

Tolerancia temprana *versus* reacción de Shwartzman en un modelo de daño pulmonar en el ratón empleando lipopolisacárido de *Klebsiella pneumoniae*

Rafael Ramírez Romero*

Carlos Barrera Zamora**

San Juana de Jesús Hernández Páez**

Resumen

Se ha referido que la administración previa de una dosis pequeña de lipopolisacárido (LPS) induce un efecto de tolerancia ante un desafío con una cantidad de LPS capaz de provocar choque y muerte; por otra parte, cuando se administra una cantidad subletal de LPS después de haberse inoculado otra cantidad equivalente del mismo compuesto en la piel u otro órgano, como el pulmón, acontece una reacción de Shwartzman. Considerado lo anterior, se efectuó este experimento para tratar de establecer si una dosis baja de LPS de *Escherichia coli*, administrada intraperitonealmente (IP), tiene un efecto favorable o adverso, dependiendo de si se aplica 24 horas antes o después de un desafío transtorácico (TT) con una cantidad de LPS de *Klebsiella pneumoniae* suficiente para provocar un severo daño pulmonar en ratones. La evaluación de la inflamación pulmonar se realizó mediante la comparación de los pesos de los pulmones y la observación histológica. Los resultados indican que la inoculación IP, antes o después del desafío TT, provocan un daño pulmonar mayor que la sola inoculación TT; sin embargo, sólo la inoculación IP posterior agrava significativamente la lesión pulmonar previa. Este efecto se considera representativo de una reacción de Shwartzman.

Introducción

Los lipopolisacáridos (LPS) son glicolípidos complejos derivados de la membrana externa de las bacterias gram-negativas. Actualmente existe un gran interés en el estudio de los LPS, dado que constituyen un estímulo amplio y potente para las células encarga-

das de instaurar la respuesta inmune, pero también se sabe que tienen una función preponderante en la patogénesis de infecciones por bacterias gram-negativas. Fuertes evidencias apoyan la idea de que los efectos adversos y los efectos favorables dependientes de los LPS son mediados por citocinas derivadas de macrófagos, en particular el factor de necrosis tumoral (FNT) y la interleucina-1 (IL-1).^{5,10}

Se ha señalado que una dosis baja de LPS puede ejercer un efecto protector cuando se administra antes de un desafío sistémico con otra dosis suficiente para provocar choque. En este modelo los macrófagos resultan ser las células responsables del estado de tolerancia, en tanto que la respuesta inmune humoral no tiene participación. Posteriormente se demostró que este mismo efecto protector, denominado tolerancia temprana porque ocurre entre 12 y 72 horas después de la administración del LPS, puede también ser inducido mediante dosis pequeñas de FNT e IL-1.^{1,3,4,15,17}

Cuando se administra sistemáticamente una dosis subletal de LPS, 18 a 24 horas después de una aplicación preparatoria del mismo compuesto en la piel o en un órgano determinado como el pulmón, hay una intensa respuesta inflamatoria con necrosis, trombosis y hemorragia, denominada reacción de Shwartzman.^{6,7,8} El FNT y la IL-1 son también mediadores importantes en este fenómeno inflamatorio.^{2,7,8} Considerando que las neumonías son uno de los padecimientos de mayor importancia en medicina, se decidió estudiar el efecto, tanto favorable como adverso, que una dosis baja de LPS pudiera tener cuando se administra por vía intraperitoneal (IP), antes o después de un desafío transtorácico (TT) con una dosis de LPS alta, suficiente para provocar una lesión pulmonar severa.

En este trabajo se empleó LPS de *Klebsiella pneumoniae* para la inoculación TT, mientras que para las inoculaciones IP se usó LPS de *Escherichia coli*. Se propuso que la aplicación previa disminuiría la severidad de la lesión pulmonar, suponiendo la inducción de un estado de tolerancia temprana, mientras que la administración posterior la exacerbaría, a manera de un fenómeno de Shwartzman.

Recibido para su publicación el 17 de marzo de 1993

Trabajo financiado parcialmente por la Secretaría de Educación Pública, mediante el convenio: 90-07-0201-901592.

*Departamento de Patología. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Autónoma de Nuevo León. Av. Lázaro Cárdenas 4600. Unidad Maderos. (64930, Monterrey, Nuevo León.

**Departamento de Microbiología. Facultad de Medicina. Universidad Autónoma de Nuevo León. Av. Madero y Dr. Eduardo Aguirre. 64460, Monterrey, Nuevo León.

Material y métodos

Animales

Se seleccionaron ratones machos de cepa BALB/c de 7 a 8 semanas de edad. Los animales se mantuvieron en condiciones adecuadas y se les proporcionó agua y alimento comercial *ad libitum*. Vale señalar que el experimento se inició 10 días después de recibir los animales en el laboratorio, periodo durante el cual se constató clínicamente su buen estado de salud. Luego, los ratones se distribuyeron al azar en tres grupos con 10 animales cada uno.

Lipopolisacáridos

Se utilizaron LPS comerciales† obtenidos por extracción con fenol de *E. coli* 026:B6 y *K. pneumoniae*. La preparación de las diluciones se llevó a cabo empleando solución Salina Fisiológica (SSF) libre de pirógenos.

Diseño experimental

El grupo A (testigo) recibió 24 horas antes 1 ml de SSF por vía IP; luego, a las 0 horas, un desafío TT sobre el pulmón derecho, tal como se ha realizado en otros experimentos,¹³ empleando LPS de *K. pneumoniae* en dosis de 100 µg contenidos en un volumen de 0.1 ml, y a las 24 horas posteriores otra cantidad igual de SSF por vía IP. El grupo B recibió 24 horas antes una dosis de 5 µg de LPS de *E. coli* por vía IP en un volumen similar al antes señalado, a las 0 horas el desafío TT fue igual al ya descrito y a las 24 horas hubo un desafío IP con SSF; en este grupo se evaluó el efecto de la inoculación previa de LPS. El grupo C recibió 24 horas antes SSF por vía IP, a las 0 horas un desafío TT similar a los grupos anteriores y a las 24 horas un desafío IP con 5 µg de LPS de *E. coli*; en este grupo se evaluó el efecto de la inoculación posterior al desafío TT. De esta manera, se tuvieron las siguientes comparaciones: Grupo A, sin efecto de dosis baja de LPS (ni antes ni después) sobre la inflamación pulmonar; grupo B, con efecto antes y grupo C, con efecto posterior. En el Cuadro 1 se presenta el diseño experimental.

Sacrificio y recolección de las muestras

A las 12 horas posteriores al último inóculo IP todos los animales fueron sacrificados, empleando pentobarbital por vía IP; posteriormente les fueron seccionados los grandes vasos sanguíneos del abdomen. Luego, se abrió la cavidad torácica y se extrajeron los pulmones. A continuación se observó la apariencia macroscópica de los pulmones comparando el pulmón derecho (inoculado) con el izquierdo (no inoculado).

Análisis estadísticos

Se registraron los pesos de los pulmones inoculados por cada grupo. Con estos datos se realizó un estudio estadístico comparativo, empleando un análisis de varianza con diseño completamente al azar y luego una prueba comparativa de Tukey en los casos en que se demostraron diferencias.¹² En este caso, se consideró que el peso de los pulmones estaría directamente relacionado con la intensidad de la respuesta inflamatoria, en particular por la hiperemia, el edema y la infiltración de células inflamatorias. En otros modelos de daño pulmonar, también se ha estimado el peso de los pulmones como un indicador de la intensidad inflamatoria.^{14,16} Se registraron los pesos de los pulmones izquierdos (no inoculados), para realizar con ellos una comparación estadística similar entre grupos y tomar dichos resultados como testigo.

Estudios de histopatología

Se tomaron pequeños trozos de tejido de los pulmones inoculados para fijarlos en formalina amortiguada y procesarlos por las técnicas histológicas convencionales y observar las lesiones al microscopio. Se incluyeron trozos de tejido de algunos pulmones no inoculados para utilizarlos como testigos.

Resultados

No se registró ninguna muerte; sin embargo, después de la inoculación TT la mayoría de los animales mostraba apatía y tenía el pelo hirsuto, así como tendencia a amontonarse. En algunos también se observó conjuntivitis y heces pastosas. Todas estas manifestaciones se atribuyeron al efecto de los LPS, como se señala en otros estudios.¹

Los pulmones derechos de todos los animales aparecieron turgentes, congestionados y edematosos; en algunos se reconocieron además áreas de hemorragia y consolidación adyacentes al sitio de inoculación. Los pulmones izquierdos no mostraron cambios.

Al comparar los valores obtenidos de los pesos de los pulmones derechos se constató que había diferencias entre grupos ($P < 0.05$), demostrándose que los valores del grupo C eran mayores que los del grupo A (Tukey, $P < 0.05$). No se reconocieron diferencias en ninguna otra comparación (Tukey, $P > 0.05$). En el Cuadro 2 se presentan estos resultados. En cuanto a los valores de los pulmones izquierdo no hubo diferencias entre grupos ($P > 0.1$). En el Cuadro 3 se presentan estos resultados.

Cuadro 1
DISEÑO EXPERIMENTAL

	-24 h	0 h	24 h	36 h
Grupo A	SSF (1 ml), IP	100 µg LPS, TT**	SSF (1 ml), IP	Sacrificio
Grupo B	5 µg LPS, IP*	100 µg LPS, TT**	SSF (1 ml), IP	Sacrificio
Grupo C	SSF (1 ml), IP	100 µg LPS, TT**	5 µg LPS, IP*	Sacrificio

*Se empleó LPS de *E. coli* en un volumen de 1 ml

** Se empleó LPS de *K. pneumoniae* en un volumen de 0.1 ml

† Sigma Chemical Company

Cuadro 2
COMPARACION DE LAS MEDIAS DE LOS VALORES
OBTENIDOS DE LOS PESOS DE LOS PULMONES INOCULADOS
EN LOS DIFERENTES GRUPOS

	Media	Desviación estándar
Grupo A	0.1283 g +/-	0.0229
Grupo B	0.1406 g +/-	0.0291
Grupo C	0.1589 g +/-	0.0282*

*Grupo C difiere del grupo A ($P < 0.05$) pero no del grupo B ($P > 0.05$); a su vez, el grupo B tampoco es diferente del grupo A ($P > 0.05$)

El estudio histológico demostró en todos los animales un engrosamiento de los septos alveolares por infiltración de Polimorfonucleares (PMN) y edema intersticial, así como áreas de hemorragia. Casi siempre el daño era difuso; no obstante, en algunos se reconoció una parcial delimitación de las lesiones más severas, subyacentes a la pleura, la que también se encontraba comprometida, guardando relación con el sitio de la inoculación. Los pulmones izquierdos no mostraron cambios.

Cuadro 3
COMPARACION DE LAS MEDIAS DE LOS VALORES
OBTENIDOS DE LOS PESOS DE PULMONES NO INOCULADOS
EN LOS DIFERENTES GRUPOS

	Media	Desviación estándar
Grupo A	0.0573 g +/-	0.0126
Grupo B	0.0525 g +/-	0.0038
Grupo C	0.0531 g +/-	0.0078

No existen diferencias entre los grupos ($P > 0.1$)

Discusión

Se ha señalado que la habilidad de un animal de volverse tolerante al estímulo de las endotoxinas es esencial para presentar una respuesta inflamatoria controlada y, por lo tanto, para su sobrevivencia.¹⁷ Al respecto, se ha demostrado que los LPS pueden aumentar la resistencia inespecífica del hospedador contra infecciones bacterianas, cuando se administran antes del desafío.¹¹ Asimismo, una pequeña cantidad de LPS administrada previamente favorece la sobrevivencia de ratones y ratas cuando éstos son desafiados sistémicamente con una dosis suficiente para provocar choque.^{1, 3, 4, 15, 17}

En cambio, se presenta un drástico contraste cuando la exposición con LPS ocurre después del desafío bacteriano. Por ejemplo, se observó que cuando los animales son expuestos a LPS después de un desafío con una cantidad de bacterias que normalmente no constituye un riesgo para su sobrevivencia, éstos pueden incluso morir.¹¹ De igual manera, una aplicación subletal (desencadenante) de LPS administrada por vía endovenosa, 18 a 24 horas después de una

inoculación inicial del LPS (preparatoria) en piel o en otros órganos como el pulmón, ocasiona en estos sitios una reacción de Shwartzman local o univisceral, respectivamente.^{6, 8}

Al considerar estos dramáticos efectos de los LPS y también que las neumonías por *K. pneumoniae* son todavía un grave problema en medicina,⁹ se realizó este trabajo en el que originalmente se supuso que la administración previa de LPS de *E. coli*, podría tener un efecto favorable al moderar la respuesta inflamatoria ocasionada por *K. pneumoniae* en el pulmón, mientras que la aplicación posterior del LPS de *E. coli* exacerbaría la lesión pulmonar. Sin embargo, conforme a los resultados obtenidos, no se demuestra un efecto favorable de la administración previa del LPS sobre la inflamación pulmonar, en tanto que la administración posterior sí la exacerba.

En relación con la ausencia de efecto favorable del LPS administrado antes del desafío TT, puede decirse que éste constituyó un estímulo flogístico de tal magnitud que se sobrepasaron los posibles efectos benéficos esperados. De hecho, todos los animales mostraron lesiones pulmonares similares y en la mayoría se apreciaron manifestaciones clínicas que pueden ser atribuidas a los LPS,¹ luego de la administración TT. No obstante, en caso de que este efecto benéfico se hubiera apenas insinuado, el grupo B hubiera tenido pesos pulmonares parecidos o ligeramente menores que el grupo A; sin embargo, los valores fueron superiores, aunque la falta de significancia estadística no demuestra que en realidad sean diferentes. Por tanto, en este estudio se descarta el probable efecto benéfico de la dosis baja de LPS administrada previamente.

La sola inoculación IP de LPS en la dosis que aquí se utilizó no tiene efecto flogístico sobre el pulmón; de lo contrario, hubieran existido diferencias entre los grupos cuando se analizaron los pesos de los pulmones izquierdos. Esta similitud en los pesos de los pulmones no inoculados ratifica que las diferencias encontradas en los pulmones derechos corresponde al efecto del LPS administrado por vía TT, y que, además, sobre esta lesión existe un efecto inflamatorio aditivo o mejor dicho, sinérgico, cuando se aplica una pequeña dosis de LPS posteriormente. Esta observación se considera compatible con una reacción de Shwartzman.

Aunque la reacción de Shwartzman ha sido ampliamente estudiada, todavía no se esclarecen del todo los complejos mecanismos que la originan.⁸ No obstante, se sabe que intervienen los sistemas de coagulación y del complemento, así como los PMN; también se ha referido la participación de la IL-1, el FNT y el interferón Gamma.^{2, 7, 8}

Se ha referido recientemente un modelo de la reacción de Shwartzman en el pulmón del conejo; en este caso, la inoculación preparatoria se administra endotraquealmente (ET) y luego la inoculación desencadenante se realiza por vía endovenosa (EV).⁸ En el presente trabajo la inoculación ET se suple por la inoculación TT sobre el pulmón derecho, mientras que la EV por la inoculación IP. La dosis de LPS que aquí se

empleó para la inoculación IP en ratones, resulta bastante inferior a la que comúnmente se utilizaría como desencadenante por vía EV para generar una reacción de Shwartzman. Esto se debió a que la comparación con el efecto del LPS administrado previamente, requería de dosis pequeñas por ruta IP, como se ha referido en los modelos de tolerancia temprana.^{1,3,4,15,17} No obstante, cantidades pequeñas de LPS administradas por esta vía aún pueden generar un efecto compatible con una inoculación desencadenante en un fenómeno de Shwartzman.

Abstract

A previous administration of a low dose of lipopolysaccharide (LPS) induces a state of early tolerance against a further LPS inoculation enough to provoke shock and death. However, when a sublethal amount of LPS is systemically administered, after another small amount of LPS previously inoculated in the skin or other organ like the lung, a local Shwartzman reaction could occur. The objective of this study was to evaluate if a small dose of *E. coli* LPS administered intraperitoneally (IP), before or after a transthoracic (TT) challenge with *K. pneumoniae* LPS in mice, induces a beneficial or an adverse effect on the lung inflammatory response. Comparisons, employing lung wet weight as an indicator of inflammatory reaction and histopathological observations, were made. Results showed that either a previous or posterior LPS IP small dose is more phlogistic than TT induced lung lesion alone. However, only the posterior small dose of LPS IP provokes a significant aggravating effect over the previous induced TT lung lesion. This effect was considered as a Shwartzman reaction.

Literatura citada

- Alexander, H.R., Doherty, G.M., Block, M.I., Kragel, P.J., Jensen, J.C., Langstein, H.N., Walker, E. and Norton, J.A.: Single-dose tumor necrosis factor protection against endotoxin-induced shock and tissue injury in rats. *Infect. Immunol.*, 59: 3889-3894 (1991).
- Billiau, A.: Gamma-interferon: The match that lights the fire. *Immunol. Today*, 9: 37-40 (1988).
- Henricson, B.E., Benjamin, W.R. and Vogel, S.N.: Differential cytokine induction by doses of lipopolysaccharide and monophosphoryl lipid A that result in equivalent early endotoxin tolerance. *Infect. Immunol.*, 59: 2429-2437 (1990).
- Henricson, B.E., Neta, R. and Vogel, S.N.: An interleukin-1 receptor antagonist blocks lipopolysaccharide-induced colony stimulating factor production and early endotoxin tolerance. *Infect. Immunol.*, 59: 1188-1191 (1991).
- Lynn, W.A. and Golenbock, D.T.: Lipopolysaccharide antagonists. *Immunol. Today*, 13: 271-276 (1992).
- Mori, W.: The Shwartzman reaction: A review including clinical manifestations and proposal for a univisceral of single organ third type. *Histopathology*, 5: 113-126 (1981).
- Movat, H.Z. and Burrowes, C.E.: The local Shwartzman reaction: Endotoxin mediated inflammatory and thrombo-hemorrhagic lesions. In: Cellular Biology of Endotoxin. Edited by: Berry, L.J., 260-302. Elsevier, Amsterdam, 1985.
- Ramírez, R.R., Sandoval, T.D. y Suárez, S.A.: Inducción de la reacción de Shwartzman en el pulmón del conejo empleando lipopolisacárido de *Pasteurella multocida*. *Vet. Méx.*, 22: 415-424 (1991).
- Rani, M., Gupta, R.K. and Chhibber, S.: Protection against *Klebsiella pneumoniae* induced lobar pneumonia in rats with lipopolysaccharide and related antigens. *Can. J. Microbiol.*, 36: 885-890 (1990).
- Rietschel, E.T. and Brade, H.: Bacterial endotoxins. *Scientific American*, 267: 26-33 (1992).
- Roth, J.A.: Enhancement of nonspecific resistance to bacterial infection by biologic response modifiers. In: Virulence Mechanisms of Bacterial Pathogens. Edited by: Roth, J.A., 329-342. American Society for Microbiology, Washington, D.C., 1988.
- Steel, R.G.D. and Torrie, J.H.: Principles and Procedures of Statistics. 2nd ed. McGraw-Hill, Singapore, 1981.
- Stine, D.L., Huether, M.J., Moxley, R.A. and Srikumaran, S.: *Actinobacillus pleuropneumoniae*-induced thymic lesions in mice and pigs. *Infect. Immunol.*, 59: 2885-2891 (1991).
- Till, G.O., Morganroth, M.L., Kunkel, R. and Ward, P.A.: Activation of C5 by cobra venom factor is required in neutrophil mediated lung injury in the rat. *Am. J. Pathol.*, 129: 44-53 (1987).
- Vogel, S.N., Kaufman, E.N., Tate, M.D. and Neta, R.: Recombinant interleukin-1 α and recombinant tumor necrosis factor α synergize *in vivo* to induce early endotoxin tolerance and associated hematopoietic changes. *Infect. Immunol.*, 56: 2650-2657 (1988).
- Zhou, W., McCollum, M.O., Levine, B.A. and Olson, M.S.: Role of platelet-activating factor in pancreatitis-associated acute lung injury in the rat. *Am. J. Pathol.*, 140: 971-979 (1992).
- Zuckerman, S.H., Evans, G. and Butler, L.D.: Endotoxin tolerance: Independent regulation of interleukin-1 and tumor necrosis factor expression. *Infect. Immunol.*, 59: 2774-2780 (1991).