

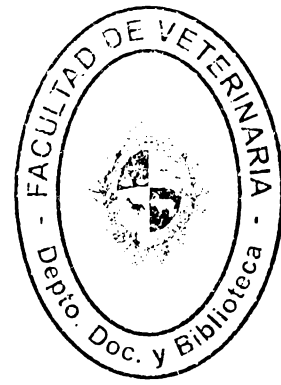
UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

“ENDOTOXEMIA EN AFECCIONES GASTROINTESTINALES DEL EQUINO”

por

BIMSON BREEZE, Nicholas



TESIS DE GRADO
presentada como uno de
los requisitos para obtener el título de Doctor
en Ciencias Veterinarias. (Orientación:
Medicina Veterinaria).

MODALIDAD Revisión Bibliográfica



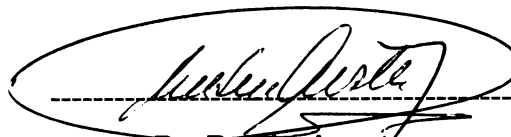
MONTEVIDEO

URUGUAY

2010

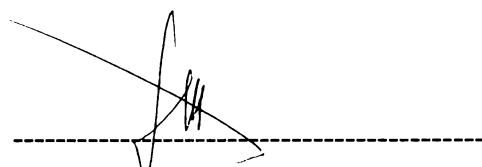
PÁGINA DE APROBACIÓN

Presidente de mesa



Dr. Rubén Acosta

Segundo integrante (tutor)



Dr. Jorge Carluccio

Tercer integrante

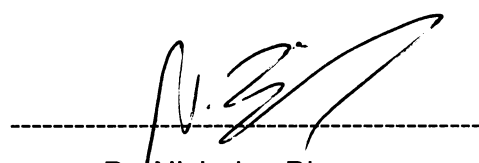


Dra. Adriana Medero

Fecha:

23 de abril del 2010

Autor



Br. Nicholas Bimson

2865¹1

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar me gustaría agradecer a mi tutor Jorge Carluccio y co-tutor Uruguaisito Benavidez quienes me acompañaron en este proceso, atendiendo mis inquietudes e interrogantes.

A todos los integrantes de la cátedra de Equinos por su constante colaboración.

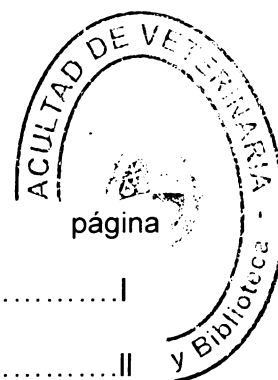
A mi familia, por su estímulo, apoyo, guía y acompañamiento en todo momento.

A Catalina

A mis amigos y amigas, con los que siempre pude contar y con los que ha sido más divertido y disfrutable este camino.

A todos aquellos que de una manera u otra estuvieron cerca apoyándonos en este proceso...

TABLA DE CONTENIDO



Página de aprobación	I
Agradecimientos	II
Lista de cuadros y figuras	V
1. Summary	1
2. Resumen	1
3. Introducción y antecedentes	2
4. Reseña histórica de endotoxinas y endotoxemia	4
5. Concepto de endotoxinas. Definición, fuente y estructura	7
5.1. Endotoxina.....	7
5.2. Detección de endotoxinas.....	8
6. Función de la mucosa como barrera y clearance hepático	9
6.1. Interacción entre LPS-células epiteliales.....	10
6.2. Movimiento transepitelial de LPS.....	10
7. Mecanismos de activación celular por LPS	11
7.1. Interacción con proteínas plasmáticas y células inflamatorias.....	11
7.2. Mediadores pro-inflamatorios en la endotoxemia.....	14
7.3. Mediadores anti-inflamatorios en la endotoxemia.....	17
8. Manifestaciones clínicas	18
8.1. Los signos clínicos.....	18
8.2. Hallazgos hematológicos y perfil bioquímico.....	21
8.3. Diagnostico.....	22
9. Tratamiento del equino con endotoxemia	22
9.1. Fluidoterapia.....	22
9.2. Prevención del pasaje de endotoxinas a la circulación.....	23

9.3	Neutralización de las endotoxinas.....	24
9.3.1	Inmunoterapia.....	24
9.3.2	Polimixina B.....	25
9.3.3	Sustancias naturales.....	26
9.4	Prevenir o reducir la síntesis, liberación, o los efectos de los mediadores de la inflamación.....	26
9.4.1	Anti-inflamatorios no esteroideos.....	26
9.4.2	Corticoides.....	27
9.4.3	Anticuerpos monoclonales.....	28
9.4.4	Receptores antagonistas del factor de activación plaquetaria.....	28
9.4.5	Pentoxifilina	28
9.4.6	Antioxidantes.....	29
9.5	Otros tratamientos.....	30
9.5.1	Lidocaína.....	30
9.5.2	Ketamina.....	31
9.6	Lo último en tratamientos.....	31
9.6.1	Detergentes (Tyloxapol).....	31
9.6.2	Emulsiones fosfolipídicas.....	32
9.6.3	Hemofiltración.....	32
10.	Bibliografía.....	33

LISTA DE CUADROS Y FIGURAS



Figura 1. Molécula de LPS.....	7
Figura 2. Vía de señalización.....	15

1. Summary:

Endotoxins normally reside in the lumen of the horse's gastrointestinal tract and are restricted to that site by the intestinal mucosal barrier. Under circumstances in which this barrier function is lost due to low blood flow, ischemia or inflammation, endotoxins may enter the general circulation. Endotoxins interact with a specific plasma protein called LPS binding protein that delivers the endotoxin molecules to cells in the horse's inflammatory and immune system. Via specific cell surface receptors that recognize endotoxin as a component of a pathogen, these cells respond vigorously to the presence of endotoxin by synthesizing and releasing a variety of pro- and anti-inflammatory mediators. The clinical signs we recognize as 'endotoxemia' are caused by these mediators. Treatment of endotoxemia is aimed at reducing the movement of endotoxins into the circulation, interfering with the interactions among the endotoxins, plasma proteins and inflammatory cells, and preventing the synthesis of the inflammatory mediators.

2. Resumen:

Normalmente las endotoxinas residen en la luz del tracto gastrointestinal de los equinos, estando estas restringidas por la barrera mucosa. En circunstancias en las que la mucosa pierde la función de barrera, las endotoxinas entran en la circulación sistémica, estos casos son dados por una disminución del flujo sanguíneo, isquemia o inflamación. Las endotoxinas interactúan con una proteína llamada proteína de unión a lipopolisacaridos (PUL), estas proteínas llevan a las moléculas de endotoxinas a interactuar con las células inflamatorias del caballo. Por medio de receptores de superficie las endotoxinas son reconocidas como un componente de un agente patógeno, estas células entonces responden poderosamente en presencia de endotoxinas sintetizando y liberando mediadores pro y anti-inflamatorios. Los signos clínicos que caracterizan una "endotoxemia" son causados por estos mediadores. Por lo tanto el objetivo del tratamiento de la endotoxemia apunta a reducir el movimiento de endotoxinas en la circulación, interfiriendo con la interacción de las endotoxinas con proteínas plasmáticas y células inflamatorias y previniendo la síntesis de los mediadores inflamatorios.

3. Introducción y antecedentes:

La endotoxemia se define como la presencia de endotoxinas en el torrente sanguíneo. Sin embargo, con mayor frecuencia el término se utiliza para referirse a las manifestaciones clínicas asociadas por una exagerada reacción inflamatoria (Lohmann KL., Barton MH., 2005).

La palabra endotoxemia viene del griego, endon por dentro, toxicon por veneno y aimia por sangre, en su combinación significa veneno en la sangre (Free Dictionary Web Site).

El síndrome clínico conocido como endotoxemia es común en caballos referidos a emergencias de cirugía abdominal (Moore JN, Mooris DD., 1992)

La endotoxemia es el resultado de una serie de eventos complejos caracterizados por una síntesis de una multitud de mediadores endógenos de la inflamación provocados por los fagocitos del hospedero. Los efectos perjudiciales de la endotoxemia, son en parte por la respuesta del organismo a estos mediadores (Moore JN., Mooris DD., 1992).

La endotoxemia ha sido recientemente incluida en el concepto del síndrome respuesta inflamatoria sistémica (SIRS) (Oikawa M., Yamaoka S., 2003).

En los caballos con enfermedades gastrointestinales la complicación mas frecuente encontrada es la endotoxemia. Estudios recientes realizados a nivel mundial a equinos con dolor abdominal (cólico), han detectado en gran proporción (25%-35%) endotoxinas de bacterias gramnegativas en la circulación (Fessel JF., Bottoms GD., Coppoc GL., 1987 & Steverink PJGM., Sturk A., Rutten VPMG., y col., 1995).

Esto esta dado por el aumento de permeabilidad de la mucosa intestinal (Morris DD., 1988), permitiendo la entrada de endotoxinas a la cavidad peritoneal o a la circulación portal, en consecuencia a la falta de perfusión de las células de la mucosa entérica desprendiéndose de la lámina propia o a causa de una inflamación a nivel de la pared intestinal (Moore JN., 2001).

La septicemia es inusual en caballos adultos, ya que una infección intensa de bacterias gramnegativas, como ocurre en una pleuroneumonía, peritonitis, salmonella colitis o metritis esta frecuentemente acompañada de una endotoxemia (Moore JN., 2001).

La sepsis evoluciona cuando no hay una buena respuesta inmune a la invasión de acuerdo a la patogenicidad del agente infeccioso (Morris DD., 1992).

Pequeñas cantidades de endotoxinas que escapan al intersticio, linfa o eventualmente de la circulación venosa son satisfactoriamente fagocitadas por las células Kupffer en el hígado o son neutralizadas por proteínas de unión a los lipopolisacaridos en la sangre, como también anticuerpo anti-lipopolisacaridos y proteínas de alta densidad (Moore JN., 2001).

Las manifestaciones clínicas de una endotoxemia son ocasionadas solo cuando una cantidad excesiva de endotoxinas pasan hacia la circulación sanguínea (Barton MH; 2003)

Muchas condiciones clínicas son encontradas frecuentemente en la práctica de la medicina equina que pueden ser asociadas con una septicemia y con posibilidad de progresar a formas más severas, como un shock séptico. (Roy MF., 1998)

La endotoxemia es la causa más común de riesgo en los equinos con enfermedades gastrointestinales. El resultado de estudios de animales con dolor abdominal (cólico) en varias partes del mundo encontró que es común detectar endotoxinas de bacterias gram negativas en la circulación (Steverink, P.J, 1994; King, G.N y Gering, E.L. 1988).

La fuente de endotoxinas pueden ser sin embargo endógena (filtrados desde el tracto gastrointestinal), como en enfermedades agudas gastrointestinales, íleo post-quirúrgico o exógenos (ambientales) como en la septicemia neonatal, colitis, peritonitis, pleuroneumonía, metritis y obstrucción recurrente de las vías aéreas (Werners AH, et al. 2005).

Aunque muchos de los estudios relativos a endotoxemias en los equinos están dirigidos a enfermedades intestinales obstructivas estrangulantes, éstas no son las únicas condiciones que caracterizan a la endotoxemia. Se han encontrado también colitis, pleuroneumonía, retención de placenta y peritonitis (Morris,D.D. 1991).

La situación es igualmente seria en neonatos que presentan infección bacteriana. Aproximadamente el 50% de los potrillos con signos clínicos de septicemia, tienen endotoxinas en la circulación sanguínea (Barton,MH; Morris,DD y Norton, N, 1998).

La septicemia es la principal causa de muerte en potrillos de menos de una semana de vida, principalmente debido a que su sistema inmune no posee la habilidad de prevenir la diseminación bacteriana(Moore JN., 2001).

Los microorganismos responsables de la endotoxemia, y septicemia son *Escherichia Coli*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Actinobacillus* y *Pseudomonas*. (Pradis,M; 1997).

Consecutivamente la endotoxemia está asociada a la muerte en equinos de todas las edades (Moore JN., 2001).

Enfermedades que dañan la barrera mucosa intestinal permiten la entrada de endotoxinas a la cavidad peritoneal y/o a la circulación portal (MacKey R 1992 & Moore JN 1981). Esto puede ocurrir si hay isquemia y/o inflamación de la mucosa que causa el desprendimiento de la misma y/o de las células epiteliales haciéndose permeables al LPS. Como resultado, la condición clínica mas comúnmente asociados con evidencia clínica de endotoxemia son aquellas que involucran severas enfermedades gastrointestinales como desplazamientos con obstrucción del suministro sanguíneo, y/o inflamaciones severas. (Steverink PJ y col; 1994; King J, Gering E,1988; Morris DD, 1991; Moore JN, Morris DD,1992; Meyers K y col, 1982; Henry M, Moore JN,1991)

Las condiciones clínicas comúnmente asociadas con la presencia de endotoxinas en la circulación incluyen obstrucción por estrangulación intestinal, colitis, enteritis

proximal, sobre carga de carbohidratos e ileo intestinal causado por disonías (Barton MH., 2005).

Donovan (2007) detectó una leve endotoxemia transitoria en caballos ejercitados hasta la fatiga. Esto indica que ejercicios de corta duración y extenuantes inducen una endotoxemia y una respuesta pro-inflamatoria en el caballo que persiste por lo menos 2 horas. Esta endotoxemia transitoria es causada por una isquemia intestinal, desarrollada por la hemodinámia selectiva en el ejercicio intenso.

Cuando hay evidencia que la mucosa de un intestino esta dañado por una isquemia intestinal o por hipovolemia en algún lado del tracto gastrointestinal, se pueden evidenciar signos clínicos de endotoxemia por varios días luego de que la porción intestinal alterada haya sido removida. Movimientos trasmurales de endotoxinas por intestinos inflamados pueden persistir durante días en caballos con enteritis o colitis (Moore JN., 2001).

En un estudio experimental se realizaron obstrucciones por estrangulación del intestino delgado de ponies anestesiados. Por medio del ensayo de lisado de amebocito del *limulus* se demostró la presencia de endotoxinas en la circulación sistémica 60 y 120 minutos luego de la restauración del flujo sanguíneo mesentérico; las muestras se tomaron de la yugular. Se observo la degeneración de la mucosa con perdida de células epiteliales de las vellosidades, coincidiendo con endotoxemia. La isquemia y la alteración de la barrera mucosa fueron consistentes (Moore JN, White NA, Berg JM, Trim CM, Garner HE; 1981).

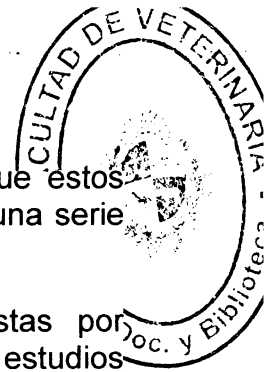
Rooney, Bryans y Doll (1963) describieron una condición fatal conocida como 'colitis X' y sugirieron que endotoxinas de bacterias gramnegativas podían estar involucradas en la patogénesis.

Fluido del ciego de dos caballos adultos fue sometido al ensayo de lisado de amebocito del *limulus* para detectar presencia de endotoxinas, esto se realizo antes y después de de una sobrecarga de carbohidratos del tracto gastrointestinal. Hubo un aumento de la concentración de endotoxinas en el fluido cecal a las 3, 6 y 12 horas comparadas con el valor basal. Concomitante los valores de ácido láctico y el pH aumentaron y decrecieron respectivamente, los dos caballos presentaron signos clínicos de laminitis (Moore JN., Berg JM., Garner HE., Sprouse RF., 1979).

4. Reseña histórica de endotoxinas y endotoxemia:

Un siglo atrás en Alemania, Richard Pfiffer, estudiante del laboratorio del Prof. Robert Koch, observó que el microorganismo del *vibrio-cholera* liberaba dos diferentes tipos de toxinas: una exotoxina termolábil mientras el organismo se encontraba viable; y otra más potente (termoestable) que se evidenciaba luego de la muerte del vibrio. Esto lo llevó a concluir que las toxinas termoestables se mantenían secuestradas mientras el organismo estaba vivo a las que llamó endotoxinas.

Otros estudios europeos en los que se realizó estudios similares con bacilos gramnegativos encontraron pirotoxinas, nombre que recibieron por su habilidad de



inducir una respuesta febril (Certani, E. 1894). También fue reportado que estos extractos de bacterias se caracterizaban por cambios en la circulación de una serie blanca y una leucocitosis (Buchner, H.1890).

Se reportó que las endotoxinas son estructuras complejas, compuestas por polisacáridos, fosfolípidos y proteínas (Boivin, A.1933). Consecutivamente estudios indicaron que esta endotoxina se constituía por fosfolipopolisacáridos, por lo que el término se puede intercambiar a lipopolisacáridos, fosfolipopolisacáridos, endotoxinas de fosfolipopolisacáridos y endotoxinas (Boivin, A.1933).

Tras la Segunda Guerra Mundial, donde la septicemia fue devastadora; se invirtieron numerosos esfuerzos en materia de investigación, desde la década del 50 y comienzos de los 60, para entender el mecanismo responsable de los efectos inducidos por el shock a causa de las infecciones bacterianas. Rápidamente se dedujo que la administración intravenosa de endotoxinas causó una abrupta reducción de la presión arterial y gasto cardíaco. Estos efectos fueron causados por una disminución del retorno venoso al corazón. (Lillehei R.1957; Fine J. 1998)

Los primeros investigadores también reportaron que una compensadora liberación de sustancias como catecolaminas causaban un aumento en la resistencia vascular y un cambio en la presión sanguínea. Sin embargo, si la dosis de endotoxina era incrementada suficientemente, la presión sanguínea se deterioraba por la reducción del gasto cardíaco y la resistencia vascular (Fine J. 1998). Esas respuestas a las endotoxinas resultaban en una hipoperfusión de órganos vitales y la eventual muerte. Esfuerzos considerables se realizaron en forma de identificar las maneras de restaurar la presión sanguínea a valores normales. Como resultado del efecto en estudios experimentales una nueva norepinefrina sintética análoga llegó a ser ampliamente usada en hospitales para seres humanos a pesar de que el aumento de la presión sanguínea no significaba mejor nivel de sobrevivencia (Lillehei R, Longerbeam J, Bloch J, et al. 1965).

Una recopilación de material en el campo veterinario indica que en 1963 Rooney y colegas indicaron por primera vez el incremento de endotoxinas en un nuevo síndrome llamado "colitis X". El hecho de que las endotoxinas fuesen potencialmente involucradas en este síndrome estaban basados en la sintomatología clínica: diarrea irreversible, fiebre, deshidratación y cólico. Dos años más tarde, Carroll y colegas realizaron un estudio experimental administrando 0,025 mg/kg de endotoxinas intraperitoneal a caballos, y reportaron pronunciados signos clínicos: desarrollo de diarrea, hemoconcentración severa leucopenia y muerte. Otro importante descubrimiento en este primer estudio fue la susceptibilidad comparativa que existe entre distintas especies de animales a la misma fuente de endotoxinas. En contradicción los efectos dependen de la dosis usada en cada especie.

En la década siguiente se supo más de las respuestas del cuerpo hacia las endotoxinas, incluyendo las síntesis y liberación de histamina, bradiquinina, catecolaminas, varios factores de coagulación, un miocardio depresivo y el ácido araquidónico. (Hinshaw L., Emerson T., Lampreto P., et al, 1962; Burrows GE, 1981). Estos descubrimientos impulsaron a Lewis Thomas a escribir en 1974 su libro "*Life of a Cell: Notes of a Biology Watcher*" (Vida de una célula: apuntes de un observador biológico) donde él dice que: "Nuestro arsenal de lucha contra las bacterias es tan potente e involucra tantos mecanismos de defensa, que corremos más peligro de

ellos que de los invasores.... Las macromoléculas son leídas por nuestros tejidos como algo nefasto. Cuando detectamos lipopolisacáridos, somos capaces de activar todos nuestros mecanismos de defensas que tenemos a disposición.” (Traducido por Bimson N.)

A la vez, se llevaron a cabo varios estudios de administración de endotoxinas a distintas dosis y vías en caballos y ponies para identificar las respuestas a las mismas. Algunas de las publicaciones de la década de los 70 describen los efectos de la administración de endotoxinas en ponies anestesiados, enfocando nuevamente a los efectos cardiopulmonares (Beadle R, Huber T 1977; Burrow GE 1981). Los efectos más comunes incluyen hipotensión, disminución de la presión venosa central, leucopenia, hemoconcentración y alteraciones en las concentraciones sanguíneas de glucosa.

En esa misma década, estudios involucraron la administración aproximadamente de 150 – 200 µg de endotoxinas de *E.coli* por kilo de peso vivo, fue dado en forma de bolo, infusión rápida o lenta tanto a los ponies bajo anestesia o no (Burrows GE 1979 & 1981). Estos estudios documentaron la hipoxemia arterial, hipertensión pulmonar, aumento de la concentración de las proteínas plasmáticas y acidosis láctica. A fines de la década de 1970, una serie de estudios fueron realizados en ponies y caballos sin anestesiar que se le dio una administración en bolo de una dosis considerablemente menor (10 µg por kilo) (Moore JN, Garner HE, Shapland JE et al 1980 & 1981). Aunque la respuesta de los animales fue cuantitativamente menos pronunciado, los resultados fueron similares a aquellos estudios que se usaron 10 a 20 veces más endotoxinas. Por ejemplo, la falta de oxígeno arterial, la hipertensión pulmonar, taquicardia, taquipnea, leucopenia seguido por una leucocitosis y ácido láctico, todo lo cual fue consistentemente documentado. Mucho se aprendió de los estudios iniciales sobre las respuestas fisiológicas a un reto subletal de endotoxinas. En la otra mano las respuestas severas y abruptas de los signos clínicos no eran exactamente idénticos a los vistos comúnmente en la clínica. Estos hallazgos indicaron que los modelos experimentales necesitaban ser mejorados y que el mecanismo responsable de los efectos de la endotoxemia podrían ser identificados solamente realizando estudios con un control más estricto de las variables de los experimentos (Moore JN, 2001).

Durante estos últimos 20 años, se realizaron un gran número de estudios que tratan con varios aspectos de la endotoxemia en caballos, afirma el Dr. Moore (2001).

Como resultado de estos hallazgos en los estudios, existe ahora una apreciación más completa entre la asociación entre endotoxemia y enfermedades específicas del caballo. Es claro que las endotoxinas causan muchos de los efectos deletéreos en el paciente, esto lleva a los clínicos y a la comunidad científica a pensar diferentes estrategias a ser aplicadas en el tratamiento. Esto estaría indicando que el tratamiento a las enfermedades inflamatorias producidas por las endotoxinas es un tema no resuelto (Moore JN., 2001).

5. Concepto de endotoxina. Definición, fuente y estructura

5.1. *Endotoxina*

La endotoxina es un compuesto lipopolisacrido de la envoltura externa de las bacterias entéricas gran negativas (Raetz C., Whifield C., 2002).

Con 3 o 4 x 10 moléculas por célula, los lipopolisacridos conforman alrededor del 75% del estrato externo de la membrana celular externa y es una molécula funcional clave de la membrana externa bacteriana, que sirve como una barrera impermeable contra los agentes nocivos externos (Lohmann KL & Barton MH, 2005).

La molécula de lipopolisacrido (LPS) consta de cuatro dominios, los cuales son esenciales para la virulencia de las bacterias gran-negativas (Vaara M, 1999)

(ver figura 1.)

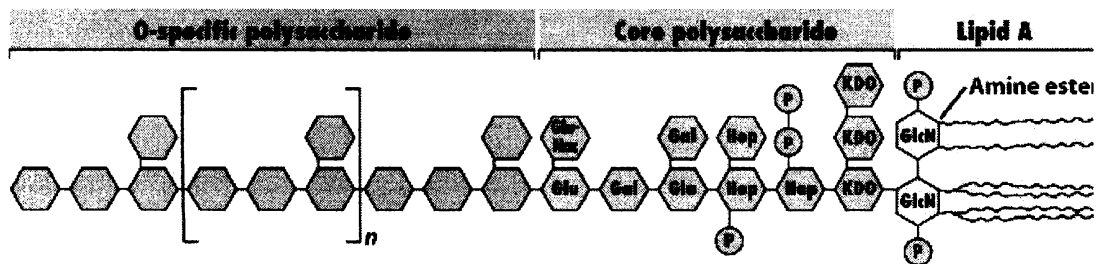


Figura 1. Molécula de lipopolisacrido (LPS).

Tres de estos dominios (corazón interno, corazón externo y cadena específica O) representan la parte polisacárida hidrofílica de la molécula, mientras que la parte de los lípidos A representa la zona lipídica hidrofóbica. Estando combinados, estos dominios confieren propiedades anfílicas de la molécula que conducen a la formación de agregados micelares en soluciones acuosas. (Lohmann KL & Barton MH, 2005).

Las cadenas O son características de cualquier tipo dado de lipopolisacridos y muestra una enorme variabilidad estructural entre los serotipos bacterianos (Rietschel ET., y col., 1996). Las cadenas O determinan parte de la inmunoespecificidad de la célula bacteriana (Jonsson PE., 1999) y, ante la interacción con el sistema inmune del huésped, sirven como antígenos para la producción de anticuerpos específicos de especie (Zahringer U. y col, 1994).

La parte de oligosacáridos en el corazón interno y externo se conserva más entre las diferentes cepas de bacterias Gram-negativas que la cadena O. (Rietschel ET y col, 1996). El corazón de todas las moléculas de lipopolisacridos contiene un azúcar poco frecuente, el KDO (ácido 3-desoxi-D-mano-oct-ulopiranosómico), el cual une la región del corazón a la molécula de lípido A. Es esencial la síntesis de un corazón mínimo para la supervivencia de la bacteria.

La parte del lípido A sirve para fijar la molécula de lipopolisacrido en la membrana externa de la bacteria y ha sido identificada como el principio tóxico de los lipopolisacridos (Galanos C y col, 1985).

Basados en numerosos estudios la mayoría de los efectos deletéreos de las endotoxinas han sido asociados con lípido-A (Moore JN, 2001).

Bajo circunstancias normales el tracto intestinal de los caballos contiene una gran cantidad de bacterias gramnegativas. Ya que las endotoxinas son liberadas de las bacterias cuando estas mueren o se multiplican rápidamente, el espacio intestinal contiene una gran cantidad de endotoxinas (Moore JN). Basado en un estimativo el ciego y el colon ventral de caballos sanos contienen más de dos gramos de endotoxinas (MacKay R 1992). Estas endotoxinas son restringidas a la luz intestinal por una eficiente barrera mucosa intestinal (Moore JN 1981), que está compuesta por células epiteliales de la mucosa, anticuerpos y enzimas secretadas por esas células, y bacterias residentes. Las endotoxinas que cruzan esta barrera están ligadas a proteínas específicas del plasma o neutralizadas por anticuerpos circulantes o eliminadas de la circulación por células Kupffer en el hígado (MacKey R 1992 & Moore JN 1981).

5.2. Detección de endotoxinas

Existen 2 métodos para detectar endotoxinas en fluidos o sustancias biológicas. El primero es el ensayo pirógeno en conejos, como lo dice el nombre el test consta en administrarle cualquier sustancia pirogénica a un conejo y se le monitorea la temperatura al animal.

El segundo método es el ensayo de lisado de amebocito del *limulus*. Hace más de 20 años se determinó que la célula multifuncional circulante (amebocito) del cangrejo herradura, *limulus polyhemus*, respondía a mínimas cantidades de endotoxinas (Levin J; Bang FB; 1968). Después se determinó que el lisado de estos amebocitos formaba un gel cuando eran expuestos a bacterias gramnegativas o endotoxinas purificadas. Luego se descubrió que el rango de esta reacción dependía de la concentración de endotoxinas.

El ensayo por lisado del amebocito *limulus* es una evaluación en la cascada de la coagulación hemolinfática sensible a la endotoxina correspondiente a *Limulus polyphemus* (Lohmann KL & Barton MH, 2005). Se piensa que esta reacción en el *limulus* es un mecanismo de defensa contra la infección por gramnegativos (Armstrong GP; 1991).

Recientemente el ensayo de lisado de amebocito del *limulus* se ha modificado aumentando su sensibilidad. Por medio de un espectrofotómetro cuantitativo se pueden detectar concentraciones de endotoxinas de hasta 0,05 ng/ml. (Moore JN, 1988)

Usando esta técnica se ha demostrado que el 35-45% de los caballos con enfermedades gastrointestinales presentan una endotoxemia. (Steverink PJ y col, 1994; Morris DD, 1991; Moore JN, Morris DD, 1992; Meyers K y col, 1982; Henry M, Moore JN, 1991)

De hecho una considerable controversia surgió cuando los investigadores obtenían hemocultivos negativos de muchos pacientes que tenían endotoxinas en sus muestras de sangre detectadas por la técnica de lisado de amebocito. A lo largo de



los años se vio que endotoxinas ricas en lipopolisacaridos eran capaces de atravesar la barrera mucosa intestinal y entrar a la circulación más rápido que las bacterias. Finalmente es de destacar que el ensayo de lisado de amebocito del *limulus* no es rutina en la mayoría de los laboratorios clínicos veterinarios. (Moore JN, 2001).

6. Función de la Mucosa como Barrera y Clearance Hepático

Existen 2 mecanismos que funcionan para defender los animales de la evolución de una endotoxemia. Primero, una eficiente barrera de células epiteliales de la mucosa que funcionan para limitar el movimiento transmural de bacterias y LPS. La eficacia de esta barrera depende de los factores intraluminales y extraluminales. Los principales factores responsables son el pH intraluminal y la circulación sanguínea intestinal, respectivamente.

Estudios (Moore JN, Garner HE, Berg JN; 1979) han demostrado una disminución considerable del pH y aumento en los valores de lactato en caballos alimentados predominantemente con concentrados. En un clásico estudio de infarto de colon en caballos, Nelson et al. (1998) reportó una disminución de la presión sanguínea arterial, y un descenso de leucocitos y plaquetas. En este estudio la aparición de bacterias entéricas en el líquido peritoneal fue fuertemente asociada a un aumento de la vaso actividad. Esta alteración se reflejó en la alteración de la barrera mucosa.

Recientemente un patrón de alteración de la mucosa fue encontrada durante la inducción experimental de isquemia en el intestino delgado de ponis (White NA, Moore JN, Trim CM; 1980). Estos patrones fueron similares a los encontrados en biopsias de intestino delgado, extraídos de cirugías en casos clínicos de cólico, siendo similar a los patrones de alteración de torsión fatal de colon mayor. Los estudios histopatológicos de la biopsia determinaron una pérdida de la mucosa y submucosa colónica. Estos acontecimientos sugieren que la barrera de la mucosa se vea alterada cuando existe isquemia en los caballos con cólico, permitiendo movimientos transmurales de endotoxinas intraluminales dentro de la cavidad peritoneal y la circulación sistémica.

La segunda línea de defensa contra endotoxinas, es el sistema reticuloendotelial del hígado llamadas células Kupffer. Jacob et al. (1977) determino que la función de estas células era remover las endotoxinas de la circulación portal y sistémica. (Moore JN, Garner HE, Shapland JE, Schaub RG; 1981).

Como las endotoxinas son un componente normal de la luz intestinal, existen una serie de procesos para prevenir o restringir el movimiento de endotoxinas al torrente sanguíneo. La mucosa cumple una compleja y altamente eficiente barrera. Esta barrera de células epiteliales cubre la lámina propia del intestino. Las fuertes uniones entre cada célula individualmente y cierta secreción celular (lizo enzimas, inmunoglobulinas) sirven para restringir el movimiento transmural de endotoxinas y bacterias. (Moore JN; 1988)

Aunque se piense que las células epiteliales del intestino logran una barrera para las LPS, recientemente Hessberg et al. (2005) determinaron que estas células interactúan especialmente con moléculas de LPS.

Las células del epitelio intestinal están normalmente expuestas a un alto número de bacterias intactas y altas concentraciones de productos de bacterias que forman una barrera para la absorción de las LPS y de la invasión de microorganismos del intestino (Moore JN; 1978).

Como resultado las células epiteliales deben reconocer y reaccionar contra bacterias patógenas pero no responder contra la flora normal del tracto gastrointestinal. Una inapropiada respuesta a la flora normal juega un rol en la evolución del desarrollo de enfermedades inflamatorias del tracto gastrointestinal (Tomlinson JE, Blikslager AT; 2004).

Las células epiteliales del intestino están regularmente expuestas a LPS, por lo tanto pequeñas cantidades de LPS pueden ser encontradas en la circulación portal y el hígado de individuos saludables. (Jacob AI y Col.; 1977)

La flora intestinal natural de los caballos consiste, principalmente, en bacterias anaerobias gramnegativas y, de esta manera, es normal que existan grandes cantidades de endotoxinas en la luz del tracto intestinal del caballo (Moore JN, Garner HE, Berg JN; 1979).

6.1. Interacción entre LPS-Células Epiteliales

Las células del intestino son la primera línea de la respuesta de la inmunidad innata para la invasión de microorganismos intestinales. (Moore JN, Garner HE, Berg JN; 1979).

Las células epiteliales del intestino secretan y responden a una gran gama de citoquinas, teniendo también *receptores similar-Toll* (TLR) (termino que se explicara mas adelante) que se ligan y reconocen los LPS a concentraciones menores a 1nM (Aderem A, y Col; 2000).

6.2. Movimientos Transepitelial de LPS

El término *translocación* describe la entrada de bacterias y productos bacterianos endógenos desde el tracto gastrointestinal hacia los tejidos y la circulación sistémica (Lohmann, K.L., Barton, M.H., 2004).

Existen desacuerdos sobre el mecanismo del pasaje de LPS a través del epitelio intestinal. En humanos se ha constatado el pasaje de bacterias a través de una barrera intestinal comprometida, resultando en una bacteriemia. Luego los LPS son liberados cuando las bacterias son fagocitadas por células del sistema inmune. (Matich GD, y Col; 1993). En contraste, en algunos casos nunca fue identificada una bacteriemia en caballos con isquemia intestinal, y solo LPS fueron aislados de la sangre.

Hay 2 posibles formas para que las moléculas de LPS sean absorbidas a través del epitelio intestinal hacia la circulación sistémica: a través de la membrana celular (ruta transcelular) o entre las uniones intercelulares (ruta paracelular). Las fuertes uniones actúan como pasajes entre el espacio intercelular y son reguladas por procesos activos por parte de las mismas células (Tomlinson JE, Blisklager AT; 2004).

La isquemia puede afectar el pasaje de LPS a través de la barrera transepitelial por las alteraciones de las uniones intercelulares, aunque el LPS puede atravesar el tejido isquémico por medio de las dos rutas, la transcelular y paracelular (Tomlinson JE, Blisklager AT; 2004).

7. Mecanismos de activación celular por LPS

7.1. Interacción con proteínas plasmáticas y células inflamatorias

Luego que las endotoxinas entran en la circulación sanguínea, pueden interactuar con proteínas circulantes y células sanguíneas o pueden ser removidos por macrófagos del hígado, bazo y pulmón (Morris DD., 1992).

El proceso iniciador de la fisiopatología de la endotoxemia es la activación de la respuesta celular a los lipopolisacáridos (LPS) por medio de endotoxina, dando lugar a las alteraciones de las funciones celulares y a un aumento de la expresión de los mediadores de la inflamación. Los macrófagos y las células endoteliales, son las primeras células inmunes en encontrar la toxina, responden ante pequeñas cantidades de LPS, lo que le permite eliminar bacterias gramnegativas y moléculas libres de LPS, activándose a la misma vez (Lohmann KL., Barton MH., 2005).

Por su región A de naturaleza hidrofóbica, las endotoxinas tienden a aglomerarse en el plasma (Moore., 2001).

Los aglomerados de LPS interactúan con lipoproteínas de alta densidad y unas proteínas plasmáticas únicas llamadas proteínas de unión a lipopolisacáridos (PUL), lo que provoca que se dispersen como monómeros (Wurfel MM., Wright SD., 1997; Wright SD., Ramos RA., Tobias PS., ycol. 1990).

La proteína de unión a LPS, es una proteína de fase aguda que circula por la corriente sanguínea y se sintetiza en el hígado. Su función es la de reconocer y formar un complejo de alta afinidad con el lípido A del LPS libre o al LPS unido a la membrana externa de la bacteria intacta (Palsson, Mcdermott, 2004).

La unión a lipoproteínas de alta densidad prolonga la vida media de las endotoxinas en sangre pero reduce su habilidad de interactuar con células proinflamatorias (Baumberger C., Ulevitch RJ., Dayer JM., 1991; Vosbeck K., Tobias P., Muller H., 1990).

Los PUL remueven individualmente las moléculas de endotoxinas de los aglomerados y facilita marcadamente la habilidad de interactuar con fagocitos

mononucleares del equino. El PUL es sintetizado por el hígado y existe en cantidades moderadas en el plasma (Tobias PS., Mathison J., Mintz D., 1992; Wright SD., 1997; Wright SD., Ramos RA., Tobias PS., 1990 ; Ulevitch RJ., Tobias PS., 1993).

Los receptores para LPS conocidos hasta la fecha son el antígeno de diferenciación agrupado 14 (CD14) (Wright SD y col; 1990) y el receptor 4 simil-toll (TLR4) (Chow JC y col; 1999).

Además de su papel como catalizador de la activación celular por parte de los LPS, la PUL tiene una actividad de opsonización (Wright SD., Tobias PS., Ulevitch RJ., Tobias PS.; 1989) y participa en la fagocitosis de LPS por parte de los macrófagos y los neutrófilos (Schiff DE., y col.; 1997; Grunwald U.; 1996).

Las PUL incrementan la sensibilidad del huésped a la endotoxina, logra este efecto transfiriendo monómeros de endotoxinas a un receptor de superficie que se encuentra en los fagocitos mononucleares llamado CD14 (Wright SD., Ramos RA., Tobias PS., 1990; Ulevitch RJ., Tobias PS., 1993; Marchant A., Duchow J., Deville JP., 1992 ; Tapping RI., Tobias PS., 1996).

El CD14 es una proteína que en su forma unida a la membrana (CD14m) está insertada en la membrana celular por medio del anclaje glucosil-fos-fatidil-inositol (Haziot A., Chen S., Ferrero E., y col., 1988).

La interacción entre endotoxinas, PUL y CD14 aumenta la sensibilidad de las células a las endotoxinas dando como resultado una síntesis de mediadores proinflamatorios. Estudios en vitro demostraron que este efecto tardío de las endotoxinas puede ser prevenido por medio de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el CD14 o por remoción enzimática del CD14 de la superficie de la célula (Blondin C., Le Dur A., Cholley B., y col, 1997).

El CD14 se expresa principalmente sobre los monocitos y los macrófagos tisulares y en menor medida sobre los neutrofilos (Stelter F; 2000). Existen dos isoformas de CD14: CD14m unido a la membrana (Haziot A; 1988) y CD14s en forma soluble o libre. El primero se encuentra como una proteína de membrana anclada a fosfatidilinositol, y el segundo como fragmento proteolítico soluble (Diurieux JJ., y col, 1994).

Además de estos efectos pro inflamatorios, las altas concentraciones de CD14s pueden secuestrar y neutralizar LPS (Jack AR., 2000).

La cantidad de CD14s aumenta durante la inflamación, convirtiéndose en un marcador útil durante la inflamación aguda y crónica (Stelter F., 2000).

Las endotoxinas y las PUL pueden interactuar con una forma soluble de CD14 que fueron liberadas de la superficie de los fagocitos mononucleares. Por medio de esta interacción el complejo endotoxina-CD14 soluble interactúa con células sin CD14 en su superficie, como por ejemplo células endoteliales, donde se inician efectos inflamatorios (Tapping RI., Tobias PS., 1996; Blondin C., Le Dur A., Cholley B., y col., 1997; Gebhard F., Rosch M., Helm M., y col. 1997).

Hasta el año 2001 no se había logrado determinar el mecanismo de las PUL ni del CD14 en el equino ya que las proteínas purificadas de equinos y anticuerpos que reaccionan contra estas proteínas no existían. En esta década pasada se empezó a clonar y a expresar CD14 equino recombinante y se está en el proceso de clonar el gen del PUL. Teniendo estas herramientas se conocerá la importancia de estas proteínas en la respuesta de las células equinas a las endotoxinas y su importancia en los casos clínicos de cólico equino (Moore JN; 2001).

Aunque el CD14 juega un papel muy importante en la respuesta celular hacia las endotoxinas, este receptor carece de la habilidad de transmitir la señal de la endotoxina al interior de la célula (Moore JN., 2001 Lohmann KL., Barton MH.; 2005).

El CD14 es un receptor de superficie celular que está en el exterior de la célula adherida por medio de un anclaje de carbohidratos; no incluye porciones que atraviesen la membrana por lo tanto es incapaz de iniciar la liberación de mensajeros secundarios de la inflamación o caminos de transducción que llevan a síntesis de mediadores proinflamatorios (Moore JN., 2001; Morris DD., Moore JN., 1992; Lohmann KL., Barton MH., 2005).

A fines del siglo XX investigadores trabajando con *Drosophila melanogaster* (Garfias, 2005) identificaron una familia de receptores que fueron denominados receptores Toll con una gran similitud a los receptores de interleuquina (IL-1). El receptor Toll presenta componentes intracelulares y transmembrana que les permiten a éstos transmitir las señales al interior de las células. (Ulevitch RJ., 1995; Wright SD., 1999).

Unos años más tarde científicos en otros laboratorios descubrieron una familia análoga de receptores en células de mamífero, que lo llamaron receptores simil-Toll (TLR) (Zhang G., Ghosh S., 2001 & Hoshino y col., 1999).

La unión perdida entre el CD 14 y el ambiente citosólico es un receptor simil-Toll en asociación con la molécula denominada MD-2 (Shimazu R., y col. 1999).

Los receptores tipo Toll son glicoproteínas de transmembrana de tipo I pertenecientes a la superfamilia de receptores que incluye el receptor de la IL-1, IL-1R (Akira, 2004).

En estos receptores se pueden distinguir tres dominios: un dominio extracelular con repeticiones ricas en leucina, uno transmembrana, y una cola citoplasmática denominada TIR. La última presenta una alta homología de secuencia con la región citoplasmática de IL-1R.

Los TLRs son componentes vitales del sistema inmune para detectar patógenos peligrosos y para iniciar respuestas inflamatorias e inmunes contra los patógenos.

Interesantemente el CD14 no es selectivo únicamente de las endotoxinas porque también reconoce y se liga a componentes celulares pertenecientes a bacterias grampositivas, como peptidoglicanos (Moore JN., 2001).

Se han identificado varios receptores simil-Toll en las especies mamíferas, pero los TLR4 parecen ser el subtipo más importante en la activación de células (macrófagos, endoteliales entre otras) por la unión extracelular de LPS y en el desarrollo de enfermedades inflamatorias asociadas. (Chow JC., y col. 1999).

7.2. Mediadores pro-inflamatorias en la endotoxemia

Basándose en los resultados de estudios de monocitos y macrófagos en una variedad de especies, incluyendo los equinos; la interacción de la endotoxina a los receptores celulares (CD14 y TLR4) resulta en una transmisión de señales de las endotoxinas al interior de las células, lo cual produce la fosforilación de promotores génicos que se dividen, reducen su tamaño y se translocan (entran) al núcleo. Estos promotores a nivel del genoma inducen la expresión de genes de moléculas pro-inflamatorias, que producidas en exceso se transforman en potencialmente mortales (Moore JN., 2001; Lohmann KL., Barton MH., 2005).

Las vías de señalización se caracterizan por una fosforilación secuencial, con lo cual se produce la activación de actividades enzimáticas. Uno de ellos es la activación de los factores de transcripción; por ejemplo, las proteínas que se unen al ADN y favorecen la transcripción genética (Lohmann KL., Barton MH., 2005).

Entre las vías mejor caracterizadas en el señalamiento celular inducido por endotoxinas, están las vías de la proteína cinasa activada por mitógenos y la activación del factor de transcripción del factor nuclear kB (NFkB) (Downey JS., Han J., 1998; Medzhitov R., y col., 1998; Lohmann KL., Barton MH., 2005).

Estas respuestas son elucidadas por medio de moléculas adaptadoras intracelulares, la más conocida es el factor 88 de diferenciación mielóide (MyD88) y el TRIF (Akida, Takeda, 2004; Hargraves, Medzhitov, 2005; O'Neil, 2006; Pandey, Agrawal, 2006).

La importancia de MyD88 y TRIF está basada en que cada uno lleva a un desencadenamiento distinto de mediadores inmunitarios que determinan el fenotipo de la célula que primariamente van a ser responsables de la evolución de la inmunidad adaptativa (Amati y col., 2006; Dabbagh y Lewis, 2003; Parker, y col., 2007; Pasare, Medzhitov, 2004). La LPS se une a los receptores TLR4 sobre las células del sistema inmune y otras células no inmunes, provocando la activación de dos vías de señalización: una dependiente de MyD88 (Yamamoto, y cols., 2002; Ogawa y cols., 2002; Ruckdeschel y cols., 2002) y otra independiente de MyD88 (Yamamoto y cols., 2004). Ambas vías contribuyen al desarrollo de la endotoxemia y a las consecuencias fatales del síndrome de shock endotóxico.

La activación de la vía MyD88 dependiente lleva a la translocación al núcleo del promotor NFkB temprano el cual induce la expresión de una serie de potentes mediadores pro-inflamatorios, TNF- α , IL1 β , IL-6 e IL-12, IFN- γ , la quimioquina MCP-1, así como también la síntesis de moléculas de adhesión (ICAM-1 y VCAM-1) iNOS, COX-1, COX-2) y otros mediadores inflamatorios (Janicke y cols., 2003; Liao y cols., 2004; Uematsu y cols., 2002; Ryan y cols., 2004). (ver **figura 2**).

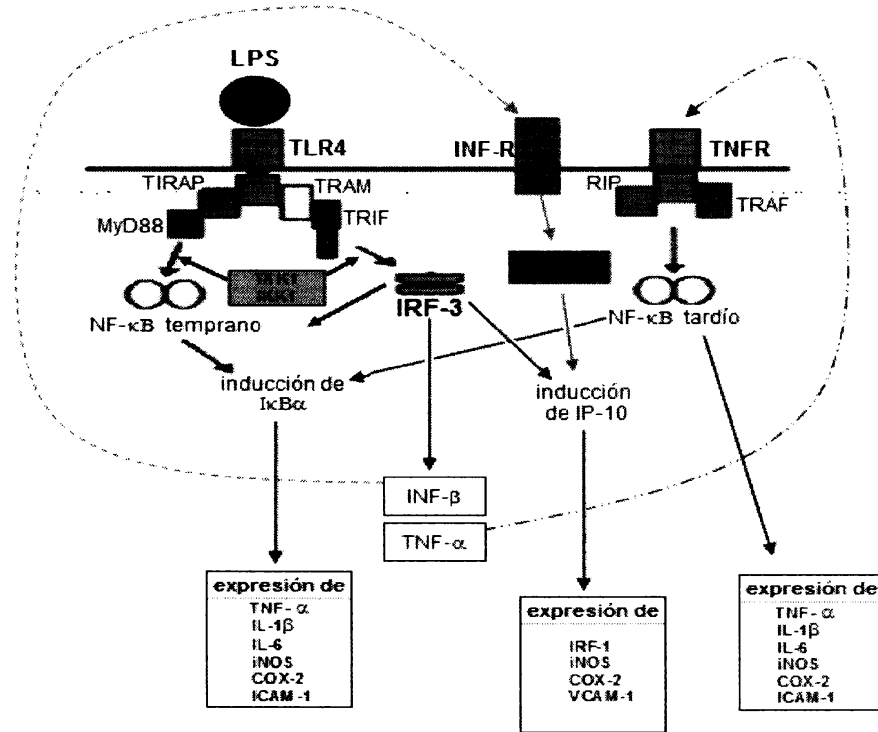


Figura 2. Vías de señalización a través de TLR4 inducida por el LPS que conducen a la producción de mediadores inflamatorios y productos que contribuyen con la exacerbación de la respuesta inflamatoria. TNFR (Receptor de TNF- α), INF-R (Receptor de INF- β). Figura adaptada y modificada por Benavides et. Al. 2006, tomada de Covert et al., 2005

La activación de la vía MyD88 independiente lleva a la translocación al núcleo del promotor IRF-3 (interferon response element-3) y éste promotor induce la producción de Interferones de tipo I como el Interferon α y β (IFN- α y IFN- β), IRF-1, iNOS, COX-2, VCAM-1 además una segunda activación tardía del NF- κ B, con la secreción de todos los mediadores arriba mencionados para la vía MyD88 dependiente. (Janicke y cols., 2003; Liao y cols., 2004; Uematsu y cols., 2002; Ryan y cols., 2004). (ver **figura 2**).

En modelos de roedores a los cuales se les dio una dosis mortal de LPS se demostró que la vía MyD88 independiente es más importante en la falla cardíaca e inducción del shock endotóxico que la vía MyD88 dependiente relacionada con la activación de promotor NF- κ B. (Karaghiosoff y cols., 2003). Esta última vía de activación del TLR-4 es la que bloquea la mayoría de las drogas anti-shock usadas en medicina veterinaria.

Reafirmando la relevancia de la vía MyD88 independiente en el shock endotóxico, ensayos de microarray mostraron sin lugar a dudas que el 74% de los genes de moléculas inflamatorias sobre-expresados en macrófagos estimulados con LPS, son pertenecientes a ésta vía MyD88 independiente. (Björkbacka y col., 2004).

Muchos de los efectos deletéreos de las endotoxinas son mediados por citoquinas y sustancias proinflamatorias sintetizadas y liberadas por fagocitos mononucleares. Estas células generan muchos de los mediadores de la inflamación que han sido detectadas en la circulación de equinos que se le han administrado endotoxinas bajo

estudios experimentales en equinos con afecciones gastrointestinales (Clark ES., Moore JN., 1989; Mackay RJ., y col. 1991; Henry MM., Morre JN., 1991; Morris DD., Moore JN., 1992; Morris DD.; Crowe N., Moore JN., 1992; Robinson JA., y col. 1993; Allen GK., y col.1993).

Las citoquinas son los principales mediadores de los efectos de los LPS; las citoquinas son moléculas glicoproteicas que regulan la respuesta inflamatoria e inmune, actuando como un sistema de señales entre células, mediante las cuales las células se comunican. (Tizard IR.; 1996).

La mayoría de los estudios incluyen como mediadores al factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), IL1- β , factores quimiotácticos (quimiocinas), los factores de crecimiento y eicosanoides (metabolitos del ácido araquidónico) (Moore JN., 2001; Lohmann KL., Barton MH., 2005).

El TNF- α es la citoquina más próxima liberada en respuesta a los LPS. Los estudios corroboran esto al mostrar que la administración de TNF- α recombinante mimetiza los efectos de los LPS (Beutler B., Cerami A., 1986) y que los anticuerpos dirigidos contra el TNF- α protegen de los efectos letales de las endotoxinas (Beutler B., Milsark IV., Cerami A., 1985).

El aumento de la actividad plasmática del TNF- α , se asocia con aumento de la mortalidad de los caballos con enfermedad gastrointestinal aguda y en los neonatos sépticos (Barton MH., Collatos C., 1999).

Los siguientes acontecimientos son el resultado de la síntesis de citoquinas dada por la inducción de endotoxinas:

- TNF- α y IL-1 estimulan la activación de células endoteliales y neutrofilos e inducen la expresión de moléculas de adhesión y el reclutamiento de células inflamatorias en los tejidos. (Eades SC., Moore RM., 2006; Le J., Vilcek J., 1987).
- TNF- α provoca una variación de cambios en las células del endotelio. En la presencia de TNF- α las células endoteliales expresan actividad procoagulante (Lohmann KL., Barton MH., 2005 Barton MH., Collatos C., Moore JN., 1996). Estas respuestas favorecen a la hemostasia y potencian las coagulopatías presentes en el SIRS (Síndrome de Respuesta Inflamatoria Sistémica). Las coagulopatías pueden llevar a microtrombos resultando en alteraciones en la perfusión tisular (Eades SC., Moore RM., 2006).
- La activación de las células endoteliales llevan a la producción de óxido nítrico y eicosanoides, alterando la presión sanguínea, perfusión tisular y el retorno de sangre venosa para el gasto cardíaco (Eades SC., Moore RM., 2006).
- TNF- α estimula el efecto de los macrófagos, monocitos y células endoteliales para sintetizar citoquinas para perpetuar el ciclo de la respuesta inflamatoria (Eades SC., Moore RM., 2006).
- TNF- α , IL-1, y IL-6 estimulan la síntesis de la prostaglandina E₂ en el hipotálamo, dando como resultado el aumento de la temperatura corporal

terminando en fiebre. Aumenta la concentración de corticoides en la circulación.

- IL-1, y IL-6 inducen la síntesis de las proteínas de la fase aguda, estas proteínas incluyen fibrinógeno, globulinas α y globulinas β .

En adición a las citoquinas, otros mediadores de la inflamación son liberados por la acción de las endotoxinas incluyendo los metabolitos del ácido araquidónico; factor activador de plaquetas, radicales libres, óxido nítrico, histamina y componentes del complemento. (Eades SC., Moore RM., 2006). Estos metabolitos del ácido araquidónico están presentes en cada paso de la inflamación. Estos pasos involucran los siguientes metabolitos y procesos:

- Tromboxano A₂ es un potente agregador de plaquetas y vasoconstrictor (Moore JN., Morris DD., 1994).
- Aumenta la síntesis de prostaglandina en el hipotálamo elevando la temperatura corporal (Collins T., 1998).
- Leucotrieno B₄ (LTB₄) es un potente quimiotáctico y activador de neutrófilos; causa un aumento en la agregación y adhesión, genera radicales libres y libera enzimas lisosomales (Eades SC., Moore RM., 2006).
- Además los leucotrienos causan intensa vasoconstricción, broncoespasmos y aumenta la permeabilidad vascular (Eades SC., Moore RM., 2006).

El PAF es un derivado de los mediadores fosfolipídicos, sintetizado en las plaquetas, basófilos, neutrófilos, monocitos, macrófagos y células endoteliales (Carrick JB., Moore JN., Morris DD., 1993).

- A bajas concentraciones el PAF causa vasodilatación y aumenta la permeabilidad vascular.
- En altas concentraciones el PAF causa vasoconstricción, broncoconstricción, agregación plaquetaria y activación de leucocitos (Carrick JB., Moore JN., Morris DD., 1993).

7.3. Mediadores anti-inflamatorios en la endotoxemia:

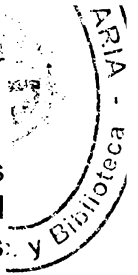
Aunque los estudios sobre endotoxemia se hallan concentrado en los efectos específicos de los mediadores pro-inflamatorios, hay evidencia creciente que la endotoxemia también causa la síntesis y liberación de mediadores anti-inflamatorios (Moore JN., 2001).

El más estudiado de estos mediadores es la IL-10, que es sintetizado por monocitos, macrófagos y linfocitos (Fiorentino DF., Zlotnik A., Viera P., y col., 1991).

El efecto anti-inflamatorio primario de la IL10 es la inactivación de los fagocitos mononucleares y la inhibición de la síntesis de las citoquinas pro-inflamatorias (Fiorentino DF., Zlotnik A., Viera P., y col., 1991).

Las citoquinas inducen la síntesis de glucocorticoides endógenos, que pueden inhibir futura síntesis de citoquinas (Mackay RJ., 1999).

La adenosina es un nucleótido endógeno que regula varios procesos fisiológicos activando receptores de subtipos de adenosina. Un estudio ha comprobado que el receptor agonista adenosine A₂ inhibe la producción de TNF- α por los monocitos, y inducida por los LPS. (Wan-Chun Sun; Moore JN., Hurley DJ., y col.; 2008)



8. Manifestaciones clínicas:

La Endotoxemia es una complicación frecuente en muchas enfermedades que afectan al equino.

En el caso de colitis y enteritis proximal, se pueden detectar signos de endotoxemia antes del desarrollo del cólico, diarrea o reflujo gástrico. Esto nos indica con mayor especificidad la naturaleza de la enfermedad primaria. Las enfermedades tales como peritonitis o pleuritis, sin embargo, pueden manifestar signos clínicos inespecíficos que incluyen fiebre, anorexia y depresión. Los hallazgos tales como neutropenia (que nos induce a sospechar una endotoxemia) deberían urgir al veterinario a indagar en el origen de un proceso séptico (Lohmann KL & Barton MH, 2005).

8.1. Los signos clínicos:

Los experimentos in vivo en los equinos muestran con claridad los signos clínicos asociados con enfermedades gastrointestinales agudas y sepsis. Tales son atribuibles a la actividad de los LPS y citocinas como el FNT- α . Ante la administración de una dosis subletal de LPS, la respuesta clínica puede dividirse en: un estado hiperdinámico inicial y una fase hipodinámica o de shock final.

Los signos clínicos presentes durante la primera fase (los cuales comienzan a los 15 a 45 minutos pos administración de los LPS) incluyen anorexia, bostezos, sudoración, depresión, manifestación de dolor abdominal, fasciculaciones musculares y decúbito. La frecuencias respiratoria y cardíaca se ven aumentadas, los borborismos disminuyen, llegando a desarrollar íleo (Lohmann KL & Barton MH, 2005). La hiperemia de las membranas mucosas y un acelerado tiempo de llenado capilar indican un estado hiperdinámico (Barton MH, 1998).

Estudios experimentales indicaron que la frecuencia respiratoria superaba las 30 respiraciones por minuto, con pico máximo 2 a 3 horas luego de la administración de LPS. Con respecto a la frecuencia cardíaca se presencio una taquicardia mayor a 70 latidos por minuto (Oikawa M., Yamaoka S., 2003).

Esta primera fase esta dada por los efectos vasomotores periféricos de las endotoxinas, manifestándose como vasodilatación y vasoplejía. Estas, están mediadas por prostaglandinas, oxido nítrico y mediadores tales como la bradiquinina que llevan a una hipotensión sistémica. (Muir WW., 1998).

La respuesta compensatoria, de una fase hiperdinámica inicial, incluye: taquicardia, aumento del volumen minuto y disminución la presión venosa central, hipertensión pulmonar, vasoconstricción periférica y aumento de la resistencia vascular periférica (Muir WW., 1998; Burrows GE., 1971; Clark ES., Collatos C., 1990; Lohmann KL & Barton MH, 2005).

Aunque muchos veterinarios están en conocimiento de la mayoría de los signos clínicos asociados a la endotoxemia, existen otros efectos que pueden no venir a la mente tan rápido. Basándose en la respuesta de équidos a los cuales se les administró experimentalmente pequeñas cantidades de endotoxinas, la endotoxemia por si sola puede causar signos clínicos indicadores de dolor abdominal. Estos pueden ir de leves a moderados, o incluso el caballo puede estar deprimido (Mackay R., 1992; Burrows GE., 1979; Baskett A. et al. 1997; Clark ES., Moore JN., et al.1989). Se presume que estos efectos son causados por la síntesis y liberación de sustancias pro inflamatorias que inhiben la actividad normal de la musculatura gastrointestinal, causando la reducción de la perfusión sanguínea (Mooris DD., 1991).

Los signos clínicos de cólico típicamente se abaten después del estadio inicial. Las alteraciones de la función gastrointestinal (Oikawa M., Shiga J., 2002) pueden ser inducidos por la disminución del flujo sanguíneo intestinal (King JN., Gerring EL., 1998) y el daño en la vascularidad mesentérica (Oikawa M., Shiga J.; 2002).

Si se administran grandes cantidades de LPS o si la exposición continua, la depresión empeora de forma progresiva, la anorexia persiste y las heces desarrollan características diarreicas (Barton MH, 1998).

La fiebre se desarrolla como un resultado de acción directa del FNT- α sobre el centro de la termorregulación y la producción local de progesterona inducida por IL-1 en o cerca del hipotálamo (Dinarello CA., et al., 1986 & Coceani et al., 1983).

Un estudio donde se administró LPS (10 μ g/kg); se observó un leve descenso en la temperatura rectal inmediatamente después de la administración (la que duro 2 horas), a continuación la temperatura comenzó a elevarse hasta llegar a los 39,0 °C (Oikawa M., Yamaoka S., 2003).

Debido al compromiso de la perfusión periférica, el color de la membrana mucosa oral cambia a rojo ladrillo o púrpura, aparece una línea oscura tóxica (llamada rodete endotoxémico) y el tiempo de llenado capilar se prolonga (Barton MH., 1998).

Esta perfusión periférica inadecuada y el compromiso de la función orgánica caracterizan una fase de shock hipodinámica. La coagulación intravascular, la vasodilatación sistémica y la reducción de la contractibilidad del miocardio pueden llevar a una disfunción orgánica, como falla hepática, renal y disfunción gastrointestinal (Oikawa M., Yamaoka S., 2003).

La temperatura corporal puede estar por debajo de lo normal, las extremidades y orejas, están frías al tacto. El pulso arterial se debilita y el tiempo de llenado venoso disminuye (Morris DD; 1988).

Las anomalías hemostáticas pueden manifestarse en forma de trombosis o aumento en la tendencia hemorrágica, con desarrollo de petequias o equimosis en las mucosas y una prolongada hemorragia en los puntos de venopunción (Morris DD; 1988). El sangrado también puede aparecer como una epistaxis espontánea o una hemorragia prolongada luego de una intubación nasogástrica (Morris DD., 1991).

Es típico que los signos clínicos adicionales reflejen el desarrollo del fallo orgánico. La insuficiencia renal y la laminitis (Moore JN., 1979) parecen complicaciones comunes de la endotoxemia equina. Otros fallos incluyen ictericia, anorexia y depresión causada por la insuficiencia hepática; taquipnea y disnea causada por fallo pulmonar; así como cólico y hemorragia causados por úlceras gastrointestinales inducidas por isquemia y patrones anormales de motilidad (Morris DD; 1991).

La insuficiencia renal, es el resultado de una necrosis cortical isquémica y tubular aguda, causada por una obstrucción de la arteriola aferente inducida por coagulopatías. Los signos clínicos pueden incluir oliguria, anuria o hematuria causada por infarto renal. (Morris DD; 1991). La oliguria acompañada de proteinuria puede ser causa de la falla renal (Oikawa M., Yamaoka S., 2003).

La laminitis es una enfermedad sistémica dolorosa de etiología compleja, siendo una de las complicaciones más comunes pos-quirúrgicas y de enfermedades médicas en el equino, especialmente en enfermedades gastrointestinales (Eades y col., 2002).

La misma causa claudicación en el equino, la cual se basa en que las laminillas que engranan el casco con la tercer falange pierde su integridad, resultando en una pérdida estructural del dedo (Pollitt C., 2003).

Su manifestación principal es una pododermatitis difusa aséptica que lleva a la separación de la dermis y epidermis del tejido laminar del pie (Pollitt C., 1996).

Como ya se mencionó, la laminitis puede llevar a claudicación, así como un aumento del pulso en las arterias digitales y de la temperatura de la muralla (Morris DD; 1991).

Usualmente es una secuela de un proceso sistémico. Las enfermedades que comúnmente ponen al equino en riesgo de una laminitis son aquellas que llevan a un severo compromiso de la pared gastrointestinal (ej. isquemia intestinal, colitis, enteritis) y condiciones sépticas de varios órganos (ej. metritis aguda, pleuroneumonía por coliformes) (Baxter G., 1994, 1996; Belknap JK., 2007).

La presencia de toxemia bacteriana es común en afecciones gastrointestinales y es un ejemplo de laminitis causada por sepsis (Baxter G., 1996; Hood 1999).

Información reciente indica que los cambios ocurridos en el tejido lamelar representan una manifestación a una respuesta inflamatoria sistémica local y son similares a aquellas que ocurren en la falla orgánica en la sepsis humana. Estos cambios incluyen activación leucocitaria (Hurley 2006), activación endotelial (Loftus 2007), adhesión de leucocitos (primordialmente neutrofilos) a la pared vascular (Black 2006) y una marcada respuesta inflamatoria evidenciada por citocinas proinflamatorias y daño oxidativo (Belknap JK., Moore JN., 2009).

No se ha comprendido completamente el lazo existente entre la fermentación de carbohidratos en el intestino grueso y la evolución de la laminitis aguda. Si bien ambos están ligados, un modelo experimental de laminitis determinó la absorción de LPS hacia el plasma, pero cuando se administran por sí solos no se constataron como la causa de laminitis (Bailey SR., 2009; Pollit, C. 2009).

Una investigación demostró que pequeñas cantidades de LPS pasaron a la circulación desde el intestino grueso luego de un descenso del pH, ocurrido como resultado de la fermentación de carbohidratos. Correlacionando estos hallazgos con estudios in-vitro se sugirió que las LPS activan primero las plaquetas antes que a los leucocitos por ser más sensibles (Brooks y col., 2007). Por lo tanto las LPS contribuyen con la iniciación temprana de la inflamación observada en los modelos experimentales de laminitis aguda (Bailey SR., 2009).

Los signos clínicos de la endotoxemia equina pueden ser manifestados por condiciones clínicas del síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS) como son, la leucopenia, el aumento y el descenso de la temperatura rectal y el aumento de la frecuencia cardiaca y respiratoria. Las respuestas patológicas como la disminución de las plaquetas, hipoglicemia, acidosis metabólica, desordenes en la hemostasia acompañada de cianosis de las membranas mucosas, proteinuria con oligoanuria y disfunción del tracto gastrointestinal, pueden ser manifestaciones patológicas de coagulación intravascular diseminada (CID) así como del síndrome de disfunción multi orgánico (MODS) (Oikawa M., Yamaoka S., 2003).

8.2. Hallazgos hematológicos y perfil bioquímico:

Una marcada y abrupta caída de los leucocitos, caracterizada por neutropenia, puede ser el indicador más específico de la sepsis bacteriana aguda o de la endotoxemia. En los casos prolongados, se observa un aumento en la proporción de las formas inmaduras de los neutrofilos y cambios tóxicos. Debido a que la neutropenia se produce durante el inicio del desarrollo de la endotoxemia, puede ser un parámetro útil para el control de los caballos en riesgo (Barton MH., 1998).

Este descenso de leucocitos puede ser dado por la extravasación de neutrofilos o la diseminación de leucocitos en los capilares del pulmón, hígado y tracto gastrointestinal (MacKay R., 2000).

El aumento del hematocrito y la concentración sérica de proteínas totales son evidencias de deshidratación. El aumento de la permeabilidad vascular y la formación de edema contribuyen al desarrollo de una hipoproteinemia (Lohmann KL., & Barton MH.; 2005).

Las anomalías de los electrolitos séricos dependen principalmente, de la naturaleza y la duración de la enfermedad subyacente debiendo evaluarse de forma individual. Las fuentes comunes de pérdidas de electrolitos son las secreciones gastrointestinales, orina y sudor; sin embargo puede contribuir una grave efusión hacia las cavidades corporales. En los pacientes con anorexia la falta de ingesta es un factor que se debe considerar (Lohmann KL., & Barton HM.; 2005).

Los equinos con endotoxemia y sepsis cursan con hipoglicemia (Morris DD., 1991).

En un estudio de 30 caballos con enfermedades gastrointestinales agudas, el perfil de coagulación se considero normal solo en 2 ejemplares (Johnstone JB., Crane S., 1986 en Lohmann KL., Barton MH.; 2005).

En las endotoxemias es común que se produzca la azoemia prerrenal, causada por la deshidratación y la disminución del flujo sanguíneo renal producido por el fallo orgánico (Barton MH., 1998).

8.3. Diagnostico:

La cuantificación de las endotoxinas en el plasma es posible por medio del ensayo por lisado de amebocito *Limulus*. La evaluación no es lo suficientemente cómoda como para convertirse en una prueba evaluativa sistémica, con frecuencia se usa como una herramienta de investigación (Lohmann KL., Barton MH., 2005). Por lo tanto el veterinario debe apreciar la enfermedad primaria asociada a un alto riesgo de endotoxemia y confiar en los signos clínicos y los datos clínicos patológicos para realizar el diagnostico. En algunos casos, la endotoxemia puede ser la primera indicación de enfermedad o ser el hallazgo más sobresaliente de un conjunto de manifestaciones clínicas sutiles (Moore JN., 2001).

9. Tratamiento del equino con endotoxemia:

Como objetivo principal se debe apuntar a la corrección de las alteraciones hemodinámicas y la deshidratación (Moore, R. 2009); para esto es importante realizar cuidados generales de soporte, como la administración de fluidos, coloides y agentes inotrópicos (fluidoterapia).

En lo que respecta a las estrategias terapéuticas para apalea la endotoxemia, existen cuatro puntos a tener en cuenta: 1) prevenir el pasaje de endotoxinas a la circulación sanguínea, 2) neutralizar las endotoxinas antes que interactúen con las células inflamatorias, 3) prevenir la síntesis, liberación o activación de los mediadores de la inflamación y 4) prevenir que la endotoxina induzca la activación celular.

9.1. Fluidoterapia.

La fluidoterapia es el tratamiento estratégico y básico de soporte, no específico para combatir los efectos hemodinámicos de las LPS (Klemer G., 2009).

La mayoría de los pacientes que presentan una endotoxemia, cursan con deshidratación moderada a severa, por eso el tratamiento con soluciones cristaloides es una metodología esencial en el comienzo de la terapia estabilizadora. El uso de coloides incluye tanto sintéticos como naturales, siendo indicados para aumentar la presión oncótica y combatir la pérdida de proteínas (Klemer G., 2009).

El uso de soluciones hipertónicas (7%-7,5% Na-Cl a razón de 4ml/kg) es indicado inicialmente en equinos con endotoxemia, logrando mejorar la perfusión tisular e incluso se ha demostrado que posee algunos efectos antiendotoxícos (Bertone JJ., Gossett KA., Shoemaker KE., 1990; Kreimeier U., Messmer K., 1991).

Hetastarch (HES; hydroxyethyl starch a razón de 10-20 ml/kg) es una potente solución coloidal, aumenta la presión oncótica y la mantiene por un período de 24 horas. Estudios en modelos de ratas con endotoxemia han demostrado que el uso de HES disminuye la producción hepática de mediadores de la inflamación, mejora la microcirculación intestinal y recompone el funcionamiento pulmonar (Klemer G., 2009).

No obstante el uso de HES en equinos ha sido cuestionado. En un estudio prospectivo, soluciones hipertónicas con HES fueron administradas a equinos con endotoxemia y fallaron en combatir los efectos hemodinámicos de las LPS (Pantaleon LG., Furr MO., McKenzie HC., 2006).

Plasma congelado o líquido (2-8 L, IV) es habitualmente incluido en el tratamiento de equinos con endotoxemia (Baxter G., 1997). La fluidoterapia es el tratamiento estratégico y básico de soporte, no específico para combatir los efectos hemodinámicos de las LPS (Klemer G., 2009).

9.2. Prevención del pasaje de endotoxinas a la circulación.

La inhibición de la liberación de endotoxinas requiere la identificación y eliminación del origen de las mismas.

Para Moore JN. y Barton HM. (2003) los caballos con isquemia intestinal deben ser intervenidos quirúrgicamente lo antes posible, removiendo la porción de intestino afectado. En algunos casos se debe realizar una laparotomía exploratoria, pues puede ser la única forma de llegar al diagnóstico con certeza.

Ante cualquier proceso séptico se debe establecer el tratamiento antimicrobiano apropiado. En un primer momento se recomienda realizar una terapia frente a los microorganismos más frecuentes utilizando drogas de amplio espectro. Posteriormente se aplicará el tratamiento específico según los resultados del cultivo y el antibiograma.

Bentley et al. (2002) realizaron estudios experimentales obteniendo que al usar antimicrobianos como los β -lactámicos para eliminar *Escherichia coli*, éstos producían significativamente un aumento en la liberación de endotoxinas y citoquinas (tales como el factor de necrosis tumoral- α , FNT- α), que el uso de Amikacina o incluso que la combinación de Amikacina y Ampicilina. Basándose en estos hallazgos, sería apropiado utilizar polymycina B para neutralizar las endotoxinas liberadas cuando se están usando β -lactámicos.

En los casos de alteraciones por sobrecarga de granos, se debe realizar un lavado gástrico seguido por la administración de vaselina o carbón activado a los efectos de evitar una mayor absorción de endotoxinas (Lohmann KL., Barton HM.; 2005).

Con frecuencia, los antimicrobianos se administran en el período perioperatorio en los pacientes con cólico, de esta manera se disminuye el riesgo de peritonitis, infecciones incisionales, sepsis y endotoxemia generalizada. Debido a que se ha implicado al tratamiento con antimicrobianos en el desarrollo de colitis, la duración del tratamiento debe ser mínima, excepto que haya evidencia de sepsis (Lohmann KL., Barton HM.; 2005).

9.3. Neutralización de las endotoxinas

En el presente hay dos formas de encarar la neutralización de endotoxinas antes de activar las células de la inflamación. Estas son: el suero hiper-inmune; anticuerpos dirigidos al lípido A de las endotoxinas, o la administración de polimixina B que se adhiere rápidamente al lípido A (Moore, JN. 2001).

9.3.1. Inmunoterapia

La cadena O del LPS actúa como un potente antígeno en la infección con bacterias gramnegativas, sin embargo los anticuerpos dirigidos contra la cadena O son específicos del serotipo y no pueden ejercer una importante inmunidad cruzada contra las cepas bacterianas heterólogas. El corazón y el lípido A muestran un grado mucho más alto de homología entre los LPS, ofrecen un blanco más prometedor para la inmunoterapia. La inmunización activa contra las endotoxinas ha sido descrita en los caballos (Sprouse HE., Garner HE., Lager K., 1989).

El objetivo del uso de anticuerpos es de hacer énfasis en la opsonización de la bacteria intacta, remover endotoxinas de la circulación sanguínea e interferir con la interacción de endotoxinas y las células inflamatorias (Spier SJ., Lavoie JP. y col. 1989; Zielger EJ., Fisher CJ., Sprung., 1991).

Los anticuerpos anti-endotoxicos comerciales son extraídas de equinos vacunados contra la región "core" de cepas rugosas de J5 *Escherichia coli* 011:B4 o una cepa mutante de *Salmonella Minnesota* Re59. Estos anticuerpos se han utilizado en diferentes clínicas y experimentos con resultados conflictivos (Tyler JW., Cullor JS., Spier SJ., Smith BP., 1990).

Estudios clínicos han demostrado que este tratamiento logra una reducción de la mortalidad y una disminución de los días de hospitalización, siendo comparado con equinos que no recibieron anticuerpos o que se les fue administrado plasma de equinos no vacunados (Spier RC., Lavoie JP., Cullor JS., 1989).

Plasma extraído de los donantes es usado en una dosis de 1-2 ml/Kg IV diluido en 10 a 20 veces en soluciones cristaloides para uso intravenoso, se aconseja administrar la mezcla lentamente en una a dos horas y controlar el paciente por algunas reacciones adversas (Spier RC., Lavoie JP., Cullor JS., 1989; Mackay R., 1992).

El uso de inmunidad activa esta recomendada en colitis (Murray MJ., 1990), cólicos (Snyder JR., 1994; Baxter MJ., 1995) y en endotoxemia (Barton MH., 1995).

Otros estudios han demostrado que el suministro de anticuerpos anti-endotoxícos a equinos y a humanos no tuvo los efectos deseados (Morris DD., Whitlock RH., 1987; Bone RC., Balk. y col. 1995).

Además, la administración de un antisuero *S. typhimurium* a los potrillos se asoció con un aumento de la frecuencia respiratoria y una actividad sérica más alta de la IL-6 y el FNT- α (Morris DD., Whitlock RH., 1987).

Estos productos plasmáticos además de los anticuerpos y proteínas contienen constituyentes activos tales como los componentes del complemento, la fibronectina, los factores de coagulación y la antitrombina III (Spier RC., Lavoie JP., Cullor JS., 1989; Mackay R., 1992).

Se discute que este tipo de tratamiento no logró los efectos esperados por diferentes consecuencias, una de ellas es porque la interacción LPS-célula inflamatoria sucede demasiado rápido en los equinos o que los anticuerpos han sido administrados demasiado tarde en algunos de los estudios (Moore JN., Barton HM., 2003).

Se ha observado que la falla del suero hiper-inmune de lograr efectos benéficos puede estar reflejada en la habilidad del sistema inmunitario del huésped de opsonizar o fagocitar la bacteria (Spier RC., Lavoie JP., Cullor JS., 1989).

9.3.2. Polimixina B

La polimixina B (PMB) es un antibiótico polipéptido catiónico que forma un complejo estable con la parte lipídica A. Se ha utilizado de forma de prevenir la interacción de las endotoxinas con las células pro-inflamatorias (Duardo MM., MacKay RJ., 1994; Paraviainen AK., Barton MH., Norton NN., 2001).

La PMB es un antibiótico con efectos tóxicos, muy bien documentados, por lo tanto los clínicos inicialmente cuestionaron el uso de este antibiótico en animales enfermos. Afortunadamente las concentraciones necesarias para inhibir las endotoxinas son mucho menores que aquellas asociadas a causar efectos de toxicidad (Moore JN., Barton HM., 2003; Duardo MM., MacKay RJ., 1994; Paraviainen AK., Barton MH., Norton NN., 2001).

En un estudio experimental en equinos con endotoxemia, la administración de PMB (1000-5000 U/ Kg IV) antes o una hora después de la inyección de endotoxinas, bajo significativamente la fiebre, la taquicardia y TNF- α en suero cuando se comparo con equinos que se les había administrado solo suero (Barton HM., 2000).

En un estudio con equinos con sobre carga de carbohidratos la PMB no pudo disminuir los signos clínicos de la endotoxemia o evitar el desarrollo de coagulopatías, acidosis, claudicación y shock (Raisbeck MF., Garner HE., Osweiler GD., 1989).

En la actualidad la PMB se la esta administrando a una dosis de 1000-5000 U/Kg de dos a tres veces por día; se recomienda comenzar con el tratamiento lo antes posible comenzados los síntomas clínicos (Barton HM., 2000).

Se recomienda instaurar un tratamiento de fluidoterapia en aquellos pacientes que la precisen y prestar importante atención a la concentración de creatinina sérica (Barton HM., 2000).

En un intento de disminuir el riesgo de efectos adversos mientras se preserva la capacidad neutralizante de los LPS, se ha desarrollado un conjugado de PMB con dextrano (Coyne CP., MoritzJT., y col., 1994).

En equinos con manifestaciones clínicas de endotoxemia, el uso agresivo de fluidos es indicado antes de el uso de PMB, con una dosis baja de PMB (1000-2000 U/kg, por 30 minutos) hasta que el estatus hemodinámico este en lo normal y la azoemia haya revertido (Klemer G., 2009).

9.3.3. Sustancias naturales

En humanos se han evaluado de forma experimental las sustancias naturales que se unen a los LPS, tales como la PUL y el CD14. Una proteína que ha recibido mucha atención en relación con la posible eficacia terapéutica es la proteína de aumento de la permeabilidad bactericida (BPI). Desde un punto de vista experimental el BPI recombinante ha mostrado proteger contra los efectos tóxicos y letales LPS aislados, y las pruebas clínicas efectuadas en personas muestran resultados prometedores (levin M., Qeshi N., morrison DC., 2000).

9.4. Prevenir o reducir la síntesis, liberación, o los efectos de los mediadores de la inflamación

Los procedimientos usados para tratar de lograr esta meta incluyeron anti-inflamatorios no esteroideos (AINEs), corticoides, anticuerpos monoclonales dirigidos contra las citocinas, receptores antagonistas del factor de activación plaquetaria y pentoxifilina (Moore JN., Barton HM., 2003).

9.4.1. Anti-inflamatorios no esteroideos

Los AINEs han sido las principales drogas para tratar la endotoxemia durante dos décadas. Logran su efecto actuando en la inhibición de la ciclooxigenasa, siendo la enzima responsable de la generación de las prostaglandinas y tromboxanos (Daels PF. y col. 1991).

Este metabolito del ácido araquidónico esta asociado a muchos de las respuestas hemodinámicas en equinos que se le administraron endotoxinas (Moore JN., Barton HM., 2003).

El resultado de estudios comparativos entre AINEs no selectivos indican que el flunixin de meglumine (FM) y el ketoprofeno son los que mejor previenen la síntesis de prostaglandinas y tromboxanos inducidos por las endotoxinas (Moore JN., Barton HM., 2003).



Estudios han demostrado que el tratamiento con FM antes de la administración de endotoxinas previene efectivamente los signos clínicos relacionados a la endotoxemia (Moore JN., 1986; Moore JN., Morris DD., 1992).

No obstante estudios han tenido resultados concluyentes que el FM tiene efectos adversos en el intestino delgado, disminuyendo la resistencia eléctrica transepitelial y aumentando el pasaje de endotoxinas desde la luz intestinal, y era paradójicamente exacerbado en la endotoxemia (Tomlinson JE., 2004; Matyjaszek S., Morton A., Freeman D., 2009).

Otros estudios han demostrado que la resistencia eléctrica transepitelial no fue afectada en el intestino grueso por la administración de FM (Matyjaszek S., Morton A., Freeman D., 2009).

Conociendo los efectos tóxicos de los AINEs (ulceras gástricas y necrosis capilar del riñón) muchos clínicos comenzaron a tratar equinos con endotoxemia con bajas dosis de FM (0,25mg/Kg IV cada 8 horas) (Moore JN., Barton HM., 2003).

Se ha usado la dosis de 1,1 mg/kg en equinos sufriendo de isquemia del colon mayor como vólvulos siendo seguras y efectivas (Kelmer G., 2009).

Se ha comprobado que una dosis baja de FM (0,25 mg/Kg) es efectiva en un modelo experimental de endotoxemia (Semrad SD., Hardee GE., y col., 1987).

Ya que la dosis menor puede no prevenir los signos clínicos de endotexemia una dosis intermedia (0,55mg/kg, IV) puede mejorar la sintomatología inducida por las LPS, como dolor abdominal, fiebre y depresión (Kelmer G., 2009).

Alternativamente, inhibidores específicos de la COX-2 como el firocoxib pueden ser útiles en el tratamiento de la endotoxemia. Fue demostrada la propiedad analgésica visceral y que no tenía efectos deletéreos hacia la permeabilidad de la mucosa del intestino delgado (Kelmer G., 2009).

9.4.2. Corticoides

Es bien sabido que el uso de corticoides se ha asociado con la inducción de laminitis aguda en equinos (Eyre P., Elmes PJ.; 1980).

Ha habido muy poca búsqueda de información para evaluar los efectos de los corticoides en caballos con endotoxemia. En un estudio experimental de endotoxemia en ponies anestesiados, la dexametazona tuvo algunos efectos benéficos en las respuestas hemodinámicas bajo grandes dosis de endotoxinas (Frauenfelder HC., Fessler JF., y col., 1982; Mooris DD., Moore JN., Crowe N., y col., 1991).

En otro estudio el tratamiento en ponies con metilprednisolona, 30 mg/Kg fracasó en prevenir los efectos de la endotoxemia (Moore JN., 1982).

Otro estudio se llevo a cabo in vitro con macrófagos extraídos del líquido peritoneal de equinos, demostró que la concentración necesaria para prevenir la síntesis del FNT- α inducida por endotoxinas era extremadamente alta (3mg/Kg aprox.) si se fuese a administrar en vivo (Morris DD., Moore JM., Crowe N., 1991).

Frecuentemente se usa dexametazona a la dosis de 0,25mg/kg como una única dosis en el comienzo del shock séptico (Orsini A., Divers TJ., 2008).

9.4.3. Anticuerpos monoclonales

Otra alternativa para modular los efectos de las moléculas pro-inflamatorias es prevenir la interacción entre el mediador y su receptor (Moore JN., Barton HM., 2003).

Este encare se a realizado con anticuerpos monoclonales y policlonales dirigidos contra FNT- α , receptores antagonistas del factor de activación plaquetaria y un receptor antagonista α 2-adrenergico. Los efectos benéficos esperados de los anticuerpos monoclonales fracasaron. Esto se basa en el hecho de que el FNT- α aumenta rápidamente después del contacto con las células, por lo tanto este tipo de terapia tiene poco uso clínico (Cargile JL., MacKay RJ., y col., 1995).

9.4.4. Receptores antagonistas del factor de activación plaquetaria

Los receptores antagonistas del factor de activación plaquetaria fueron evaluados durante la inducción experimental de endotoxemia. Los efectos positivos de este método incluyen la inducción de endotoxinas a la fiebre, leucopenia, taquicardia y a la academia láctica (Carrick JB., Moore JN., Barton HM., 1993).

En otro experimento los receptores antagonistas del factor de activación plaquetaria redujeron el íleo intestinal, hipotensión y la permeabilidad vascular inducida por las endotoxinas (Mills PC., Ng JC., y col., 1995).

Similares efectos se observaron con α 2 agonistas en un caso de íleo inducido por endotoxinas (Eades SC., Moore JN., 1993).

9.4.5. Pentoxifilina

La pentoxifilina es un derivado de la metilxantina usado en humanos por sus propiedades reológicas. Es un inhibidor de la fosfodiesterasa, ha sido sugerida para su uso en la endotoxemia debido a sus efectos sobre la función de los neutrofilos y su capacidad para inhibir la producción de varias citoquinas, interferones y tromboplastina (Lohmann & Barton; 2005).

En un experimento en un equino vivo se observó la disminución de la producción del FNT- α , IL-6, el TXB2 y la tromboplastina en respuesta a la endotoxina (Barton MH., Moore JN., 1994).

En otro estudio en equinos que recibieron endotoxinas seguidas por el tratamiento con pentoxifilina (7,5 mg/kg seguida por la infusión continua de 3mg/kg durante 3 horas) solo se observó un beneficio mínimo. El tratamiento mostró una mejoría significativa en la temperatura corporal, de la frecuencia respiratoria y el tiempo de recalcificación en sangre entera, pero no se observó ningún efecto en la frecuencia cardíaca, presión sanguínea, el recuento leucocitario, la concentración plasmática de fibrinógeno ni la concentración sérica de citoquinas. La conclusión fue que los beneficios del tratamiento con pentoxifilina podrían limitarse a la administración de altas dosis en bolos o por infusión continua durante la etapa inicial del proceso fisiopatológico (Barton MH., Moore JN., 1997).

En un modelo equino in vivo de endotoxemia, se encontró que la combinación de pentoxifilina (8 mg/kg) y FM (1,1mg/kg) producía más beneficios que el uso individual de cada uno de estos fármacos, logrando una mejoría en la respuesta hemodinámica (Baskett A., Barton MH., Norton N., y col., 1997).

En el mercado no se encuentra pentoxifilina de administración intravenosa. Su dosis es 8,4 a 10mg/kg cada 12 horas vía oral (Orsini A., Divers TJ., 2008).

9.4.6. Antioxidantes

El dimetilsulfóxido (DMSO) se utiliza con frecuencia en un intento de captar radicales libres derivados del oxígeno. Este tratamiento está más justificado en casos de isquemia intestinal asociados a lesiones por reperfusión (Lohmann & Barton; 2005).

En una encuesta a especialistas el DMSO fue la droga en común más usada para tratar la endotoxemia (Baxter G., 1997).

La justificación de su uso es que las LPS inducen daño oxidativo, que son parte de los responsables de los signos clínicos (Klemer G., 2009).

En ratones altas dosis de DMSO previenen totalmente el daño intestinal subsiguiente a la inducción experimental de endotoxemia (Brackett DJ., Lerner MR., Wilson MF., 1991). Y previno la adhesión de neutrófilos al endotelio.

En otro estudio no se encontraron beneficios en el uso de DMSO en un modelo experimental de isquemia intestinal, cuando se administró ante la reperfusión del intestino isquémico (Arden WA., Slocombe RF., y col; 1997).

Con la dosis usual de 1g/kg, se observó que el DMSO aumentaba la pérdida de mucosa después de la isquemia-reperfusión del colon mayor (Moore RM., Muir WW., Bertone AL., 1995).

Las altas concentraciones de DMSO (1g/kg, IV) causaban peroxidación lipídica y potencialmente exacerbaban el daño al intestino isquémico, no debe de ser usado en equinos con porciones extensas de daño intestinal, y se tendría que no utilizarlo en caballos con lesiones gastrointestinales hasta comprobar lo contrario (Kelmer G., 2009).

Actualmente se usa el DMSO a una dosis de 0,1g/kg cada 12 horas para casos de isquemia intestinal. Para su administración intravenosa el DMSO necesita ser diluido al 10% en una solución poliónica (para prevenir hemolisis); la administración oral también es posible diluyéndolo al 10-20%, por sonda naso gástrica (Lohmann KL., Barton HM.; 2005).

Un estudio se concluyó que el DMSO tenía mínimos efectos en los síntomas clínicos inducidos por la endotoxemia en equinos. Pero se observó una bajada de la fiebre inducida por las LPS (Kelmer G., Doherty J., Elliott S., y col.; 2008).

El Alopurinol es un inhibidor de la xantina oxidasa y se sugirió con el objetivo de disminuir el daño tisular inducido por los radicales de oxígeno (Lohmann & Barton; 2005).

Se tiene pocas indicaciones de uso del alopurinol en la especie equina (Orsini A., Divers TJ., 2008).

En un experimento se ha demostrado que 5mg/kg de alopurinol cada 12 horas tiene efectos beneficiosos administrándolo antes de la provocación de endotoxinas (Lochner F., Sangiah S., y col.; 1989).

En otro estudio el daño de la mucosa provocado por los radicales libres no fue atenuado por el Alopurinol (Moore RM., Muir WW., Bertone AL., 1995).

9.5. Otros tratamientos

9.5.1. *Lidocaína*

La lidocaína es un anestésico local que provoca su efecto bloqueando los canales de sodio, previniendo la propagación del potencial de acción.

La lidocaína fue reportada de ser la droga más usada como procinético posquirúrgico (1,3 mg/kg en bolo IV, seguido de una infusión constante de 0,05 mg/kg/min) en equinos (Nieto JE., Snyder JR., 2004).

La lidocaína no demostró algún efecto en la motilidad en un estudio en equinos sanos. También en un estudio in vitro la lidocaína falló en demostrar una inducción de la contractibilidad en la musculatura del intestino delgado (Nieto JE., Snyder JR., 2000).

En otro estudio más reciente la lidocaína no tuvo efecto en la motilidad del jejunio ni en el vaciado gástrico y cecal (Okamura K., Sasaki N., Yamada M., y col., 2009).

En la otra mano los últimos estudios han dejado constancia que la lidocaína mejora el rango de sobrevivencia en los casos posquirúrgicos, pero no mejora el periodo de íleo posquirúrgico (Robertson MA., Sanchez LC., Merritt AM., 2005; Klemer G., 2009).

Aunque la lidocaína es comúnmente usada como un efectivo analgésico, no tiene ese efecto en el dolor visceral del equino (Robertson MA., Sanches LC., Merritt AM., 2005).

Una de las causas de íleo pos-quirúrgico es el trauma de manipuleo del intestino durante la cirugía provocando inflamación e íleo. Esto es muy posible que sea la explicación de porque la lidocaína puede ser efectiva como procinético en íleo pos-quirúrgicos en pacientes con cólico y no en equinos sanos (Klemer G., 2009).

Se ha comprobado que la lidocaína atenúa la isquemia intestinal en modelos experimentales y disminuye el pasaje de LPS después que isquemia fue provocada en el jejunio (Klemer G., 2009).

9.5.2. Ketamina

Ketamina es un anestésico disociativo que bloquea los receptores de N-metil-D-aspartato. Ketamina es un potente analgésico, recientemente se ha demostrado que reduce el dolor agudo pos-quirúrgico en pacientes humanos (Klemer G., 2009).

En equinos la ketamina (0,6 mg/kg seguido de 0,02 mg/kg/hora) logra una analgesia somática y es efectiva como la lidocaína como un anestésico local y epidural (Gomez de Segura IA., De Rossi R., Santos M., 2003; Klemer G., 2009).

En modelos de ratones con endotoxemia la ketamina previene los efectos deleterios de las LPS en el hígado, tracto gastrointestinal y tracto respiratorio (Yu M., Shao D., Feng X., 2007).

9.6. Lo último en tratamiento

9.6.1. Detergentes (Tyloxapol)

El Tyloxapol polímero líquido usado como surfactante para la licuefacción o remoción de mucus y exudado de secreciones broncopulmonares. El uso de detergentes han dado alta efectividad en el tratamiento de endotoxemia en modelos experimentales de ratas y ratones (Serikov VB., 2003; Kelmer G., 2009).

En un estudio que se le administro endotoxinas a equinos se lo trato previamente con tyloxapol intravenoso y fue capaz de prevenir la fiebre, leucopenia y la hipertensión pulmonar (Longworth KE., Smith BL., Staub NC., 2004; Kelmer G., 2009).

El tyloxapol tiene una estructura química similar a la del ácido biliar, y como este ultimo actúa como detergente. El ácido biliar juega un rol fundamental en el mecanismo de defensa del cuerpo contra la infección de LPS, previniendo que las LPS impongan sus efectos deletéreos. Similarmente las moléculas de tyloxapol se adhieren a las membranas de los macrófagos, a las PUL (proteínas de unión a las LPS) o directamente a las LPS interfiriendo con la respuesta fisiológica. Resultados en equinos sugieren que el tyloxapol puede tener un lugar en el tratamiento de la endotoxemia (Kelmer G., 2009)

9.6.2. Emulsiones fosfolipídicas

Emulsiones fosfolipídicas libres de proteínas han sido demostradas de poder adherir y neutralizar endotoxinas en humanos (Kelmer G., 2009).

En equinos se observó hemólisis luego del tratamiento con emulsiones fosfolipídicas, por lo tanto el uso clínico de estos debe de ser limitado o debería ser administrado más rápido o a una dosis total menor (Moore JN., 2007).

Los últimos estudios son alentadores, pero se precisa seguir estudiando antes que el tratamiento sea recomendado (Kelmer G., 2009).

9.6.3. Hemofiltración

Un tratamiento innovador en la sepsis en la medicina humana consta de circular la sangre del paciente por un filtro externo, por donde se absorben las moléculas pro-inflamatorias disminuyendo la incontrolable respuesta inflamatoria y mejorando el porcentaje de supervivencia. (Ronco C., Ricci Z., Bellomo R., 2001; Kelmer G., 2009).

Se reportó el uso de hemofiltración en equinos obteniendo ninguna mejoría en la clínica ni en los niveles hematológicos causados por los efectos de respuesta a las LPS (Veenman JN., 2002; Kelmer G., 2009).

Un método más específico de hemofiltración involucra la filtración de sangre por una columna conteniendo PMB y removiendo los LPS por absorción (Kelmer G., 2009).

Este avanzado método tecnológico de alta efectividad, puede tener un importante papel en el tratamiento futuro de la endotoxemia (Kelmer G., 2009).

10. BIBLIOGRAFÍA:



1. Akira S, Takeda K.; (2004) Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol*; 4:499-511.
2. Bailey S. R.; (2009) Plasma concentrations of endotoxin and platelet activation in the developmental stage of oligofructose-induced laminitis; *Vet Immunol Immunopathol*; 129; 167-173
3. Balk RA. The Sepsis Handbook. 2nd ed: Thomson Advanced Therapeutics Communications, 2004.
4. Barton M. H., Lohman K.L.; (2003) Current Therapy in Equine Medicine; Endotoxemia, 4a ed., Philadelphia, WB Saunders; 104-108
5. Barton M.H., Collatos C., Moore J.N.; (1996) Endotoxin induced expression of tumour necrosis factor, tissue factor and plasminogen activator inhibitor activity by peritoneal macrophages; *Equine Vet. J.*; 28 (3) 382-389
6. Barton MH., Morris DD., Norton N., et al.; (1998) Hemostatic and fibrinolytic indices in neonatal foals with presumed septicemia. *J Vet Intern Med*; 12:26-35.
7. Barton MH., Parvianen A., Norton N., (2004) Polymyxin B protects horses against induced endotoxaemia in vivo. *Equine Vet. J.*; 36:397-401.
8. Barton MH., White NA., Moore JN.; (1998) Endotoxemia. editors: *Current techniques in equine surgery and lameness*, 2a. ed., Philadelphia, WB Saunder; 203-215.
9. Baskett A, Barton MH, et al.; (1997) Effect of pentoxifylline, flunixin meglumine, and their combination on a model of endotoxemia in horses. *Am. J. Vet Res*; 58:1291-1299
10. Belknap J.K., Giguere S., Pettigrew A., Cochran A.N., Van Pes A.W., Pollitt C., (2007) Lamellar pro-inflammatory cytokine expression patterns in laminitis at the developmental stage and at the onset of lameness: innate vs adaptive immune response; *Equine Vet. J.* ; 39 (1) 42-47
11. Bently AP., Barton MH., Lee MD.; Norton NA., Moore JN.; (2002) Antimicrobial-induced endotoxin and cytokine activity in an in vitro model of septicemia in foals. *Am. J. Vet. Res.*; 63 (5) 660-668
12. Bertone JJ., Gossett KA., Shoemaker KE., et al.; (1990) Effect of hypotonic vs. isotonic saline solution on responses to sublethal *Escherichia coli* endotoxemia in horses; *Am. J. Vet. Res.* 51: 999-1007.
13. Boontham P., Chandran P., Rowlands B., et al.; (2003) Surgical sepsis: dysregulation of immune function and therapeutic implications. *Surgeon*; 1:187-206.
14. Brckett DJ., Lerner MR., Wilson MF., (1991) Dimethyl sulfoxide antagonizes hypotensive, metabolic, and pathologic responses induced by endotoxin. *Circ. Shock.* 33:156.163.
15. Burrows GE.; (1979) The effect of repeated administration of *E. coli* LPS to ponies; *Can J. Comp. Med*; 43: 321-327
16. Carre EA.; (2008) Current Therapy in Equine Medicine; 6a ed.; The systemic inflammatory response syndrome; capitulo 182; Saunders.
17. Clark ES., Moore JN.; (1989) The effects of slow infusion of a low dosage of endotoxin in healthy horses. *Equine Vet. J. Suppl.*; 7: 33-37.
18. Cohen J.; (2002) The immunopathogenesis of sepsis. *Nature*; 420:885-891.

19. Cohen ND., Woods AM.; (1999) Characteristics and risk factors for failure of horses with acute diarrhea to survive: 122 cases (1990-1996); *J. Am. Vet. Med. Assoc.*; 214:382-390.
20. de la Rabiére G., Franck T., Deby-Dupont G., Salciccia A., Grulke S., Péters F., Seteyn D.; (2008) Effects of unfractionated and fractionated heparins on myeloperoxidase activity and interactins with endothelial cells: Possible effects on the pathophysiology of equine laminitis; *The Vet. J.*; 178:62-69.
21. Divers TJ., *Equine emergencies treatment and procedures*; 3a ed.; Shock and systemic inflammatory response syndrome, capitulo 24; Saunders.
22. Durando MM., MacKay RJ., Linda S., et al.; (1994) Effects of polymyxin B and *Salmonella typhimurium* antiserum on horses given endotoxin intravenously; *Am. J. Vet. Res.*; 55:921-927.
23. Eades SC., Moore RM., (2006); Sepsis and endotoxemia; en Aure JA., Stick JA.; *Equine surgery*; 3a ed; Missouri, Saunders; p 8-18.
24. Figueiredo M.D., Vandenples M.L., Hurley D. J., Moore J.N.; (2009) Differential induction of MyD88-and TRIF-dependent pathways in equine monocytes by Toll-like receptor agonists; *Vet. Immunol. Immunopathol.*; 127 125-134
25. Figueiredo MD., Vandenplas ML., Hurely JD., Moore JN.; (2009) Differential induction of MyD88- and TRIF-dependent pathways in equine monocytes by Toll-like reseptors agonists; *Vet. Immunol. Immunopathol.* ; 127:125-134.
26. Fiorentino DF., Zlotnik A., Mosmann TR., et al.; (1991) IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells; *J. Immunol.* 146:3444-3451.
27. Fitzgerald KA, Rowe DC, Barnes BJ, et al. (2003) LPS-TLR4 signaling to IRF-3/7 and NF-kappaB involves the toll adapters TRAM and TRIF; *J. Exp. Med.*; 198:1043-1055.
28. Hemmi H., Takeuchi O., Sato S., et al. (2004) The roles of two I kappa B kinase-related kinases in lipopolysaccharide and double stranded RNA signaling and viral infection. *J. Exp. Med.*; 199:1641-1650.
29. Hoebe K, X. Du, P. Georgel, E. Janssen, K. Tabet, S. O. Kim, J. Goode, P. Lin, N. Mann, S. Mudd, K. Crozat, S. Sovath, J. Han & Beutler B.; (2003) Identification of Lps2 as a key transducer of MyD88-independent TIR signalling. *Nature*; 424, 743–748.
30. Hoshino K., Kaisho T., Iwabe T., Takeuchi O., Akira S.; (2002) Differential involvement of IFN- β in Toll-like receptor stimulated dendritic cell activation; *Int. Immunol.*; 14, 1225–1231
31. Hunt JM., Edwards GB., Clarke KW.; (1986) Incidence, diagnosis and treatment of postoperative complications in colic cases. *Equine Vet. J.*; 18:264.
32. Jones SL., (2003) Treatment of acute and chronic gastrointestinal inflammation; *Vet. Clin. Equine*; 19: 697-714.
33. Karaghiosoff M, Steinborn R, Kovarik P, et al.; (2003) Central role for type I interferons and Tyk2 in lipopolysaccharide-induced endotoxin shock. *Nat Immunol*; 4:471-477.
34. Kato A, Ogasawara T, Homma T, et al. ; (2004) Lipopolysaccharide-binding protein critically regulates lipopolysaccharide-induced IFN-beta signaling pathway in human monocytes; *J. Immunol*; 172:6185-6194.
35. Kawai T, Takeuchi O, Fujita T, Inoue J, Mu hlradt P, Sato S, Hoshino K, and Akira S. ; (2001) Lipopolysaccharide Stimulates the MyD88-Independent Pathway

- and Results in Activation of IFN-Regulatory Factor 3 and the Expression of a Subset of Lipopolysaccharide-Inducible Genes; *J. Immunol.*; 167: 5887–5894.
36. Kelmer G.; (2009) Update on treatments for endotoxemia; *Vet. Clin. Equine*; 25: 259-270.
 37. King J., Gerring EL; (1991) The action of low dose endotoxemia on equine bowel motility; *Equine Vet. J.*; 23 (1) 11-17
 38. King, J., Gerring E.; (1988) Detection of endotoxin in cases of equine colic. *Vet. Rec.*; 123; 269-271.
 39. Koenig JB., Hart J., Harris DM.; (2009) Evaluation of endotoxin activity in blood measured via neutrophil chemiluminescence in healthy horses and horses with colic; *Am. J. Vet. Reserch*; 70(10):1183-1186.
 40. Liao CH., Sang S., Liang YC., et al.; (2004) Suppression of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in downregulating nuclear factor-kappa B pathway by Garcinol. *Mol Carcinog*;41:140-149.
 41. Lohmann KL., Barton MH., (2005) Medicina intrna equine; 2da ed.; Endotoxemia; Intermedica; 909-931.
 42. Longworth KE., Smith BL., Staub NC., et al.; (1996) Use of detergent to prevent initial responses to endotoxin in horses; *Am. J. Vet. Res.*; 57:1063-1066.
 43. Mackay R. Endotoxemia; En: Robinso NE; *Current therapy in equine medicine*; 2a ed.; Philadelphia, Saunders , 1992; 225-323
 44. Mair TS., Westerlaken LV., Cripps PJ., et al. (1990) Diarrhea in adult horses: a survey of clinical cases and an assessment of some prognostic indices; *Vet. Rec.*; 126:479-481.
 45. Medzhitov R., Preston-Hurlburt P., Janeway CA.; (1997) A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 388:394–397.
 46. Moore J.N., Morris D.D.; (1992) Endotoxemia and septicemia in horses experimental and clinical correlates; *J. Am. vet. med. Ass.*; 200: 1903-1914
 47. Moore J.N., Garner H.E., Shapland J.E., Schaub R.G.; (1981) Equine endotoxemia: An insight into cause and treatment; *JAVMA* 179 (5) 473-477
 48. Moore JN, Garner HE, Gerg JN, et al. (1979) Intacecal endotoxin and lactate during the onset of laminitis: a preliminary report. *Amer. J. Vet. Res.*; 40: 722-723.
 49. Moore JN., (1991) Rethinking endotoxemia in 1991; *Equine Vet. J.*; 23 (1) 3-4
 50. Moore JN., Hardee MM., Hardee GE.; (1986) Modulation of arachidonic acid metabolis in endotoxic horses: comparison of flunixin meglumine, phenylbutazone, and a selective thromboxane synthetase inhibitor. *Am. J. Vet. Res.* 47:110–3.
 51. Moore JN., Morris DD.; (1992) Endotoxemia and septicemia in horses: experimental and clinical correlates; *J. Am. Vet. Med. Assoc.*; 200:1903–14.
 52. Moore JN., Norton N., Barton HM., et al.; (2007) Rapid infusion of a phospholipid emulsion attenuates the effects of endotoxemia in horses; *Equine Vet. J.*; 39:243-248.
 53. Moore JN; (1988) Recognition and Treatment of Endotoxemia. *Vet Clin. North Am. Pract.*; 4 (1):105-113
 54. Moore JN; A Perspective on Endotoxemia, publicado en IVIS; <http://www.ivis.org/proceedings/AAEP/2001/91010100061.pdf>
 55. Morris DD; (1988) Recognition and management of disseminated intravascular coagulation in horses, *Vet. Clin. North Am. Equine Pract.* 4(1); 115-143

56. Morris, DD.; (1991) Endotoxemia in horses. A review of cellular and humoral mediators involved in its pathogenesis. *J. Vet. Intern. Med.*; 5;167-181.
57. Muzio M., Mantovani A.; (2000) Toll-like receptors; *Microbes Infect.*; 2:251-255.
58. Neuder LE., Keener LM., Jones SL.; (2009) Role of p38 MAPK in LPS induced pro-inflammatory cytokine and chemokine gene expression in equine leukocytes; *Vet. Immunol. Immunopathol.*; 129:192-199.
59. Oikawa M., Yamaoka S.; (2003) Clinical, hematological, and biochemical analysis of experimental endotoxemia in thoroughbred horses; *J. Equine Sci.*; 14, (1) 5-12.
60. Okamura K., Sasaki N., Yamada M., et al. (2009) Effects of mosapride citrate, metoclopramide hydrochloride, lidocaine hydrochloride, and cisapride citrate on equine gastric emptying, small intestine and caecal motility; *Res Vet. Sci.*; 86:302-308.
61. Pantaleon LG., Furr MO., McKenzie HC. et al.; (2006) Cardiovascular and pulmonary effects of hetastarch plus hypertonic saline solutions during experimental endotoxemia in anesthetized horses; *J. Vet. Intern. Med.*; 20: 1422-1228.
62. Pastores SM, Katz DP, Kvetan V.; (1996) Splanchnic ischemia and gut mucosal injury in sepsis and the multiple organ dysfunction syndrome. *Am J Gastroenterol* 1996;91:1697-1710.
63. Peek SF, Borah S, Semrad S, McQuirk S., Slack JA., Patton E., Coombs D., Lien L., Darien BJ.; (2008) Plasma endotoxin concentration in horses: a methods study; *Vet. Clin. Pathol.*; 33(1) 29-31.
64. Rasis AL., Hodgson JL., Hodgson DR.; (1996) Equine neonatal septicaemia: 24 cases. *Australian Vet. J.*;73:137-140.
65. Ramadouri G., Meyer zum Buschenfelde KH., Tobias PS., et al.; (1990) Biosynthesis of lipopolysaccharide-binding protein in rabbit hepatocytes; *Pathobiol.*; 58(2):89-94.
66. Rietschel ET, Brade H, Host O et al; (1996) Bacterial endotoxin: chemical constitution, biological recognition, host response, and immunological detoxification. Berlin, Springer; p 201-213.
67. Robertson SA., Sanchez LC., Merritt AM., et al.; (2005) Effect of systemic lidocaine on visceral and somatic nociception in conscious horses; *Equine Vet. J.*; 37: 122-127.
68. Rock, F. L., G. Hardiman, J. C. Timans, R. A. Kastelein, and J. F. Bazan; (1998) A family of human receptors structurally related to Drosophila Toll. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; 95:588-593
69. Sakaguchi S, Negishi H, Asagiri M, et al. (2003) Essential role of IRF-3 in lipopolysaccharide-induced interferon-beta gene expression and endotoxin shock. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*; 306:860-866.
70. Serikov VB., Glazova TV, Jerome EH., et al.; (2003) Tyloxapol attenuates the pathologic effects of endotoxin in rabbits and mortality following caecal ligation and puncture in rats by blockade of endotoxin receptor-ligand interactions. *Inflammation*; 27:175-190.
71. Shuster R., Traub-Dargatz J., Baxter G.; (1997) Survey of diplomates of the American College of Veterinary Internal Medicine and the American College of Veterinary Surgeons regarding clinical aspects and treatment of endotoxemia in horses. *JAVMA* 210:87.

72. Staempfli HR., Townsend HG., (1991) Prescott JF. Prognostic features and clinical presentation of acute idiopathic enterocolitis in horses. *Can. Vet. J.*; 32:232-237.
73. Steverink P.J.G.M.; Salden H.J.M., Sturk A., Klein W.R., van der Velden M.A., Németh F.; (1994) Laboratory and clinical evaluation of chromogenic endotoxin assay for horses with acute intestinal disorders; *Vet. Quart.*; 16 (2) 117-121
74. Stewart MC, Hodgson JL, Kim H, et al. (1995) Acute febrile diarrhoea in horses: 86 cases (1986-1991); *Australian Vet. J.*; 72:41-44.
75. Susan Clark E., Ganelly B., Moore J.N.; (1991) Effects of slow infusion of a low dosage of endotoxin on systemic hemodynamic in conscious horses; *Equine Vet. J.*; 23 (1) 11-17
76. Sykes BW., Furr MO.; (2005) Equine endotoxaemia - a state-of-the-art review of therapy; *Australian Vet. J.*; 83:45-50.
77. Tomlinson JE., Blisklager AT.; (2004) Interactions between lipopolysaccharide and the intestinal epithelium; *J A VM A*; 224 (9); 1446-1452
78. Tomlinson JE., Wilder Bo., Young KM., et al.; (2004). Effects of flunixin meglumine or etodolac treatment on mucosal recovery of equine jejunum; *Am. J. Vet. Res.*; 65: 761-769.
79. Van Hoogmoed LM., Nieto JE., Snyder JR., et al., (2004) Survey of prokinetic use in horses with gastrointestinal injury; *Vet. Surg.*; 33: 279-285.
80. Weiss DJ., Evanson OA.; (2002) Evolution of lipopolysaccharide-induced activation of equine neutrophils; *Am. J. Vet. Res.*; 63(6):811-815.
81. Werners A. H., Bull S., Fink-Gremmels J.; (2005) Endotoxemia: a review with implicatios for the horse; *Equine Vet. J.*; 37 (4) 371-383.
82. Wright SD., Ramos RA., Tobias PS., et al; (1990) CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding ptotein; *Science* 249:1431-1433.
83. Wurfel MM., Wright SD.; (1997) Lipopolysaccharide-binding protein and soluble CD 14 trasfer lipopolysaccharide to phospholipid bilayers: preferential interaction with particular classes of lipid. *J. Immunol* 158:3925-3934.
84. Yu M., Shao D., Feng X., et al.; (2007) Effects on ketamine on pulmonary TLR4 expression and NF-kappa-B activation during endotoxemia in rats. *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol*; 29:395-399.