actividad de la succinato-citocromo c reductasa

Los resultados de la valoración de la actividad de la succinato-citocromo c reductasa de las preparaciones mitocondriales se presentan en la tabla 10. Como puede observarse la mencionada actividad enzimática experimenta también una disminución notable en los casos de shock irreversible.

	Control	Shock irreversible
Actividad	45.8±1.9	22.0±2.2

Tabla 10.- Actividad de la succinato-citocromo c reductasa expresada en  $\mu$ moles de citocromo c reducido/min mg de proteína mitocondrial.

#### Relación composición lipídica-funcionalidad mitocondrial

Para estudiar la posible existencia de relaciones entre los cambios en la composición lipídica y la funcionalidad mitocondrial, se han realizado análisis de correlación entre los valores del RCR(3/2) con succinato como sustrato y los de varios parámetros correspondientes a la composición lipídica. Los resultados más interesantes se muestran en la figura 29. Puede apreciarse que los coeficientes de correlación entre el contenido en ácido araquidónico de PE y PC y el RCR son elevados, mientras que los correspondientes entre el contenido en ácido linoléico de ambos fosfolípidos y el RCR son notablemente más bajos.

A la vista de estos resultados cabe pensar que las especies moleculares de PE y PC que poseen ácido araquidónico tienen una significación fundamental para el acoplamiento de la fosforilación con la oxidación, quizá debido a que su interacción con las enzimas implicadas es indispensable para su función. Esta idea encaja dentro de la dependencia de la presencia de los fosfolípidos de membrana que presentan tanto los sistemas de transporte electrónico como la ATPasa, según se comentó con detalle en la introducción.

#### Relación de las alteraciones mitocondriales con la fisiopatología del shock endotóxico

Como ya se ha comentado, las alteraciones observadas en la composición lipídica y en la funcionalidad de las mitocondrias son muy importantes en los animales que alcanzaron la fase irreversible del shock, en tanto que en los que se encontraban en shock reversible sólo aparecen ligeros cambios en el grado de acoplamiento de la respiración y fosforilación (ver figuras 23, 24, 25, 26, 27 y 28. Ello se pone de manifiesto también en la figura 30, donde se ha representado el contenido en ácido araquidó

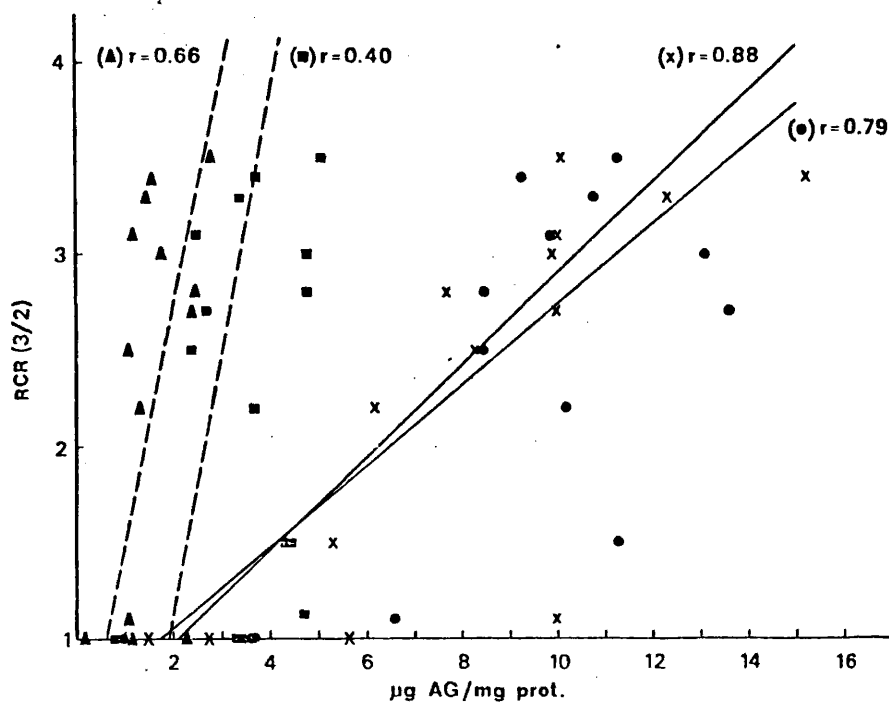


Figura 29.- Coeficientes de correlación ( $r$ ) entre RCR 3/2 usando succinato como sustrato y las cantidades de ácidos grasos para una serie de preparaciones de mitocondrias de hígado de ratas control y en estado de shock. Acido linoléico (---) de PE (▲) y PC (■). Acido araquidónico (—) de PE (●) y PC (x).

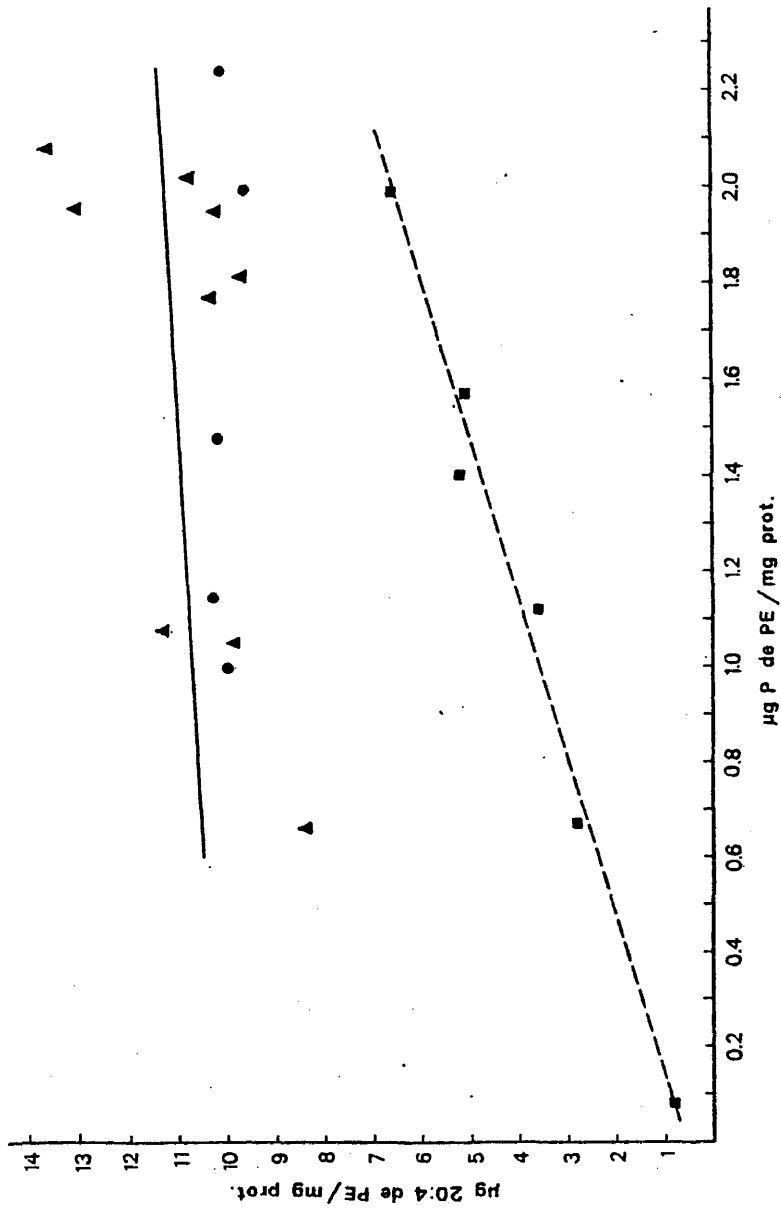


Figura 30.- Representación de los niveles de ácido aráquidónico de PE frente a los niveles de este fosfolípido en la fracción mitocondrial. Control (●), Shock reversible (▲), Shock irreversible (■).

nico de PE frente a los niveles de este fosfolípido. Puede observarse como, aunque los niveles de PE presentan variaciones, el contenido en dicho ácido graso de este fosfolípido no es nunca inferior a un cierto nivel en los animales control y en estado de shock reversible. Sin embargo, en los casos de shock irreversible aparece una notable disminución en el contenido en ácido araquidónico de PE.

De lo expuesto anteriormente podría deducirse que la magnitud de las alteraciones mitocondriales está estrechamente relacionada con la gravedad del shock endotóxico y que la disfunción de las mitocondrias es clave en el desarrollo de los procesos que conducen a la muerte en la fase irreversible del shock.

#### Actividad de la prostaglandina sintetasa microsomal de hígado

La cantidad de ácido araquidónico que se libera de los fosfolípidos de la fracción mitocondrial es superior a la que se acumula en la misma y no hay una elevación en los niveles de dicho ácido graso libre en homogeneizado total (figuras 25 y 21). Por ello hay que pensar que el ácido araquidónico se metaboliza o bien se incorpora nuevamente a fosfolípidos en la fracción microsomal. Dado que una de las posibles rutas de transformación del mencionado ácido graso es la biosíntesis de prostaglandinas y considerando la importancia de estos compuestos en la patofisiología del shock endotóxico, se ha evaluado también la actividad de la prostaglandina sintetasa microsomal de hígado, determinándose sus parámetros cinéticos  $K_M$  y  $V_{max}$ .

Los resultados obtenidos (tabla 11) indican que mientras la  $V_{max}$  no presenta variación, la  $K_M$  aumenta ligeramente en los animales que alcanzaron la fase irreversible del shock.

Teniendo en cuenta que estos estudios se realizaron "in vitro" con la fracción microsomal aislada, no parece probable que

	Control	Shock irreversible
$K_M$ ( $\mu M$ )	0.15 $\pm$ 0.04	0.25 $\pm$ 0.06
$V_{max}$ (nmol/min mg prot.)	176 $\pm$ 21	177 $\pm$ 23

Tabla 11.- Constantes cinéticas de la prostaglandina sintetasa microsomal de hígado.

los cambios observados sean debidos a la presencia de algún modu-  
lador soluble originado como consecuencia del shock. Cabe pensar  
pues, que durante el transcurso del shock se produzcan cambios  
en el retículo endoplásmico, capaces de modificar la afinidad de  
la prostaglandina sintetasa para el ácido araquidónico. En esta  
línea una hipótesis podría ser la oxidación de los grupos tióli-  
cos que, como se describió en la introducción, parecen estar im-  
plicados en la funcionalidad del mencionado sistema enzimático.  
Para estudiar esta posibilidad se valoraron los grupos tiólicos  
libres presentes en la fracción microsomal y, como puede apre-  
ciarse en la tabla 12, no existen diferencias significativas  
entre los valores de los controles y los correspondientes a ani-  
males en shock irreversible.

	Control	Shock irreversible
Grupos tiólicos nmol/mg proteína	42 $\pm$ 22	46 $\pm$ 14

Tabla 12.- Contenido en grupos tiólicos libres de la fracción microsomal de hígado.

Por otra parte, el aumento en la  $K_M$  observado en los anima-  
les en shock irreversible no es suficientemente grande como para

que se pueda pensar que tenga lugar una disminución notable en la actividad biosintética de las prostaglandinas; sobre todo teniendo en cuenta que en dicho estado la disponibilidad del sustrato, ácido araquidónico, es mayor. No obstante, es necesario indicar la importancia que puede tener en la desaparición del ácido araquidónico la peroxidación, reacción que está catalizada por la lipoxigenasa y requiere la presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o radicales O<sub>2</sub><sup>-</sup>. Puesto que, como se comentó en la introducción, ambos productos se acumulan en el citoplasma, debido a los cambios en el metabolismo celular que tienen lugar en el shock, es muy probable que la actividad de la lipoxigenasa esté incrementada en el mencionado estado fisiológico.

#### SHOCK HEMORRAGICO

La comparación de los efectos sobre las mitocondrias de dos tipos de shock de etiología muy distinta, como son el hemorrágico y el endotóxico, revestía un gran interés, ya que podría aportar información acerca de la contribución de los cambios hemodinámicos y metabólicos propios del shock circulatorio y de la que ejerce la actividad tóxica del LPS. Por ello, se realizaron estudios de la composición lipídica y la funcionalidad de las mitocondrias de hígado en animales sometidos a una hemorragia controlada.

#### Contenido en clases de lípidos de la fracción mitocondrial de hígado

El contenido en LI y en las clases de lípidos estudiadas de la fracción mitocondrial de hígado no presentó variación significativa como consecuencia del shock hemorrágico, según puede observarse en las figuras 23, 24 y 27. Estos resultados indican que en este tipo de shock no tiene lugar el incremento en la ac-

tividad de la fosfolipasa A<sub>2</sub> que ocurre en el shock endotóxico. Teniendo en cuenta que ambos tipos de shock tienen en común los cambios hormonales y la inadecuada perfusión tisular, no parece lógico pensar que estos fenómenos sean los responsables de dicha activación, sino que la misma ha de basarse en algún efecto propio del LPS, que quizá podría ser su acción directa sobre los hepatocitos o sobre las mitocondrias.

#### Funcionalidad mitocondrial: Respiración

Las mitocondrias hepáticas de animales sometidos a shock hemorrágico presentan una disminución el RCR y en la relación ADP/O con los dos tipos de sustratos, menor incluso que la observada en los casos de shock endotóxico reversible (figura 28). Por lo tanto, como consecuencia de la hemorragia aguda aparece también una lesión mitocondrial, pero de magnitud mucho menor que la que es capaz de provocar la administración de LPS, lo cual, unido a la ausencia de cambios en la composición lipídica, induce a pensar que la lesión se produce por mecanismos distintos en ambos casos.

#### EXPERIMENTACION "IN VITRO" CON FRACCION MITOCONDRIAL

Con el fin de profundizar en el estudio de los posibles mecanismos de la lesión mitocondrial y del incremento en la hidrólisis de fosfolípidos mitocondriales, observados en la experimentación "in vivo" como consecuencia de la administración de LPS, se planteó una experimentación "in vitro", consistente en la incubación de preparaciones mitocondriales en presencia de los factores que podrían ser responsables de dichos efectos. Estos factores son: el  $\text{Ca}^{2+}$ , activador de la fosfolipasa  $\text{A}_2$  mitocondrial, y el propio LPS interaccionando directamente con la membrana interna mitocondrial, como ya se comentó con detalle en la introducción. También se ensayó el efecto del ionóforo de  $\text{Ca}^{2+}$  A-23187, ya que una de las posibles formas de actuación del LPS podría basarse en su efecto ionóforo para dicho ión.

Las concentraciones de LPS utilizadas fueron de 50-80  $\mu\text{g}$  de LPS/mg de proteína mitocondrial, que corresponden, según un cálculo teórico aproximado, a las que se obtendrían en el hígado de los animales con el intervalo de dosis de LPS utilizado en la experimentación "in vivo".

Los aspectos estudiados en la experimentación "in vitro" fueron:

- Actividad de la fosfolipasa  $\text{A}_2$
- Incorporación de ácidos grasos en fosfolípidos
- Actividad respiratoria
- Capacidad de retención de  $\text{Ca}^{2+}$

#### Actividad de la fosfolipasa A<sub>2</sub>

La actividad fosfolipasa A<sub>2</sub> de las preparaciones mitocondriales se evaluó a través del aumento en el contenido en LPE, LPC y AGL. La elección del tiempo de incubación se realizó a partir de un estudio de variación de los niveles de hidrólisis con el tiempo (figura 31).

Como puede apreciarse en la figura 32, en ausencia de Ca<sup>2+</sup> el ionóforo A-23187 no tiene efecto alguno sobre la actividad fosfolipasa A<sub>2</sub>, pero el LPS la incrementa ligeramente; lo cual sugiere que la interacción del LPS con los fosfolípidos de las membranas mitocondriales favorece la acción de la enzima sobre ellos y que este efecto no se basa en una actuación como ionóforo. En respuesta al Ca<sup>2+</sup> solo o más LPS o ionóforo aparece un gran incremento en los niveles de lisofosfolípidos.

La presencia de otras partículas subcelulares en las preparaciones mitocondriales utilizadas no puede explicar los cambios observados, ya que los contaminantes fundamentales que pueden existir son lisosomas y la actividad fosfolipasa A<sub>2</sub> lisosomal resulta más inhibida que activada por Ca<sup>2+</sup> (Nachbaur y cols., 1972).

La acumulación de AGL presenta un gran paralelismo con el incremento en lisofosfolípidos (figura 33). La gran elevación en los ácidos grasos poliinsaturados, que acilan la posición sn-2 de la molécula fosfolipídica, indica la acumulación de 1-acil-lisofosfolípidos y demuestra la especificidad de la hidrólisis para la posición citada. El hecho de que estos ácidos grasos proceden de los fosfolípidos mitocondriales está apoyado además por la inexistencia de otras actividades lipásicas en las mitocondrias (Vignais y cols., 1976); ello elimina a los TG como posible fuente de AGL. Por otra parte, el contenido en acil-CoA es demasiado bajo para dar lugar a la aparición de las cantidades de AGL observadas.

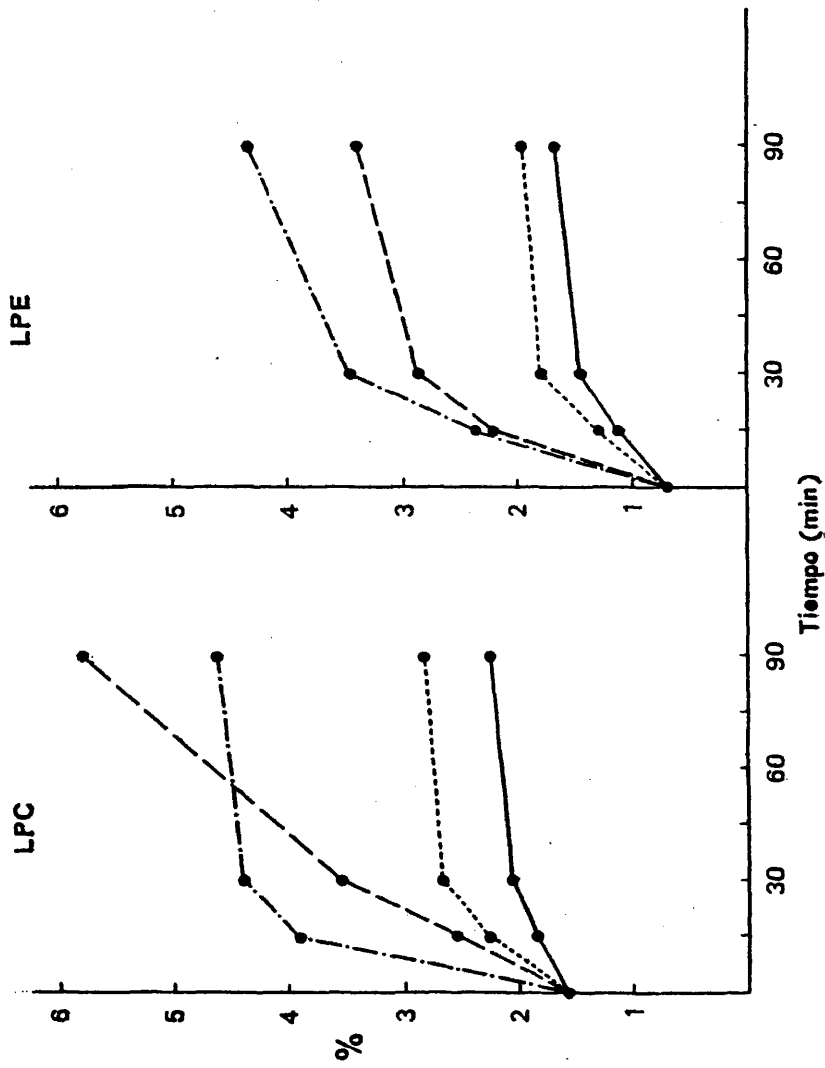


Figura 31.- Variación con el tiempo de incubación de los niveles de LPC y LPE expresados como % del total de fosfolípidos de colina y etanolamina respectivamente. Control (—), Ca<sup>2+</sup> (---), LPS (····) y Ca<sup>2+</sup> + LPS (—·—·).

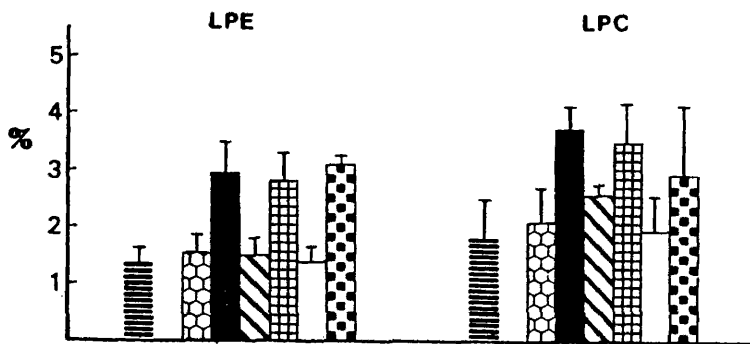


Figura 32.- Niveles de LPC y LPE expresados como % del total de fosfoglicéridos de colina y etanolamina respectivamente (media  $\pm$  desv. estandar). En todos los casos n = 6. (▨) Control tiempo 0, (○) Control 30 min, (■) Ca<sup>2+</sup>, (//) LPS, (▩) Ca<sup>2+</sup> + LPS, (□) ionóforo A 23187, (◻) Ca<sup>2+</sup> + Ionóforo A 23187.

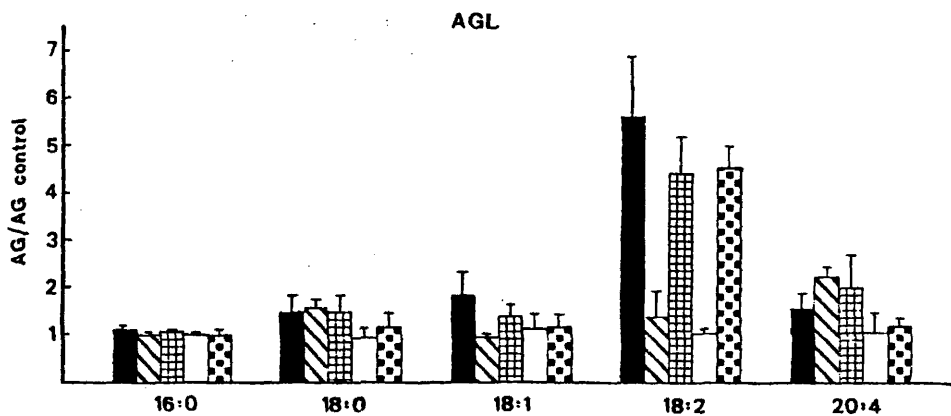


Figura 33.- Relaciones entre  $\mu$ g de ácido graso libre en cada uno de los distintos medios de ensayo y  $\mu$ g de ácido graso libre en las condiciones control. (media  $\pm$  desviación estandar). El significado de las figuras y los valores de n son los mismos que en la figura anterior.

Cabe resaltar el hecho de que en presencia de LPS aparece una elevación selectiva en el nivel de ácido araquidónico libre, lo cual sugiere que el desbalance entre la hidrólisis y la reacilación afecta preferentemente a dicho ácido graso y está de acuerdo con el pequeño incremento en los niveles de lisoderivados producido por el LPS. Puesto que ambos ácidos grasos poliinsaturados, araquidónico y linoléico, están localizados principalmente en la posición sn-2 de los fosfolípidos, la acumulación preferente de uno u otro inducida por  $Ca^{2+}$  o LPS podría resultar de un cierto grado de especificidad de la fosfolipasa A<sub>2</sub> hacia determinadas especies moleculares de sustrato, o bien de una inhibición en la utilización de uno de los dos ácidos grasos para la reacilación de los lisoderivados.

La primera de esas hipótesis se explicaría suponiendo que la fosfolipasa A<sub>2</sub> mitocondrial se activa por el  $Ca^{2+}$  o el LPS en localizaciones con diferente entorno fosfolipídico, lo cual es posible si se tiene en cuenta que, como se mencionó en la introducción (Tablas 5 y 6), existen grandes diferencias en el contenido en los dos ácidos grasos poliinsaturados entre los fosfolípidos de las dos membranas mitocondriales, e incluso entre los presentes en los dos lados de la membrana interna.

Puesto que en la experimentación "in vivo" se observó en los fosfolípidos mitocondriales una pérdida de ácido araquidónico preferentemente, los resultados obtenidos "in vitro" sugieren la necesidad de la participación de una interacción directa LPS-mitocondrias en la lesión mitocondrial "in vivo". El efecto del  $Ca^{2+}$  "in vitro" da lugar a la liberación preferente de ácido linoléico, por lo que la hidrólisis de los fosfolípidos mitocondriales "in vivo" no podría ser la respuesta a una elevación en los niveles citoplásmicos de  $Ca^{2+}$  únicamente.

#### Incorporación de ácidos grasos en fosfolípidos

La incorporación de ácidos grasos marcados radioisotópicamente en los glicerofosfolípidos de las preparaciones mitocondriales refleja la actividad de los dos sistemas enzimáticos implicados en la acilación: acil-CoA sintetasa y aciltransferasa (figura 10). Se han elegido para la experimentación los ácidos palmítico y araquidónico como representantes de las posiciones sn-1 y sn-2 de las moléculas de los fosfolípidos respectivamente.

En presencia de  $Ca^{2+}$  y de  $Ca^{2+} + LPS$  la incorporación de los dos ácidos grasos está notablemente disminuída; sin embargo, la presencia de LPS únicamente disminuye la incorporación del ácido araquidónico, pero no afecta a la del ácido palmítico (figura 34). Estos resultados apoyan la idea de que la disminución en la utilización del ácido araquidónico para la reacilación contribuye a la acumulación selectiva del mismo que tiene lugar en presencia de LPS.

Por otra parte, los diferentes efectos del LPS sobre la incorporación de los dos ácidos grasos sugieren que el cambio de actividad reside en la aciltransferasa, que presenta especificidad para el ácido graso, y no en la acil-CoA sintetasa, que es inespecífica.

#### Actividad respiratoria

En la figura 35 se presenta la variación del RCR con el tiempo de incubación. Puede observarse como la presencia del LPS provoca un descenso en los valores de dicho parámetro más rápido que el que tiene lugar en la preparación control, que se debe únicamente al envejecimiento mitocondrial. Por tanto, se puede concluir que el LPS origina "in vitro" un desacoplamiento entre la fosforilación y la respiración, hecho que ha sido observado también por otros autores como se comentó en la introducción.



Esta disminución en el grado de acoplamiento es menor que la que se produce en la experimentación "in vivo", lo cual concuerda con la circunstancia de que el LPS da lugar "in vitro" a una ligera hidrólisis de los fosfolípidos mitocondriales, muy inferior a la que ocurre "in vivo".

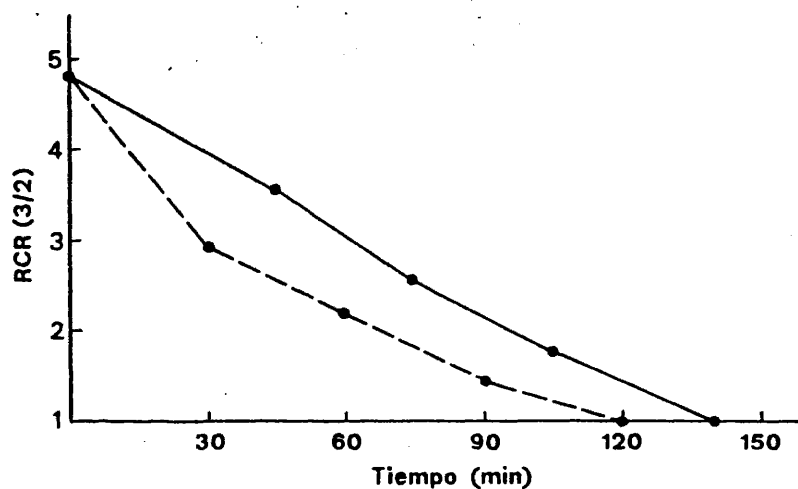


Figura 35.- Variación del RCR, utilizando succinato como sustrato, con el tiempo de incubación. (—) Control y (---) LPS.

#### Estudio de la capacidad de retención de $\text{Ca}^{2+}$

El efecto del LPS y del ionóforo A-23187 sobre la capacidad de retención de  $\text{Ca}^{2+}$  de las preparaciones mitocondriales se estudió utilizando una concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en el medio superior a la que son capaces de capturar las mitocondrias y registrando sus variaciones a lo largo del tiempo de incubación, en presencia de ambos productos (figura 36). La adición de  $\text{Ca}^{2+}$  va seguida de un descenso inicial en su concentración, correspondiente a la translocación del mismo al interior de las mitocondrias, por lo que la pendiente inicial de la desaparición del  $\text{Ca}^{2+}$  refleja la velocidad de captura del mismo.

La preparación control captura  $\text{Ca}^{2+}$  hasta alcanzar un estado estacionario, en el que el flujo de entrada y de salida del ión están compensados, estado que se mantiene durante algún tiempo. Después tiene lugar una liberación de  $\text{Ca}^{2+}$ , pero la concentración final en el medio es inferior a la inicial. Teniendo en cuenta que el tiempo transcurrido no es suficiente como para que las mitocondrias agoten el oxígeno del medio, este comportamiento podría explicarse suponiendo que, debido al agotamiento de los sustratos energéticos y al envejecimiento mitocondrial, llega un momento en el que las mitocondrias son incapaces de bombear el  $\text{Ca}^{2+}$  hacia su interior, con lo cual el flujo de salida a favor de gradiente supera al de entrada. La salida de  $\text{Ca}^{2+}$  continúa, quizá hasta que las concentraciones en el interior y en el exterior de las mitocondrias se igualan.

La presencia del LPS acelera la captura del  $\text{Ca}^{2+}$ , posiblemente debido a que la interacción del LPS con los fosfolípidos de la membrana favorece la unión del  $\text{Ca}^{2+}$  a los mismos, o bien su difusión desde la superficie hasta el transportador localizado en el interior de la membrana. Asimismo el LPS adelanta la liberación del  $\text{Ca}^{2+}$ , de forma que con la concentración más alta ni siquiera se alcanza el nivel máximo de captura a que se lle-

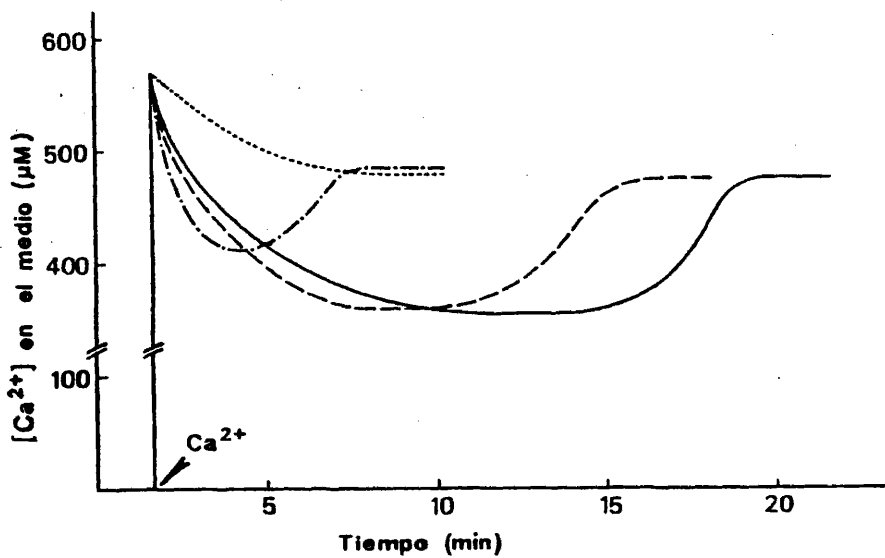


Figura 36.- Cambios en la concentración de  $Ca^{2+}$  extramitocondrial. Las diferentes condiciones de ensayo fueron:

- (—) Control
- (---) 0.2 mg LPS/ml
- (- · - ·) 1.2 mg LPS/ml
- (.....) Ionóforo A-23187 4  $\mu M$



gaba en el control. Este efecto podría basarse en una disminución en la producción de energía necesaria para el bombeo de  $\text{Ca}^{2+}$  hacia el interior de las mitocondrias y/o en un aumento en la permeabilidad de la membrana interna para este ión, según un mecanismo similar al propuesto por Beatrice y cols. (1980) para la acción de otros productos, basado en un incremento en la actividad fosfolipasa A2 mitocondrial.

Los resultados obtenidos apoyan la participación de ambos mecanismos; en primer lugar, la producción de energía está disminuída, pues el LPS provoca un desacoplamiento, y, en segundo término, el LPS origina un incremento en la actividad fosfolipasa A2 mitocondrial y puesto que, además, uno de los agentes que provocan el aumento de permeabilidad por el mencionado mecanismo es el palmitoil-CoA, parece lógico pensar que los ácidos grasos del lípido A pudieran actuar de esa forma. Pero el aumento en la permeabilidad para el  $\text{Ca}^{2+}$  podría basarse también en una pérdida del  $\text{Mg}^{2+}$  de la membrana interna, ya que según sugirieron Greer y cols. (1973) el LPS es capaz de secuestrarlo, o bien en cambios en la fluidez o en la densidad de carga de dicha membrana, debidos a la interacción con el LPS.

El efecto del ionóforo A-23187 hace que no se establezca gradiente de concentración entre el interior y el exterior de las mitocondrias, a pesar del bombeo hacia el interior; por ello únicamente se observa un descenso de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en el medio hasta que desaparece el gradiente inicial de concentración.

Comparando las acciones del LPS y del ionóforo A-23187 sobre la capacidad de retención de  $\text{Ca}^{2+}$  de las mitocondrias, parece claro que ambas son distintas y que el LPS no actúa como ionóforo propiamente dicho, sino que provoca un aumento en la permeabilidad de la membrana interna para dicho ión.

CONCLUSIONES

- Efectos del shock endotóxico:

- 1/ Activación de la lipólisis que da lugar a una elevación de los niveles de AGL en suero y en hígado.
- 2/ Disminución del grado de acoplamiento de la fosforilación y la oxidación de sustratos correspondientes a los centros I y II de fosforilación en las mitocondrias de hígado.
- 3/ Activación de la fosfolipasa A<sub>2</sub> mitocondrial que conduce a un descenso en los niveles de PE, PC y DPG y a un aumento en los de AGL, LPC y LPE. Tiene lugar una liberación preferente del ácido araquidónico de los fosfolípidos mitocondriales, que está estrechamente relacionada con los mencionados cambios en la funcionalidad de las mitocondrias.
- 4/ La magnitud de las alteraciones mitocondriales parece ser clave para la reversibilidad o irreversibilidad del shock endotóxico.
- 5/ Ligero aumento en la K<sub>M</sub> de la prostaglandina sintetasa microsomal que ha de basarse en cambios estructurales de la enzima. Este aumento en la K<sub>M</sub> no hace suponer una disminución en la velocidad en la biosíntesis de prostaglandinas, teniendo en cuenta la mayor disponibilidad de ácido araquidónico.

- Efectos del shock hemorrágico:

- 1/ Disminución del grado de acoplamiento de la fosforilación y la oxidación en las mitocondrias de hígado, inferior a la observada en los casos de shock endotóxico irreversible.
- 2/ No aparecen cambios en la composición lipídica de la fracción mitocondrial de hígado, lo cual sugiere que los cambios observados en el shock endotóxico requieren la participación de algún efecto propio de la acción del LPS.

- Comparación de las acciones "in vitro" del LPS, el Ca<sup>2+</sup> y el ionóforo A 23187 sobre las mitocondrias:

- 1/ El Ca<sup>2+</sup> y en menor medida el LPS provocan una activación de

la fosfolipasa A<sub>2</sub> que da lugar a la liberación preferente de los ácidos linoléico y araquidónico respectivamente. Estos hechos podrían soportar la proposición de que la fosfolipasa A<sub>2</sub> se activa en ambos casos en localizaciones con diferentes entornos fosfolipídicos.

- 2/ De igual forma el Ca<sup>2+</sup> y el LPS inhiben la incorporación de ácidos grasos en fosfolípidos, pero mientras el primero lo hace de forma inespecífica el segundo afecta selectivamente a la incorporación de ácido araquidónico. Este efecto podría contribuir también al desbalance entre la hidrólisis de los fosfolípidos por la acción de la fosfolipasa A<sub>2</sub> y la reacilación de los lisoderivados, que da lugar a la pérdida de sus ácidos grasos componentes.
- 3/ El LPS incide sobre la captura de Ca<sup>2+</sup> por las mitocondrias y quizá a través de este efecto actúa sobre la activación de la fosfolipasa A<sub>2</sub> por el Ca<sup>2+</sup>.
- 4/ Los efectos del ionóforo A 23187 y del LPS sobre los movimientos de Ca<sup>2+</sup> a través de la membrana mitocondrial son distintos, pudiendo concurirse que el LPS no actúa como ionóforo propiamente dicho. Cabe proponer que el LPS provoca un cambio en la permeabilidad de la membrana interna para el Ca<sup>2+</sup> que se basa en la activación de la hidrólisis de los fosfolípidos de la misma.
- 5/ El LPS ejerce "in vitro" unos efectos sobre la composición lipídica y el control respiratorio de las mitocondrias menos marcados que los observados "in vivo", lo cual hace suponer que en la lesión "in vivo" participan también otros factores entre los cuales podría estar la elevación en los niveles citoplásmicos de Ca<sup>2+</sup>.



- Adams, G.A. (1967) *Can. J. Biochem.*, 45: 422.
- Beatrice, M.C., Palmer, J.W., Pfeiffer, D.R. (1980) *J. Biol. Chem.*, 255: 8663.
- Becker, G.L., Fiskum, G., Lehninger, A.L. (1980) *J. Biol. Chem.* 255: 9009.
- Behling, U.H., Campbell, B., Chang, C.M., Rumpf, C., Nowotny, A. (1976) *J. Immunol.*, 117: 847.
- Benedetto, D.A., Shands, J.W.Jr., Shah, D.O. (1973) *Biochim. Biophys. Acta*, 298: 145.
- Binet, A., Volfin, P. (1975) *FEBS Lett.*, 49: 400.
- Björntorp, P., Ellis, A.H., Bradford, R.H. (1964) *J. Biol. Chem.*, 239: 339.
- Block, A.J., Poole, S., Vane, J.R. (1974) *Prostaglandins*, 7: 473.
- Blok, M.C., Van Der Neut-Kok, E.C.M., Van Deenen, L.L.M., De Gier, J. (1975) *Biochim. Biophys. Acta*, 406: 187.
- Blondin, G.A. (1975) *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 264: 98.
- Boivin, I., Mesrobian, L. (1935) *Rev. J. Immunol.*, 1: 553.
- Bradley, S.G. (1976) *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 151: 267.
- Bradley, S.G. (1979) *Ann. Rev. Microbiol.*, 33: 67.
- Bradley, S.G., Munson, A.E., Dewey, W.L., Harris, L.S. (1977) *Infect. Immun.*, 17: 325.
- Brierley, G., Merola, A.J. (1962) *Biochim. Biophys. Acta*, 64: 205.
- Carsten, M.E. (1973) *Gynecol. Invest.*, 4: 95.
- Chien, K.R., Abrams, J., Serroni, A., Martin, J.T., Farber, J.L. (1978) *J. Biol. Chem.*, 253: 4809.
- Christie, W.W., Noble, R.C., Moore, J.M. (1970) *Analyst*, 95: 940.
- Ciznar, I., Shands, J.W.Jr. (1971) *Infect. Immun.*, 4: 362.
- Connors, J., Fine, J., Kusano, K., McCrea, M.J., Parnas, I., Prosser, C.L. (1973) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 70: 3301.
- Cook, J.A., Wise, W.C., Halushka, P.V. (1980) *J. Clin. Invest.*, 65: 227.
- Coran, A.G., Cryer, P.E., Horwitz, D.L., Herman, C.M. (1972)

- Surgery, 71: 465.
- Daniel, A.M., Pierze, C.H., Shizgal, H.M. (1978) Surgery, 84: 588.
- Dean, R.T., Barret, A.J. (1976) Essays Biochem., 12: 73.
- DePierre, J.W., Ernster, L. (1977) Ann. Rev. Biochem., 46: 201.
- Egan, R.W., Paxton, J., Kuehl, F.A.Jr. (1976) J. Biol. Chem., 251: 7329.
- Egdal, R.H. (1959) J. Clin. Invest., 38: 1120.
- Erman, A., Raz, A. (1979) Biochem. J., 182: 821.
- Ernster, L. (1977) Ann. Rev. Biochem., 46: 981.
- Ernster, L., Kuylenstierna, B. (1970) en "Membranes of Mitochondria and Chloroplast" (ed. Racker, E.) p. 172-212. Van Nostrand-Reinhold, N.Y.
- Estabrook, R.W. (1964) Methods Enzymol., 10: 41.
- Evans, J., Mueller, P. (1963) J. Lipid Res., 4: 39.
- Farago, G., Levene, R.A., Drucker, W.R. (1970) Proc. Central. Soc. Clin. Res., 43: 92.
- Filkins, J.P., Cornell, R.P. (1974) Am. J. Physiol., 227: 778.
- Filkins, J.P., Buchanan, B.J., Cornell, R.P. (1975) Circ. Shock, 2: 129.
- Fillingame, R.M. (1980) Ann. Rev. Biochem., 49: 1079.
- Fiskum, G., Lehninger, A.L. (1980) Fed. Proc., 39: 2432.
- Folch, J., Lees, M., Sloane-Stanley, G.H. (1957) J. Biol. Chem., 226: 497.
- Fleischer, S., Casu, A., Fleischer, B. (1964) Fed. Proc., 23: 486.
- Fletcher, J.R., Ramwell, P.W. (1980) Adv. Shock Res., 3: 57.
- Flynn, J.T., Lefer, A.M. (1977) Biochim. Biophys. Acta, 497: 775.
- Fredholm, B.B. (1971) Acta Physiol. Scand., 81: 110.
- Galanos, C., Lüderitz, O., Westphal, O. (1969) Eur. J. Biochem., 9: 245.
- Gemmel, C.S. (1978) en "Bacterial Toxins and Cell Membranes" (ed. Jeljaszewicz, J. y Wadström, T.) p. 229-258. Acad Press, N.Y.

- Gimber, P.E., Rafter, G.W. (1969) Arch. Biochem. Biophys., 135:14.
- Goebel, W.F., Binkley, F., Perlman, E. (1945) J. Exp. Med., 81: 315.
- Goodrum, K.J., Moore, R.N., Berry, L.J. (1978) en "Toxins: Animal, Plant and Microbial" (ed. Rosemberg, P.) p. 899-905. Pergamon, N.Y.
- Greer, G.P., Epps, N.A., Vail, W.J. (1973) J. Infect. Dis., 128: 724.
- Groves, A.C., Duff, J.H., McLean, A.P.H., McLean, L.D. (1970) Surgery, 68: 656.
- Harris, R.A., Harris, D.L., Green, D.E. (1968) Arch. Biochem. Biophys., 128: 219.
- Heiffer, M.H., Mundy, R.L., Grimm, L.J.E. (1958) Fed. Proc., 17: 68.
- Hibbs, J.B.Jr. (1974) Science, 184: 468.
- Hirsch, R.L., McKay, D.G., Travers, R.I., Skraly, R.K. (1964) J. Lipid Res., 5: 563.
- Hjemdahl, P. (1976) Acta Physiol. Scand. (Suppl.), 434: 1.
- Isackson, P.C., Raz, A., Needleman, P. (1976) Prostaglandins, 12: 739.
- Isackson, P.C., Raz, A., Denny, S.E., Wyche, A. (1977) Prostaglandins, 14: 853.
- Jacobus, W.E., Brierley, G.P. (1969) J. Biol. Chem., 243: 5133.
- Jones, G.R.N. (1977) Biochem. Soc. Trans., 5: 213.
- Kabir, S., Rosenstreich, D.L. (1977) Infect. Immun., 15: 156.
- Kabir, S., Rosenstreich, D.L., Mergenhausen, S.E. (1978) en "Bacterial Toxins and Cell Membranes" (ed. Jeljaszewicz, J. y Wadström, T.) p. 59-83. Acad Press, N.Y.
- Kashyap, M.L., Tay, J.S.L., Sothy, S.P., Morrison, J.A. (1975) Metabolism, 24: 855.
- Kearney, J.F., Cooper, M.D., Lawton, A.R. (1976) J. Immunol., 117: 1567.

- Kelley, T.F. (1966) *J. Chromatogr.*, 22: 456.
- Kirtland, S.J., Baum, H. (1972) *Nature N. Biol.*, 236: 47.
- Kovach, A.G.B., Rosell, S., Sandor, P., Koltay, E., Kovach, E., Tomka, N. (1970) *Circ. Res.*, 26: 733.
- Krebs, J.J., Hanser, H., Carafoli, E. (1979) *J. Biol. Chem.*, 254: 5308.
- Kurland, J.L., Bockman, R. (1978) *J. Exp. Med.*, 147: 952.
- Lands, W., Samuelsson, B. (1968) *Biochim. Biophys. Acta*, 164: 426.
- Leive, L., Shovlin, V.K., Mergenhagen, S.E. (1968) *J. Biol. Chem.*, 243: 6384.
- Lowry, D.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. (1951) *J. Biol. Chem.*, 193: 265.
- Luckasen, J.R., White, J.G., Kersey, J.H. (1974) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 71: 5088.
- Lüderitz, O., Westphal, O., Sievers, K., Kröger, E., Neter, E., Braun, O.H. (1958) *Biochem. Z.*, 330: 34.
- MacIntyre, D.E., Pearson, J.D., Gordon J.L. (1978) *Nature*, 271: 549.
- Majewska, M.D., Lazarewicz, J.W., Strosznajder, J. (1977) *Bull. Acad. Pol. Sci. Ser. Sci. Biol.*, 25: 125.
- Mangold, H.K., Malinc, D.C. (1961) *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 37:383.
- McMurray, W.C. (1973) en "Form and Function of Phospholipids" (ed. Ansell, G.B., Dawson, R.M.C. y Hawthorne, J.N.) p. 205-246. Elsevier, Amsterdam.
- Mela, L., Chance, B. (1968) *Biochemistry*, 7: 4059.
- Mela, L., Miller, L.D., Diaco, J.F., Sugarman, H.J. (1970a) *Surgery*, 68: 541.
- Mela, L., Bacalzo, L.V.Jr., White, R.R., Miller, L.D. (1970b) *Surg. Forum*, 21: 6.
- Mela, L., Bacalzo, L.V., Miller, L.D. (1971) *Am. J. Physiol.*, 220: 571.
- Mela, L., Miller, L.D., Nicholas, G.G. (1972) *Surgery*, 72: 102.

- Mela, L., Miller, L.D., Bacalzo, L.V., Oloffson, K., White, R.  
(1973) *Ann. Surg.*, 178: 727.
- Mergner, W.J., Marzella, L., Mergner, C., Kahng, M.W., Smith, M.  
W., Trump, B.F. (1977a) *Beitr. Pathol.*, 161: 230.
- Mergner, W.J., Smith, M.W., Trump, B.F. (1977b) *Virchows Arch.*  
*B.*, 26: 17.
- Metcalfe, L.D., Schmitz, A.A. (1961) *Anal. Chem.*, 33: 363.
- Mitchell, P. (1976) *Biochem. Soc. Trans.*, 4: 399.
- Morgan, W.J.J., Partridge, S.M. (1942) *Br. J. Exp. Pathol.*, 23:  
151.
- Morita, I., Murota, S. (1978) *Eur. J. Biochem.*, 90: 441.
- Morita, I., Murota, S. (1980) *Biochim. Biophys. Acta*, 619: 428.
- Morrison, D.C., Leive, L. (1975) *J. Biol. Chem.*, 250: 2911.
- Morrison, D.C., Ryan, J.L. (1980) *Adv. Immunol.*, 28: 293.
- Morrison, D.C., Ulevitch, R.J. (1978) *Am. J. Pathol.*, 93: 526.
- Nachbaur, J., Colbeau, A., Vignais, P.M. (1972) *Biochim. Biophys.*  
*Acta*, 274: 426.
- Nahas, G.G., Poyart, C. (1967) *Am. J. Physiol.*, 212: 765.
- Neter, E. (1956) *Bact. Rev.*, 20: 166.
- Neter, E., Westphal, O., Lüderitz, O. (1955) *Proc. Soc. Exp.*  
*Biol. Med.*, 88: 339.
- Nicholas, G., Mela, L., Miller, L. (1974) *J. Surg. Res.*, 16: 375.
- Nichols, D.G. (1978) *Biochem. J.*, 176: 463.
- Nielson, P.A., Secher, N.J. (1970) *Life Sci.*, 9: 75.
- Nikaido, H. (1973) en "Bacterial Membranes and Walls" (Ed. Leive,  
L.) Vol. 1, p. 131-208. Marcel Dekker, Inc., N.Y.
- Nordstoga, K., Aasen, A.O. (1979) *Acta Path. Microbiol. Scand.*  
*Sect. A*, 87: 335.
- Nowotny, A., Behling, U.H., Chang, H.L. (1975) *J. Immunol.*, 115:  
199.
- Oades, Z.G., Morrison, D.C. (1978) *Am. Soc. Microbiol. (Abstr.)*
- Ongi, T., Liu, M. (1978) *Biochim. Biophys. Acta*, 558: 320.

- Osborn, M.J., Gander, J.E., Parisi, E., Carson, J. (1972) J. Biol. Chem., 247: 3962.
- Papahadjopoulos, D. (1972) Biochim. Biophys. Acta, 265: 169.
- Parce, W.J., Cunningham, C.C., Waite, M. (1978) Biochemistry, 17: 1634.
- Pfeiffer, D.R., Kauffman, R.F., Lardy, H.A. (1978) J. Biol. Chem., 253: 4165.
- Pfeiffer, D.R., Schmid, P.C., Beatrice, M.C., Schmid, H.H.O. (1979) J. Biol. Chem., 254: 11485.
- Pingleton, W.W., Coalson, J.J., Guenter, C.A. (1975) J. Exp. Mol. Pathol., 22: 83.
- Portolés, M.T., (1980) Memoria de Licenciatura. Universidad Complutense, Madrid.
- Raiji, L., Keane, W.F., Michael, A.F. (1977) Kidney Int., 12: 91.
- Rasmussen, H. (1970) Science, 170: 404.
- Raynaud, M., Kouznetova, B., Navarro, M., Chermann, J.C., Digeon, M., Petitprez, A. (1973) J. Infect. Dis., 128: 535.
- Ribi, E., Milner, K.C., Perrine, T.D. (1959) J. Immunol., 82: 75.
- Roman, I., Gmaj, P., Nowicka, C., Angielski, S. (1979) Eur. J. Biochem., 102: 615.
- Rosenstreich, D.L., Glode, L.M., Wahl, L.M., Sandberg, A.L., Morgenstern, S.E. (1977) en "Microbiology" (Ed. Schlessinger, D.) p. 314-320. Am. Soc. Microbiol., Washington, DC.
- Rossi, C.S., Lehninger, A.L. (1964) J. Biol. Chem., 239: 3971.
- Rouser, G., Siakotos, A.N., Fleischer, S. (1966) Lipids, 1: 85.
- Rouser, G., Fleischer, S., Yamamoto, A. (1970) Lipids, 5: 494.
- Sakaguchi, O., Sakaguchi, S. (1979) Microbiol. Immunol., 23: 71.
- Samuelsson, B., Granström, E., Green, K., Hamberg, M., Hammarström, S. (1975) Ann. Rev. Biochem., 44: 669.
- Samuelsson, B., Goldyne, M., Granström, E., Hamberg, M., Hammarström, S., Malmsten, C. (1978) Ann. Rev. Biochem., 47: 997.
- Saris, N.E., Akerman, K.E.O. (1980) Current Topics Bioenergetics,

10: 104.

- Saris, N.E.L., Wikström, M.F., Seppälä, A.J. (1969) en "Mitochondria: Structure and Function" (Ed. Ernster, L. y Drahota, Z.) p. 363-368. Acad. Press, N.Y.
- Scarpa, A., Azzi, A. (1968) *Biochim. Biophys. Acta*, 150: 473.
- Schneider, W.C. (1948) *J. Biol. Chem.*, 176: 259.
- Schuster, B.G., Palmer, R.F., Aronson, R.S. (1970) *J. Membr. Biol.*, 3: 67.
- Schwartzman, M., Raz, A. (1979) *Biochim. Biophys. Acta*, 472: 363.
- Shands, J.W.Jr. (1971) *Infect. Immun.*, 4: 167.
- Shands, J.W.Jr. (1973) en "Bacterial Lipopolysaccharides" (Ed. Kass, E.H. y Wolf, M.S.) p. 189-193. University Press, Chicago.
- Shands, J.W.Jr., Chun, P.W. (1980) *J. Biol. Chem.*, 255: 1221.
- Siliprandi, D., Rugolo, M., Zoccarato, F., Toninello, A., Siliprandi, N. (1979) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 88: 388.
- Sims, R.P.A., Larose, J.A.G. (1962) *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, 39: 232.
- Skillman, J.J., Hedley-White, J., Pallota, J.A. (1970) *Surg. Forum*, 21: 23.
- Spitzer, J.A. (1974) *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 145: 186.
- Spitzer, J.J. (1979) *Circ. Shock (Suppl.)*, 1: 69.
- Spitzer, J.J., Bechtel, A.A., Archer, L.T., Black, M.R., Hinshaw, L.B. (1974) *Am. J. Physiol.*, 227: 132.
- Springer, G.F., Abye, J.C. (1977) en "Microbiology" (Ed. Schlesinger, D.) p. 326-329. Am. Soc. Microbiol., Washington, DC
- Tedeschi, H. (1971) *Current Topics Membranes Transport*, 207-231.
- Tisdale, H.D. (1967) *Methods Enzymol.*, 10: 213.
- Utili, R., Abernathy, C.O., Zimmerman, H.J. (1977) *Life Sci.*, 20: 553.
- Vignais, P.M., Colbeau, A., Cuault, F., Ngo-Tri, H., Pilarska, M. (1976) en "Lipids" (Ed. Paoletti, R., Porcellati, G. y

- Jacini, G.) Vol. L, p. 117-126. Raven Press, N.Y.
- Waite, M., Scherphof, G.L., Boshowers, F.M.G., Van Deenen, L.L.M.  
(1969) J. Lipid Res., 10: 411.
- Walker, R.I. (1979) en "Experimental Hematology Today" (Ed. Baum,  
S.J. y Ledney, G.D.) Springer Verlag, N.Y.
- Walker, R.I., Snyder, S.L. (1978) en "Toxins: Animal, Plant and  
Microbial" (Ed. Rosemberg, P.) p. 933-946. Pergamon, N.Y.
- Watson, J. (1975) J. Exp. Med., 141: 1462.
- Welscher, H.D., Cruchaud, A. (1976) J. Reticuloendothel. Soc.,  
20: 405.
- Westphal, O., Lüderitz, O., Bister, F. (1952) Z. Naturf., 7b: 148.
- Whigham, H., Weil, M.H. (1966) J. Appl. Physiol., 21: 1860.
- White, R.R., Montgomery, E.H. (1977) Infect. Immun., 1: 440.
- Wikström, M., Krab, K. (1980) Current Topics Bioenergetics, 10: 52.
- Wojtczak, L. (1974) FEBS Lett., 44: 25.
- Wolfe, R.R., Elahi, D., Spitzer, J.J. (1977) Am. J. Physiol.,  
232: 180.
- Zlydaszyk, J.D., Moon, R.J. (1976) Infect. Immun., 14: 100.
- Zwadyk, P.Jr., Snyder, I.S. (1973) Proc. Soc. Exp. Biol. Med.,  
142: 299.

