



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Farmacia y Bioquímica
Facultad de Medicina
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

**PARTICIPACIÓN DE LA INTERLEUQUINA-10 EN LA
INMUNOSUPRESIÓN INDUCIDA POR ENDOTOXINAS BACTERIANAS**

TESIS DE MAESTRÍA en Biología Molecular Médica

Autora: Lic. MARLINA OLYISSA CÓRDOBA MORENO

Director

Dr. Martín A. Isturiz
Inv. Superior, CONICET

Director Adjunto

Dra. María Bárbara Rearte
Inv. Asistente, CONICET

Instituto de Medicina Experimental (IMEX) - CONICET - Academia Nacional de Medicina

Año 2016

RESUMEN

Los procesos sépticos constituyen una de las mayores causas de muerte en las unidades de cuidados intensivos. Aunque en las sepsis se observa una secreción simultánea de agentes inflamatorios y antiinflamatorios (TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8, IFN- γ , IL-10, TGF- β y GC), en la fase temprana predomina un estado clínico característico de una respuesta hiper-inflamatoria, mientras que durante la fase tardía prevalece, clínicamente, la respuesta anti-inflamatoria. Durante este último estadio ocurren más del 70% de las muertes por sepsis, debido a que, habitualmente, los pacientes entran en un estado de inmunosupresión y son susceptibles a infecciones por microorganismos oportunistas. En las sepsis causadas por bacterias Gram negativas, las endotoxinas, constituyentes normales de la membrana, también conocidas como lipopolisacáridos (LPS), han sido consideradas como uno de los agentes principales causantes de esa inmunosupresión.

Debido a que en nuestro laboratorio se demostró la participación de los glucocorticoides (GC) en la inmunosupresión, el objetivo de este trabajo fue evaluar la contribución de la IL-10 a la misma y su potencial relación con los GC. Por eso, ratones BALB/c wild type (WT) y deficientes en la producción de IL-10 (IL-10 KO) fueron inmunosuprimidos con LPS.

Los resultados mostraron una alta sensibilidad de los ratones IL-10 KO

al LPS probablemente debido a los niveles elevados y sostenidos en el tiempo de las principales citoquinas pro-inflamatorias asociadas a cuadros sépticos (TNF- α , IL-12 e IFN- γ) así como a un mayor número de receptores para TNF- α observado en esos ratones con respecto a los WT. Los niveles de corticosterona también fueron más altos en los ratones IL-10 KO, aunque la dexametasona no tuvo un efecto protector ante un desafío letal con LPS (2LD50=200ug). Además, el estatus basal de la respuesta inmune humoral primaria -aunque no la secundaria- como así también el nivel de inmunosupresión fue similar en ambas cepas. Sin embargo, la IL-10 es crítica para el control de la producción temprana de TNF- α después del LPS y la refractariedad inducida por los GC.

Por otra parte, nuestros resultados apoyan la tesis de la existencia de una regulación bidireccional entre los GC y la IL-10. Así, por un lado, los GC ejercen sobre la IL-10 una regulación positiva, mientras que la IL-10 sobre los GC accionaría en sentido contrario.

Finalmente, este trabajo fue un intento de ampliar el conocimiento acerca de los mecanismos responsables de la inmunosupresión que, eventualmente, pueda ayudar a incorporar la implementación de procedimientos terapéuticos en sepsis sobre bases más racionales.

ABSTRACT

Septic processes constitute one of the major causes of death in intensive care. Even though sepsis presents a simultaneous induction of both, an inflammatory and anti-inflammatory agents (TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8, IFN- γ , IL-10, TGF- β y GC), in early phases predominates a characteristic clinical state of a hyper-inflammatory response, whereas during later phases an anti-inflammatory response becomes predominant. It is during this last state that more than 70% of sepsis deaths occur due to failure in controlling pathogens associated to an immunosuppression state. In sepsis caused by Gram-negative bacteria, endotoxins, a normal constituent of the bacterial outer wall, also known as lipopolysaccharide (LPS), has been considered one of the principal agents causing the undesirable effects in this critical illness.

Like we previously demonstrated the glucocorticoids (GC) participation in this immunosuppression, the aim of this study was to evaluate the IL-10 contribution to it, as well as its potential relationship with glucocorticoids. For this, wild type (WT) and IL-10 deficient (IL-10 KO) BALB/c mice were immunosuppressed with LPS.

Results shows that IL-10 KO mice were more sensitivity to LPS, probably due to an elevated and sustained level of principal proinflammatory cytokines associated to sepsis (TNF- α , IL-12 and IFN- γ) and to the elevated number of TNF- α receptors observed in these mice with respect to WT mice. The levels of corticosterone were higher too, although dexamethasone did

not protect of LPS lethal challenge (2LD50=200ug). The basal status of the primary humoral immune response -but not the secondary- and the level of IS were similar in both strains.

Although IL-10 did not modify the humoral immune status nor changed the LPS-induced immunosuppression, is critical for controlling early production of TNF- α after LPS and the refractoriness induced by glucocorticoids.

Our results support the thesis of a bidirectional regulation between GC and IL-10. However, while GC exerts a positive regulation on IL-10, a negative action of IL-10 was observed on GC levels.

Finally, this work was an attempt of contributing to the knowledge about the mechanisms of immunosuppression that, eventually, can help to incorporate the implementation of therapeutic procedures in sepsis on a rational basis.

AGRADECIMIENTOS

Somos animales sociales, espirituales y completamente dependientes. Detrás de cada uno de nuestros logros individuales hay infinitas manos extendidas con un toque de divinidad. Mi entera gratitud a Dios y a...

Mi familia, especialmente mis padres: Marlina Moreno Quejada y Marcial Córdoba Padilla, por toda la confianza y el apoyo económico y emocional, sin los cuales nada de esto sería posible.

Mis amigos, especialmente Miguel Lederkremer, por cada palabra de aliento que muchas veces me motivó a no desistir en las adversidades.

Mis directores, Martín A. Isturiz y M^a Bárbara Rearte, por la guía, los consejos y la paciencia.

Raúl Ruggiero y Damián Machuca por la ayuda brindada y su buena predisposición en todo momento.

Todos mis compañeros y personal de Inmuno I y del Instituto de Medicina Experimental (IMEX-CONICET-ANM).

Dedico esta tesis a la memoria de mi tío Eduardo Moreno Quejada - "Tate"

"La luz de adelante es la que alumbra"

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN /ABSTRACT	I
ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS	IX
1. INTRODUCCIÓN	1
2. OBJETIVOS	
2.1. Objetivo general.	13
2.2. Objetivos específicos.	13
3. MATERIALES Y METODOLOGÍA	15
3.1. Reactivos.	15
3.2. Animales.	15
3.3. Estudios de letalidad.	16
3.4. Modelo de inmunosupresión inducido por LPS.	16
3.5. Evaluación de la respuesta inmune humoral.	17
3.5.1. Respuesta primaria.	17
3.5.2. Respuesta secundaria.	17
3.6. Determinación de anticuerpos por hemaglutinación / citometría.	18
3.6.1. Hemaglutinación.	18
3.6.2. Citometría de flujo.	18
3.7. Determinación de citoquinas en suero/plasma.	19
3.7.1. Radioinmunoensayo (RIA).	19

3.7.2. Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA).	19
3.8. Determinación de receptores de TNF- α en sangre	20
3.9. Análisis estadístico.	20
4. RESULTADOS	21
4.1. Ratones IL-10 KO muestran una sensibilidad incrementada al LPS.	21
4.2. Exacerbada producción de citoquinas después del desafío con LPS en ratones IL-10 KO.	22
4.3. Niveles incrementados de corticosterona en plasma en ratones IL-10 KO.	26
4.4. La dexametasona ejerce su efecto protector a un shock por LPS en ratones IL-10 KO sólo a bajas dosis de la endotoxina.	27
4.5. El fenómeno de tolerancia a endotoxina puede establecerse incluso en ausencia de IL-10.	30
4.6. Exacerbados niveles de corticosterona en el establecimiento del estado de tolerancia en ratones IL-10 KO.	34
4.7. Ratones IL-10 KO llegan a niveles de inmunosupresión similares a los de un ratón WT en una respuesta inmune humoral.	36
4.8. Mayor respuesta inmune humoral secundaria en ausencia de IL-10.	38
5. DISCUSIÓN	41

6. CONCLUSIONES	50
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52

LISTA DE ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS

BSA	Albúmina de suero bovina
CARS	Compensatory Anti-inflammatory Response Syndrome
CLP	Cecal LigationPuncture
DEX / DEXA	Dexametasona
DHEA	Dehidroepiandrosterona
ELISA	Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas
GC	Glucocorticoides
GRC	Glóbulos rojos de carnero
IFN- γ	Interferón-gamma
IL-#	Interleuquina-#
IL-10 KO / KO	IL-10 knockout
Ig G/M	Inmunoglobulina G/M
i.p.	Intraperitoneal
LPS	Lipopolisacárido
MODS	Multiple Organ Disfunction Síndrome
PBS	Buffer fosfato salino
RIA	Radioinmunoensayo
RU-486	Mifrepistona
SIRS	Systemic Inflammatory Response Syndrome

TGF- β	Factor de crecimiento transformante-beta
TNF-a	Factor de necrosis tumoral-alfa
UCI	Unidad de Cuidados Intensivos
WT	Wild type

1. INTRODUCCIÓN

Las sepsis son definidas habitualmente como síndromes causados por una respuesta inflamatoria sistémica (SIRS - *Systemic Inflammatory Response Syndrome*) de un organismo en reacción a una infección severa causada por bacterias, virus u hongos. Luego, este evento pro-inflamatorio se prolonga con una respuesta anti-inflamatoria compensatoria (CARS - *Compensatory Anti-inflammatory Response Syndrome*) que, frecuentemente, termina desencadenando en el paciente un estado de inmunosupresión (Figura 1)¹⁻⁵.

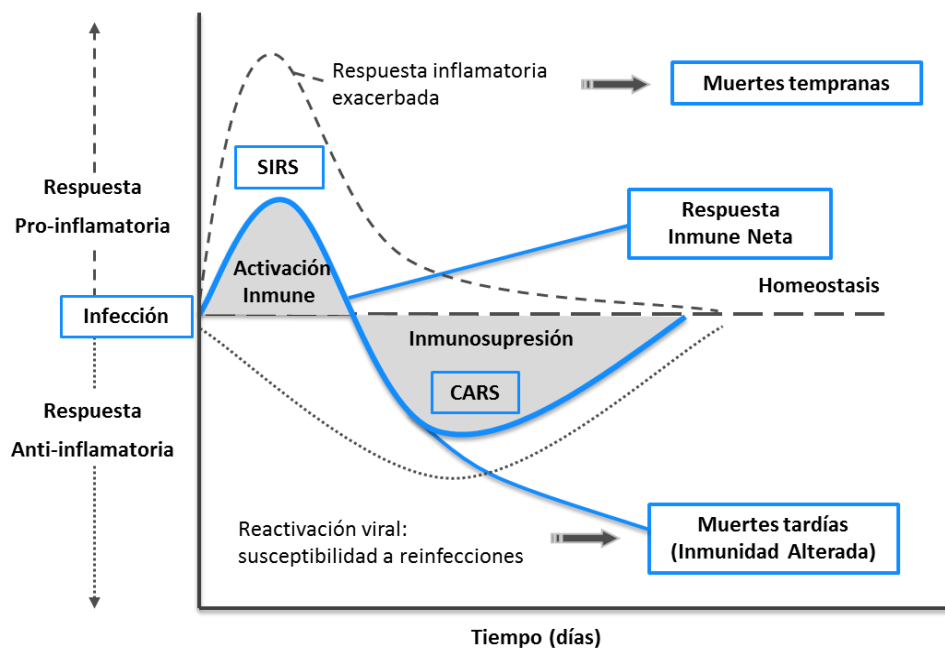


Figura 1. Evolución de una sepsis en el transcurso de los días¹.

Actualmente se conoce que durante el comienzo de una sepsis no hay sólo una producción de mediadores pro-inflamatorios en la fase inicial como se

pensaba años atrás, sino que éstos se secretan en forma simultánea con agentes anti-inflamatorios¹⁻⁶. La diferencia está planteada a nivel clínico, en donde en la fase inicial predomina una respuesta de tipo hiper-inflamatoria, la cual, dependiendo de diversos factores (genética del hospedador, edad, virulencia y carga de patógenos, etc), puede conducir al huésped a un proceso de falla multiorgánica y, eventualmente, a la muerte¹. No obstante, si se supera este estadio luego de días y/o semanas del inicio de dicho cuadro, la respuesta anti-inflamatoria compensatoria pasa a tener un rol predominante.

Durante este estadio anti-inflamatorio las evidencias clínicas indican un estado inmune alterado que, frecuentemente, conduce al paciente a una inmunosupresión progresiva y severa, causante principal de la incapacidad para eliminar o combatir la infección primaria y/o el desarrollo de infecciones secundarias u oportunistas^{1,3-6}. La importancia de esto reside en que hoy se conoce que la mayoría de las muertes por sepsis se producen durante esa etapa tardía (CARS), donde predominan esos cuadros anti-inflamatorios con signos evidentes de depresión inmune^{3,4,6}.

Un proceso séptico se caracteriza, además, por un estado clínico acompañado de fiebre, leucocitosis o leucopenia, frecuencia cardíaca elevada y reducida resistencia vascular; que puede derivar en variantes de mayor complejidad y

peor pronóstico como la sepsis severa, el shock séptico y la disfunción orgánica múltiple (MODS-*Multiple Organ Dysfunction Syndrome*)⁷.

Además de las sepsis hay otras patologías asociadas a los SIRS, como la injuria por isquemia y reperfusión, el insulto térmico, el shock hemorrágico o el shock traumático, que representan una variada gama de eventos capaces de inducir una violenta respuesta inflamatoria sistémica que, habitualmente, se inicia con la liberación de citoquinas pro- y anti-inflamatorias (TNF- α , IFN- γ , IL-6, IL-1 e IL-12, IL-10, TGF- β , IL-4, IL-13, GC, entre otras), que también pueden concluir en un shock con fallas orgánicas múltiples y muerte del individuo⁸. En dichos casos, como se mencionó anteriormente para las sepsis, desde el punto de vista clínico la fase pro-inflamatoria en estos eventos también se expresa en las primeras 24 - 48 horas para luego predominar la respuesta compensatoria anti-inflamatoria, que tiende a contrarrestar la inflamación aguda y restablecer la homeostasis pero que, igual que en los procesos sépticos, generalmente conduce a un estado de inmunosupresión severa con una duración de días, semanas o meses, y es la causa de la aparición de infecciones oportunistas que llevan a la muerte de esos pacientes^{7,9-13}.

En los últimos tiempos se ha incrementado la frecuencia de sepsis en todo el mundo. Así, las estimaciones actuales según los datos reportados por el NCHS (*National Center for Health Statistics*) del CDC (*Centers for Disease Control*

and Prevention) indican que el número de asistencias al hospital de pacientes con sepsis aumentó de 621.000 en el año 2000 a 1.141.000 en 2008¹⁴. Por otra parte, un estudio internacional denominado SOAP (*Sepsis Occurrence in Acutely Ill Patients*) realizado en 24 países de Europa, indica que más del 35% de los pacientes que se encuentran en unidades de cuidados intensivos (UCI) tuvieron sepsis en algún momento durante su estadía en la UCI, con una tasa de mortalidad variable entre el 27% - 80%¹⁵.

Aunque en Argentina no hay datos fidedignos, el GAEDI (*Grupo Argentino de Estudio, Difusión e Investigación de la Sepsis*) ha reportado una mortalidad global de 46,2% sobre una base de 50 muertes diarias a causa de sepsis^{16,17}.

Si bien durante años las teorías que prevalecieron sobre este fenómeno lo consideraban un evento asociado a una inflamación exacerbada en respuesta a una infección, el tratamiento con diferentes agentes anti-inflamatorios en los últimos 30 años y en más de 40 ensayos clínicos han fracasado rotundamente en un período conocido como la "tumba de las compañías farmacéuticas"^{18,19}. Entre otros procedimientos anti-inflamatorios utilizados figuran anticuerpos anti-citoquinas inflamatorias varias como, por ejemplo, TNF- α o IL-1 β ; antagonistas sintéticos de LPS (lipopolisacáridos); anticuerpos anti-LPS; corticoides; anti inflamatorios no esteroideos; etc.

Este fracaso en el desarrollo de terapias adecuadas tiene que ver, en parte, con la carencia -que aún hoy persiste- sobre la comprensión plena de los mecanismos fisiopatogénicos que acompañan a las sepsis. Así, relevando datos de mortalidad en los cuadros de sepsis se ha observado que si bien existe una incidencia de muerte en las fases tempranas donde predomina la fase inflamatoria, y sobre la cual se han dirigido las diversas estrategias terapéuticas, la tasa de mortalidad es mucho mayor (70%) en la fase anti-inflamatoria; período en el que los pacientes cursan con una inmunosupresión severa^{3,6}.

La inmunosupresión observada en las sepsis ha sido asociada a diferentes alteraciones, tanto a nivel de la respuesta inmune innata como de la adaptativa. Así, se han reportado deficiencias regulatorias y/o efectoras en linfocitos T o B; eliminación o alteración funcional de células dendríticas, monocitos/macrófagos y neutrófilos; disminución marcada de antígenos de histocompatibilidad de clase II (HLA-DR); etc.; hechos que culminan en una disminución en la producción de anticuerpos y en un deterioro de la inmunidad celular a nivel sistémico y de mucosas²⁰⁻²⁵.

Por otra parte, el mayor caudal de cuadros sépticos (alrededor del 50%) está asociado a infecciones por bacterias Gram negativas en donde los lipopolisacáridos (LPS) bacterianos, también conocidos como endotoxinas y que son componentes normales de la pared celular de ese tipo de bacterias,

juegan un rol central. La respuesta al LPS induce una rápida secreción de mediadores pro- y anti-inflamatorios tales como TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8 e IFN- γ , IL-10, TGF- β y GC.

Por otra parte, la exposición repetida a dosis bajas y subletales de LPS conduce al huésped a un estado transitoriamente refractario frente al desafío a una dosis letal (2 LD₅₀), proceso conocido como tolerancia a LPS o tolerancia a endotoxinas. Este evento constituye la fase inicial de la inmunosupresión y no debe confundirse con la tolerancia inmunológica convencional que es específica de antígeno. Dicho fenómeno se caracteriza por una refractariedad del huésped a responder no sólo al LPS, sino a otros estímulos inflamatorios sistémicos como la injuria térmica o traumática, el shock hemorrágico, o cualquier otro evento SIRS; lo que habla de la inespecificidad del mismo y establece el concepto de tolerancia cruzada o heterotolerancia^{26,27}.

Dicha tolerancia o refractariedad al LPS no debe considerarse como un fenómeno de anergia celular sino como un estado fisiológico o fisiopatológico en donde hay predominancia de síntesis y secreción de sustancias anti-inflamatorias.

Actualmente, las evidencias indican que el fenómeno de tolerancia al LPS está asociado a un estado clínico con peor pronóstico y evolución, observándose

una correlación directa entre el mantenimiento de la misma y una internación más prolongada, una sostenida ventilación mecánica, una mayor incidencia de infecciones y un elevado recuento de glóbulos blancos^{28,29}. Aunque, en principio, el estado de tolerancia es una respuesta adaptativa beneficiosa para el huésped, hoy se considera que su persistencia en el tiempo constituye un componente importante de la desregulación inmune y es una de las principales causas de la inducción de la inmunosupresión inespecífica reportada en estos pacientes, aspecto central de la susceptibilidad a infecciones por bacterias o microorganismos oportunistas.

La integración de estos conceptos permitió considerar a la tolerancia al LPS como un evento crucial en la fase anti-inflamatoria de las sepsis (CARS) y como la etapa inicial, o la vía aferente, de la instalación de la inmunosupresión inducida por LPS, tanto en modelos experimentales como durante el curso de una sepsis³⁰.

Entre los actores principales que han sido considerados responsables del fenómeno de tolerancia y/o inmunosupresión se encuentran las citoquinas anti-inflamatorias como la interleuquina 10 (IL-10) y el TGF- β , como así también los glucocorticoides (GC)^{31,32}. Sin embargo, la participación de los GC en estos fenómenos ha sido -y es- motivo de controversias y su importancia se ha relativizado³³. En efecto, debido a que las sepsis eran consideradas como fenómenos exclusivamente pro-inflamatorios, como concepto

terapéutico empírico se utilizaban dosis altas de GC para su tratamiento. Si bien esto posibilitaba el freno del shock agudo en la fase SIRS, en la mayoría de los casos dicha terapia no solo no era beneficiosa sino que, por el contrario, si el paciente se encontraba en la fase anti-inflamatoria (CARS) - desconocida en ese momento- aumentaba la incidencia de muerte³⁴. Frente a estas observaciones, la utilización de los GC en la sepsis fue abandonada ya en la década de los 80's.

A la luz del conocimiento actual, lo anterior se encuentra asociado a la fugacidad de la fase SIRS, así como al predominio posterior de los eventos CARS en el curso de dichas patologías. En años recientes los GC resurgieron como concepto terapéutico a bajas dosis en sepsis, aunque sólo en pacientes que cursan cuadros de insuficiencia adrenal³⁵. Sin embargo, existen algunas evidencias de participación de estos agentes como mediadores activos en los fenómenos de inmunosupresión.

En efecto, varios trabajos han reportado la presencia de altos niveles de GC en plasma de pacientes con sepsis, correlacionando estos niveles de GC en sangre con una peor evolución de la enfermedad y con el deterioro de algunos indicadores del funcionamiento del sistema inmune³⁶⁻³⁸ como la disminución en la expresión de moléculas HLA-DR en monocitos³⁷.

En estudios realizados recientemente en nuestro laboratorio, utilizando un modelo murino de tolerancia/ inmunosupresión inducido por LPS como el que se plantea más abajo, se demostró que el bloqueo de la acción de GC endógenos por mifepristone (RU-486), un antagonista competitivo de receptores para GC, promueve la desarticulación del fenómeno de tolerancia e inmunosupresión a las endotoxinas³⁹, modifica el *status* inmune y promueve una restauración parcial, pero muy significativa, de la respuesta inmune humoral -primaria y secundaria- como de la respuesta celular⁴⁰. Otra evidencia indirecta a favor de la importancia de los GC es que en ratones adrenalectomizados no es posible establecer el fenómeno de tolerancia⁴¹. Además, estos animales son extremadamente sensibles al shock y muerte por LPS, con una LD₅₀ 200 veces menor que la de un ratón normal.

Esos resultados obtenidos con RU-486 estimularon el análisis de otros agentes que podrían intervenir en la regulación de la acción de los GC. Así, se plantearon estrategias que permiten regular los niveles de GC a través de otros agentes farmacológicos y de sustancias naturales que actúen a nivel del eje hipotálamo-pituitaria-adrenal (HPA), aspecto que, por otra parte, sería más beneficioso ya que una regulación fisiológica más controlada de la inmunosupresión podría permitir una intervención más segura y persistente que la observada con RU-486.

Por ello, utilizando la dehidroepiandrosterona (DHEA), una hormona natural que presenta una actividad anti-glucocorticoide por neutralización de su actividad neurotóxica⁴², y el Metirapone, una droga que inhibe la síntesis de GC endógenos⁴³, en nuestro laboratorio se demostró que dichas sustancias también promueven una recuperación parcial de la respuesta inmune primaria humoral y celular en un contexto de inmunosupresión inducido por LPS⁴⁴.

Este hallazgo sobre la importancia de los GC en la inmunosupresión inducida por LPS -demostrado por el uso de agentes que actúan a través de distintas vías metabólicas- abre perspectivas terapéuticas muy promisorias en donde se define claramente que el manejo de los niveles de corticoides es un aspecto crucial para que un individuo séptico pueda mantenerse en estado de inmunocompetencia y no entrar en ciclos profundos de inmunosupresión severa que conducen a la muerte.

Es por ello que resulta interesante extender esos estudios a otros mediadores que han sido involucrados en los estados de inmunosupresión y que han sido considerados como factores centrales en la instalación y el mantenimiento de la depresión inmune como son las citoquinas anti-inflamatorias IL-10, el *transforming growth factor beta* (TGF- β); mediadores lipídicos como las prostaglandinas (PG-E2), mediadores neurológicos y catecolaminas^{4,32,45-48}. Además, se ha reportado la participación de ciertas poblaciones celulares que

contribuyen a la depresión inmune, como las células T regulatorias ($CD4^+CD25^+Foxp3^+$) y las células mieloides supresoras ($GR1^+CD11b^+$)^{49,50}.

Varios investigadores han demostrado que tanto los niveles de citoquinas pro-inflamatorias como anti-inflamatorias pueden ser correlacionados con la gravedad de la enfermedad. Así, por ejemplo, niveles elevados de citoquinas anti-inflamatorias como la IL-10 y el TGF- β en sepsis se encuentran asociados con un peor pronóstico de la enfermedad. Es conocido que la IL-10 es capaz de inhibir la síntesis de diferentes citoquinas pro-inflamatorias generadas por linfocitos T o por macrófagos. Además, del mismo modo que se mencionó anteriormente con los GC, también se ha visto una correlación entre los altos niveles de IL-10 en plasma y la baja expresión de moléculas HLA-DR en monocitos, sugiriendo que los niveles de IL-10 también podrían ser utilizados como valor predictivo del grado de inmunoparálisis^{3,51}.

Por otro lado, Hotchkiss et al.⁵² demostraron que bloqueando la síntesis de IL-10 en un modelo de *Cecal Ligation Puncture* (CLP) es posible mejorar la respuesta inmune y la supervivencia en estos ratones, confirmando a esta citoquina un rol central en los eventos de disfunción/ depresión inmune.

Sin embargo, existen controversias respecto a la relevancia de la misma y esto en parte tiene que ver con el tiempo y/o momento en el cual se evalúa el efecto o la participación de un agente determinado. Un dato interesante

que refleja esa problemática en la interpretación de resultados es cuando, utilizando un modelo de CLP murino, los autores demuestran que si se realiza un bloqueo de la IL-10 previo a la inducción de la sepsis disminuye la sobrevivencia de los ratones. En cambio, si el bloqueo se realiza 12 horas posteriores a la inducción del CLP la sobrevivencia aumenta⁵².

Lo anterior demuestra la importancia de considerar que un determinado proceso puede estar conformado por fases bien diferenciadas (en este caso, inducción y mantenimiento) en las cuales el mismo agente puede ejercer distintos efectos.

En ese contexto nos proponemos estudiar la relevancia y participación de la IL-10 en el establecimiento de la inmunosupresión, analizando además, las posibles relaciones con los GC endógenos.

Este estudio es un intento de comprender y evaluar la relevancia y/o jerarquización de el/los agentes en cuestión, teniendo como finalidad la búsqueda de posibles targets asociados a los eventos de depresión inmune para el abordaje de otras estrategias terapéuticas que permitan restablecer la competencia inmune en los fenómenos sépticos, y SIRS en general.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GENERAL

El objetivo general del trabajo es estudiar los mecanismos y/o agentes involucrados en la fase de establecimiento de la inmunosupresión inducida por LPS en un modelo experimental murino, con especial énfasis en dilucidar el rol de la citoquina anti-inflamatoria interleuquina 10 (IL-10) en esos procesos.

El impacto potencial de este objetivo radica en la búsqueda de mecanismos que permitan luego abordar terapias alternativas a las actuales y que posibiliten restaurar la homeostasis inmunológica en cuadros de inmunosupresión, estado predominante en etapas tardías de la sepsis.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Para intentar tener una comprensión cabal del sistema se recurrió a un modelo experimental murino, utilizando cepas de ratones BALB/c *wild type* (WT) así como de deficientes absolutos en la producción de IL-10 (*IL-10 knockout mice*, IL-10 KO), para estudiar los siguientes objetivos particulares:

1. Sensibilidad al LPS.
2. Cinética de la producción de TNF- α frente a estímulos con LPS.

3. Efecto de la Dexametasona (un glucocorticoide sintético) sobre los efectos del LPS.
4. Inducción del fenómeno de tolerancia a LPS.
5. Examinar la respuesta inmune humoral.
6. Determinar la relación entre el estado de inmunosupresión y la IL-10.

NOTA: Este proyecto es una línea de un proyecto más amplio denominado "Estrategias para revertir la inmunosupresión inducida por endotoxinas bacterianas" del Director, Dr. Martín A. Isturiz (Inv. Superior del CONICET), y en el que participa la Directora Adjunta, Dra. M^a Bárbara Rearte (Investigadora Asistente del CONICET).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. REACTIVOS

El lipopolisacárido (LPS) de *Escherichia Coli* O111:B4, purificado por extracción con fenol, se obtuvo de Sigma-Aldrich (St Louis, MO, EE.UU.). Los glóbulos rojos de carnero (GRC) se obtuvieron de Alfredo Gutiérrez (Buenos Aires, Argentina). La dexametasona (DEXA), glucocorticoide sintético, se obtuvo de Sidus SA (Buenos Aires, Argentina). Las citoquinas y los reactivos se prepararon en solución salina estéril libre de pirógenos. Se utilizaron los siguientes anticuerpos anti-ratón: anticuerpo monoclonal anti-TNF Receptor I de hámster armenio conjugado con isotiocianado de fluoresceína (FITC) (ABCAM inc. Cambridge, MA, EE.UU.), anticuerpo monoclonal anti-TNF Receptor II de hámster armenio conjugado con ficoeritrina (PE) (BioLegend, EE.UU.), anticuerpo monoclonal (mAb) anti-inmunoglobulina (Ig)M de rata conjugada con ficoeritrina (PE) (BD-Pharmingen, San Diego, CA, EE.UU.) y anticuerpo policlonal anti-IgG de cabra conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Jackson Immuno- Research Laboratories, West Grove, PA, EE.UU.).

3.2. ANIMALES

Se usaron ratones BALB/c hembras y machos de 2 a 4 meses de edad, con un peso aproximado entre 20 y 25 gramos, del bioterio del IMEX-CONICET, Academia Nacional de Medicina; de aquí en adelante denominados como

ratones *wild type* -WT-. Además se usaron ratones deficientes en la producción de IL-10 background BALB/c hembras y machos C.129P2(B6)-IL10 tm1Cgn/J (Jackson Laboratory), de la Fundación Instituto Leloir en adelante, mencionados como ratones *knock out* en IL-10 o IL-10 KO. Los ratones se mantuvieron en un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas a $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ y alimentados con una dieta estándar de agua y *ad libitum*. Los experimentos llevados a cabo en el presente documento se llevaron a cabo de acuerdo con los principios establecidos en la Guía para el Cuidado y Uso de Animales del National Institutes of Health.

3.3. ESTUDIOS DE LETALIDAD

Los ratones fueron desafiados con distintas dosis de LPS en solución salina libre de pirógenos; comenzando con la dosis letal para un ratón WT ($2 \text{ LD}_{50} = 200 \mu\text{g}/\text{ratón}$), a fin de evaluar la resistencia de los ratones IL-10 KO a la endotoxina. Luego se enfrentaron a cantidades de LPS cada vez más bajas (100, 50, 10, 5, 1 y $0.25 \mu\text{g}/\text{ratón}$). La administración del LPS se dio vía intraperitoneal (i.p.) y los ratones fueron seguidos hasta 72 horas después de cada dosis. Una dosis letal induce 100% de mortalidad entre 24 y 48 horas después de la inyección.

3.4. MODELO DE INMUNOSUPRESIÓN INDUCIDO POR LPS

El establecimiento de la inmunosupresión en un modelo murino se llevó a cabo mediante la inoculación diaria de LPS vía i.p., adaptado del esquema

utilizado previamente con ratones WT^{39,40}. El esquema se realizó con la inoculación i.p. de LPS en concentraciones crecientes (entre 0.25 y 100 µg/dosis) por un lapso de 15 días consecutivos: El régimen comenzó con dosis de 0.25 µg/ratón durante los primeros 2 días, seguido de 0.5 µg/ratón los 3 días siguientes, 1.0 µg/ratón por 2 días, 5.0 µg/ratón por 2 días, 50 µg/ratón por 2 días y finalmente, 100 µg/ratón los últimos 3 días.

3.5. EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE HUMORAL

3.5.1. Respuesta Primaria

Los ratones fueron inmunizados con una dosis de 5×10^8 GRC/ratón vía i.p. Siete días después de la inmunización se colectan muestras de plasma o suero y se evalúan los niveles de anticuerpos anti-eritrocitos ovinos mediante un ensayo de hemaglutinación y por citometría de flujo.

3.5.2. Respuesta secundaria

El segundo desafío con el antígeno (Ag) (1×10^8 GRC/ratón) se lleva a cabo entre 25-30 días después de la primera inmunización (respuesta primaria). De 7 a 10 días después de la segunda inmunización se colectan muestras de plasma o suero y se evalúan los niveles de anticuerpos mediante un ensayo de hemaglutinación y citometría de flujo.

3.6. DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS POR HEMAGLUTINACIÓN / CITOMETRÍA

3.6.1. Hemaglutinación

La respuesta de los anticuerpos a los GRC se evaluó mediante un ensayo de hemaglutinación. Inicialmente, las muestras de plasma o suero fueron descomplementadas a 56°C durante 30 minutos, se diluyen a la décima parte en buffer fosfato salino (PBS) con 0.5% de albúmina de suero bovina (BSA) y posteriormente se hacen diluciones seriadas también en PBS-BSA 0.5%. Luego se toman 50 µL de cada solución, se dispensan en una micro placa de 96 pocillos de fondo redondo y se añaden 50 µL de GRC al 0.25% (en PBS-BSA 0.5%). Finalmente, las placas se incubaron durante 24 horas a temperatura ambiente y el título se consideró como el recíproco de la última dilución positiva.

3.6.2. Citometría de Flujo

Para medir IgG e IgM de ratón se prepararon muestras de suero / plasma con anti-GRC a diferentes diluciones en PBS-BSA 0.5%, teniendo en cuenta los títulos sub-aglutinantes vistos en la hemaglutinación. Luego se incubaron 10 µL de la muestra con 3 µL de una madre de GRC al 1% en PBS-BSA 0.5% durante 30 minutos a 4°C. Se realizaron 3 lavados de las células con PBS-BSA 0.5% y se incuban por 30 minutos a 4°C con anti-IgM (PE) y anti-IgG (FITC). Nuevamente se lavan las células y las inmunoglobulinas se evalúan

en un Becton Dickinson FACScan usando el software CellQuest (Becton Dickinson, San Jose, CA, EE.UU.). También se hicieron controles de GRC incubados con anticuerpos marcados en ausencia de plasma.

3.7. DETERMINACIÓN DE CITOQUINAS EN SUERO/PLASMA

La determinación de GC y citoquinas se llevó a cabo por métodos de RIA/ELISA.

3.7.1. Radioinmunoensayo (RIA)

Los niveles de corticosterona se determinaron mediante un kit de radioinmunoensayo (RIA) del ICN Biomedicals (Costa Mesa, CA, EE.UU.), comercialmente disponible. La dexametasona- ^{3}H (DEX- ^{3}H) en etanol es del New England Nuclear (Boston, MA, EE.UU.) y tenía una actividad específica de 35.00 Ci/mM (1,254 GBq /mM).

3.7.2. Ensayo de Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (ELISA)

Las muestras de suero / plasma fueron colectadas y congeladas a -20°C hasta su uso. Se realizaron Elisas de TNF- α e IL-10 en placas de microtitulación de poliestireno de fondo plano (OptEIA establecido; BD Biosciences, San Diego, CA, EE.UU.), según las instrucciones del fabricante.

3.8. DETERMINACIÓN DE RECEPTORES DE TNF- α EN SANGRE

Para medir la expresión de los receptores de TNF- α , TNF-R1 y TNF-R2, en las distintas poblaciones celulares en sangre, 100 μ L de sangre entera se incuban por 30 minutos a 4°C con anti-TNF-R2 (PE) y anti-TNF-R1 (FITC). Se lavan las células con PBS1X y los receptores se evalúan en un Becton Dickinson FACScan usando el software CellQuest (Becton Dickinson, San Jose, CA, EE.UU.).

3.9. ANALISIS ESTADISTICO

Los valores se expresan como la media \pm el error estándar (ES) de la media de n observaciones. Las diferencias entre 2 grupos fueron evaluadas mediante t Test de Student no pareado; diferencias entre más de 2 grupos fueron evaluadas mediante un análisis de varianza seguido por un test de comparación múltiple de Tukey. Todas las pruebas estadísticas fueron interpretados de forma de dos colas y $P < 0.05$ fue considerado significativo.

4. RESULTADOS

4.1. RATONES IL-10 KO MUESTRAN UNA SENSIBILIDAD INCREMENTADA AL LPS.

Teniendo en cuenta que el objetivo principal del proyecto es estudiar la influencia de la IL-10 en los mecanismos de inmunosupresión inducidos por LPS, en principio se consideró necesario analizar comparativamente la sensibilidad al LPS de los ratones WT con los IL-10 KO.

Para ello, los animales fueron inoculados vía i.p. con diferentes concentraciones de LPS, partiendo desde la dosis letal para un ratón WT (LPS 200ug/ ratón, 2 LD₅₀) y disminuyendo gradualmente la misma. La evolución de los ratones se analizó hasta 24-48 horas después del desafío. Los resultados se muestran en la Tabla 1 e indican que los ratones IL-10 KO son, por lo menos, 200 veces más sensibles al LPS que los WT.

Tabla 1. Mortalidad en ratones WT y KO con distintas dosis de LPS.

[LPS] µg/ratón	WT		IL-10 KO	
	n / mortalidad	%	n / mortalidad	%
200	6 / 6	100	6 / 6	100
100	11 / 5	45	11 / 11	100
50	4 / 0	0	4 / 4	100
10	10 / 0	0	6 / 6	100
5,0	6 / 0	0	9 / 9	100
1,0	6 / 0	0	6/6	100
0,25	10 / 0	0	10/0	0

4.2. EXACERBADA PRODUCCIÓN DE CITOQUINAS DESPUÉS DEL DESAFÍO CON LPS EN RATONES IL-10 KO.

Con el objetivo de evaluar la cinética de diversas citoquinas inducidas por un estímulo con LPS, ratones WT e IL-10 KO fueron desafiados con 100µg/ratón de LPS y a diferentes tiempos (0, 90, 180 y 360 minutos) se evaluó en plasma la producción de las principales citoquinas asociadas a los cuadros sépticos. Se midieron entonces los niveles de TNF-α (citoquina asociada a la letalidad), interferón-gama (IFN-γ), interleuquina 12 (IL-12) e interleuquina 10 (IL-10) a través de un ensayo de inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA) (Figura 2).

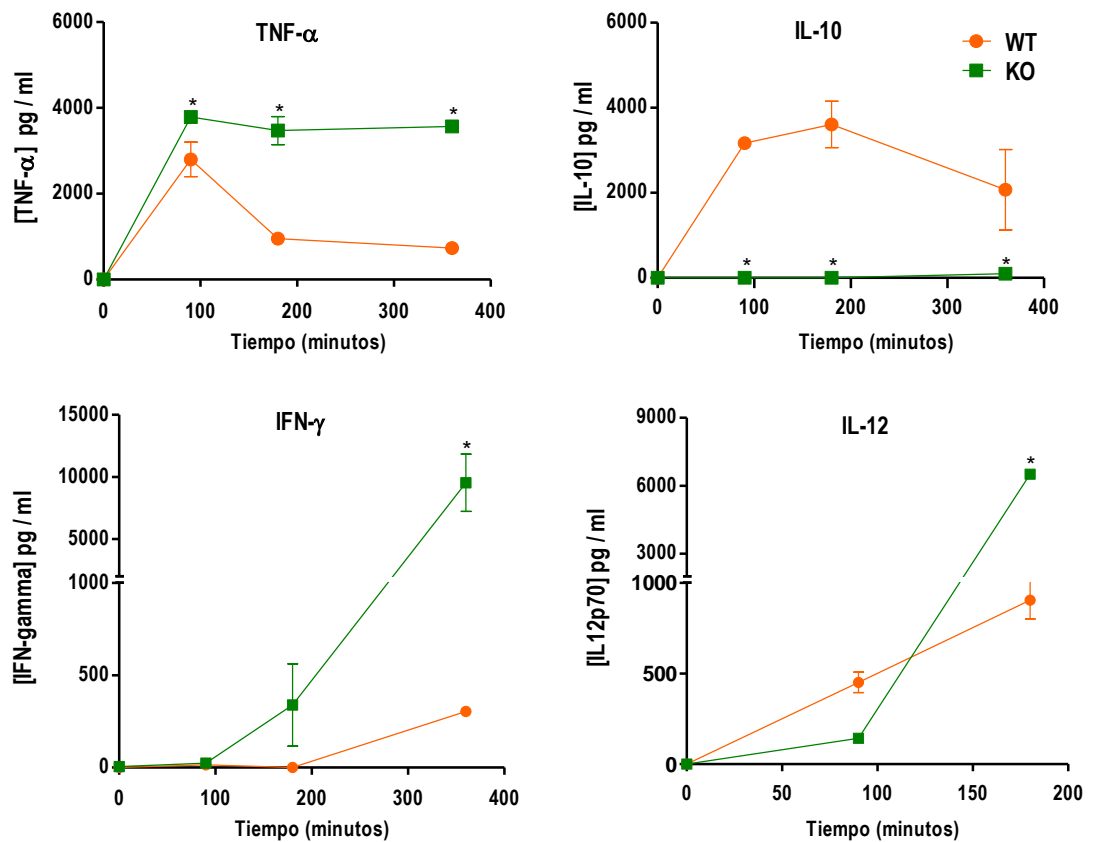


Figura 2. Ratones *wild type* (WT) y deficientes en IL-10 (IL-10 KO) fueron inoculados con una dosis de LPS (100 µg/ratón, vía i.p.) y en los tiempos indicados (0, 90, 180 y 360 minutos) el plasma fue colectado. Los niveles de las citoquinas fueron determinados por ELISA. Cada punto representa la media ± ES de la media de 4-6 ratones individuales por grupo. *p < 0.05 significativamente diferente del WT desafiado con LPS para el mismo tiempo.

Como se muestra en la Figura 2, los ratones IL-10 KO en relación con los WT, presentan niveles de producción de citoquinas pro-inflamatorias significativamente más elevados en respuesta al estímulo con LPS. Por otro lado, como era de esperarse, la cantidad de IL-10 medida por ELISA es nula, o despreciable, en los ratones IL-10 KO.

Un resultado llamativo se muestra en el caso puntual de la producción de TNF- α , primer mediador de la respuesta inflamatoria en cuadros de sepsis y shock séptico⁵³, donde observamos no sólo niveles exacerbados en ratones IL-10 KO sino que además dichos niveles se mantienen en el tiempo de manera sostenida por lo menos hasta 360 minutos (6 horas) luego del estímulo inflamatorio, mientras que en los WT hay un descenso muy significativo alrededor de los 200 minutos, efecto que perdura en el tiempo en que se realizó el experimento.

Es conocido que el TNF- α ejerce su acción a través de receptores de transmembrana específicos, TNF-R1 (p55) y TNF-R2 (p75), lo que lleva a la activación de las células inmunes y la liberación de una gran variedad de mediadores inmunorreguladores⁵⁴.

Por lo tanto, nos preguntamos si en un contexto basal de ambas cepas (WT e IL-10 KO) hay diferencias en la expresión de dichos receptores. Para esto, se midió la expresión de estos en la superficie de poblaciones celulares en sangre periférica de ambas cepas de ratones, a través de un ensayo de citometría de flujo, como se explica en Materiales y Métodos. Los resultados se muestran en la Figura 3.

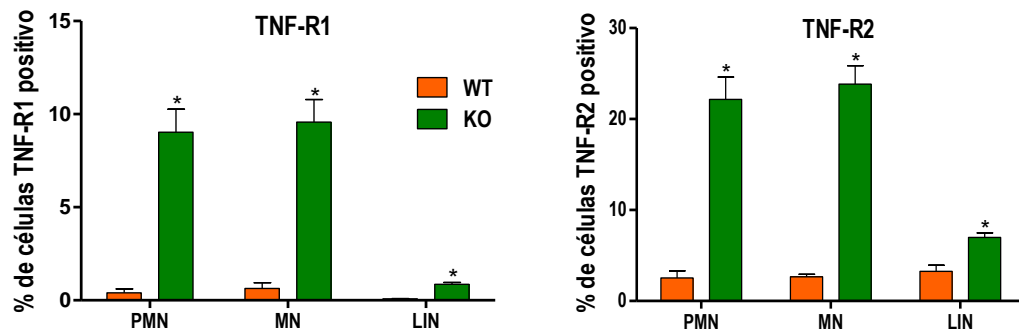


Figura 3. Determinación de receptores para TNF- α en sangre periférica de ratones *wild type* (WT) y deficientes en IL-10 (IL-10 KO) en condiciones basales. La expresión de los receptores de TNF- α (TNF-R1 y TNF-R2) fue determinada mediante citometría de flujo evaluando la expresión sobre diferentes poblaciones celulares definidas mediante regiones (*gates*) en función de la relación FSC vs SSC. Los resultados están expresados como la media \pm ES de la media de 4 ratones individuales por grupo. * $p < 0.005$ significativamente diferente del WT. (PMN: polimorfonucleares neutrófilos; MN: monocitos; LIN; linfocitos).

En la Figura 3 se observa un porcentaje significativamente mayor de células de tipo monocitos y polimorfonucleares neutrófilos, expresando ambos receptores de TNF- α (TNF-R1 y TNF-R2) en ratones IL-10 KO respecto a los WT. Esto mismo también se refleja en la población de linfocitos, aunque en valores menores.

4.3. NIVELES INCREMENTADOS DE CORTICOSTERONA EN PLASMA EN RATONES IL-10 KO.

Teniendo en cuenta la relevancia de los glucocorticoides (GC) en los cuadros sépticos, y para complementar los estudios que se están realizando en nuestro laboratorio, quisimos ver si había alguna relación entre la corticosterona (principal GC en ratones) y la IL-10. Por lo tanto, medimos los niveles de GC en plasma a nivel basal (tiempo cero) y a los 90 y 180 minutos post inoculación i.p. de LPS, siguiendo el esquema de inoculación y obtención de muestras de sangre previamente descrito en Figura 2. La concentración de corticosterona en plasma fue evaluada a través de un radioinmunoensayo (RIA) (Figura 4).

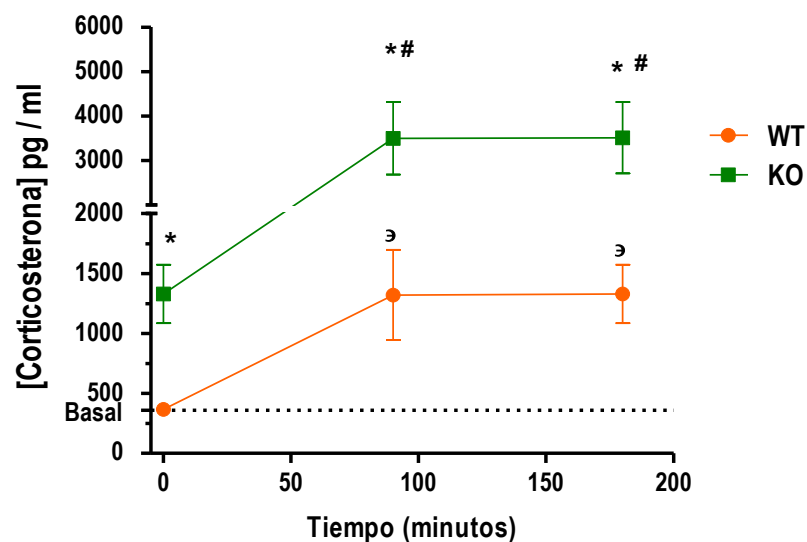


Figura 4. Ratones *wild type* (WT) y deficientes en IL-10 (KO) fueron inoculados con una dosis de LPS (100 µg/ratón, vía i.p.) y, a los tiempos indicados (0, 90 y 180 minutos) el

plasma fue colectado. Los niveles de corticosterona fueron determinados por RIA. Los resultados están expresados como la media \pm ES de la media de 3-4 ratones individuales por grupo. *p < 0.05 significativamente diferente del WT desafiado con LPS para el mismo tiempo; #p < 0.05 significativamente diferente del KO basal (tiempo 0); Δ p < 0.05 significativamente diferente del diferente del WT basal (tiempo 0).

Los resultados mostrados en la Figura 4 indican un muy alto nivel de corticosterona basal en los ratones IL-10 KO con respecto a los WT (aproximadamente 3 veces). Si bien estos valores se incrementan en ambas cepas de ratones luego del estímulo con LPS en los distintos tiempos evaluados, las diferencias (3x) esencialmente, se mantienen.

4.4. LA DEXAMETASONA EJERCE SU EFECTO PROTECTOR A UN SHOCK POR LPS EN RATONES IL-10 KO SÓLO A BAJAS DOSIS DE LA ENDOTOXINA

Teniendo en cuenta los resultados expresados hasta el momento y los obtenidos en nuestro laboratorio, los cuales muestran a los glucocorticoides como agentes centrales en la inhibición de la producción de TNF- α y en la refractariedad al LPS en ratones WT tolerantes³⁹, nos planteamos evaluar el efecto del tratamiento con dexametasona (DEXA, un glucocorticoide sintético) en ratones IL-10 KO, a fin de analizar si la ausencia de la IL-10

ejerce algún cambio en el efecto protector del tratamiento con DEXA frente a una dosis letal de LPS.

Para esto, ratones WT e IL-10 KO fueron inoculados con una dosis de DEXA (6.25 µg/ratón; i.p.) y luego de 20 minutos se desafiaron con una dosis letal de LPS (200 µg/ratón, i.p.). Se obtuvieron muestras de plasma a los 90 minutos post LPS para la determinación de los niveles de TNF-α mediante un ensayo de ELISA.

Los resultados obtenidos muestran que la dexametasona protege totalmente a los ratones WT de una dosis letal de LPS (2 LD₅₀), no siendo igual con los IL-10 KO. Utilizando dosis menores de LPS (50 y 5 µg/ratón) e iguales cantidades de DEXA (ver Tabla 2) se alcanzó finalmente un efecto refractario en ratones IL-10 KO con la dosis de 5µg/ratón de LPS. Además, se midieron los niveles de TNF-α en plasma a los 90 minutos post LPS como indicador del efecto anti-inflamatorio de los GC (ver Figura 5).

Tabla 2. Mortalidad en ratones WT y KO después de un desafío con LPS, tratados o no con dexametasona (DEXA, 6.25 µg/ratón, vía i.p.).

[LPS] µg/ratón	% mortalidad WT		% mortalidad IL-10 KO	
	LPS (n=4)	DEXA + LPS (n=4)	LPS (n=4)	DEXA + LPS (n=4)
200	100	0	100	100
50	0	0	100	100
5	0	0	75	0

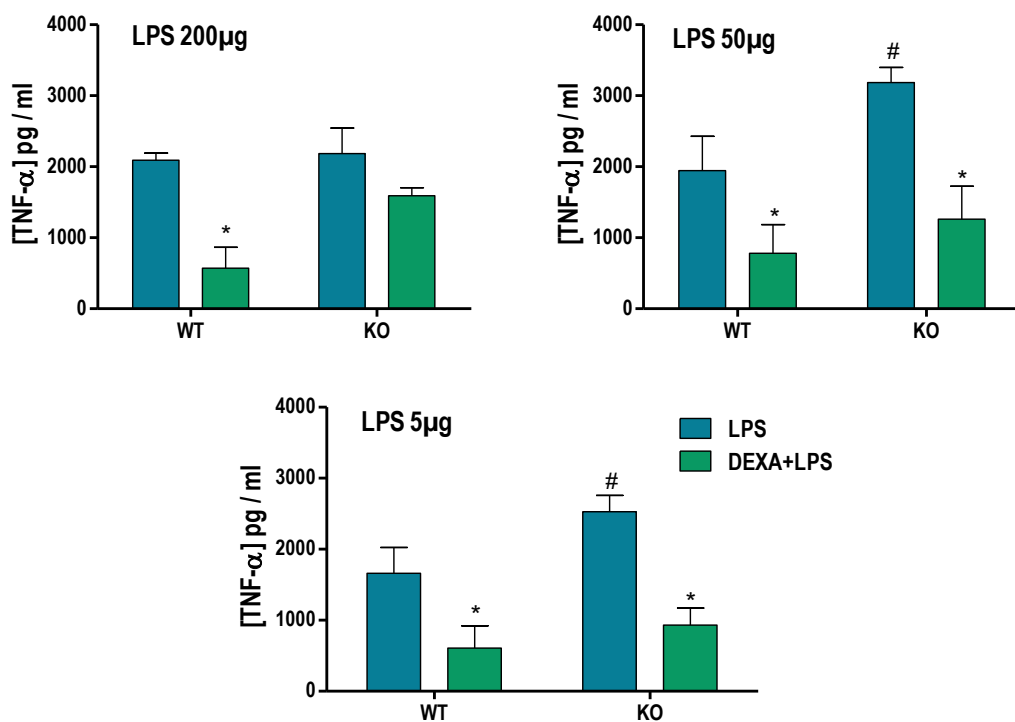


Figura 5. Ratones *wild type* (WT) y deficientes en IL-10 (KO) fueron inoculados con una dosis de LPS (200, 50 ó 5 µg/ratón, vía i.p.). La endotoxina fue inyectada 20 minutos después de la inoculación de dexametasona (DEXA, 6.25 µg/ratón, vía i.p.) (DEXA + LPS) o PBS (LPS). Todas las muestras de plasma fueron colectadas 90 minutos después de la dosis de LPS y se determinó el nivel de TNF-α por ELISA. La mortalidad fue evaluada hasta 48

horas después (ver tabla 2). Los resultados están expresados como la media \pm ES de la media de 4 ratones por grupo. *p < 0.05 significativamente diferente de su grupo control con PBS y LPS. #p < 0.05 significativamente diferente del grupo WT con PBS y LPS.

Los niveles de TNF- α de la figura 5 muestran un claro efecto anti-inflamatorio que ejercen los GC sobre los animales WT (tratados con DEXA), visto en la disminución significativa de dichos niveles en plasma. En los ratones IL-10 KO si bien se observan menores niveles de TNF- α frente al tratamiento con DEXA, la magnitud de dicha disminución es mucho menor a la observada en los WT. Recién frente a la dosis más baja de LPS utilizada se observa una disminución del TNF- α a niveles similares al grupo WT.

4.5. EL FENOMENO DE TOLERANCIA A ENDOTOXINA PUEDE ESTABLECERSE INCLUSO EN AUSENCIA DE IL-10.

Teniendo en cuenta que la IL-10 ha sido considerada como una citoquina anti-inflamatoria clave y responsable de los estados de tolerancia e inmunosupresión vistos en los cuadros sépticos, en los cuales se genera un estado de refractariedad a dosis letales de LPS; nos propusimos determinar si es posible establecer un estado de tolerancia a LPS en ausencia de IL-10. Para esto, ratones WT e IL-10 KO fueron sometidos a un esquema de inoculación vía i.p. que comienza con dosis bajas de LPS (0.25 μ g/ratón,

dosis que no induce mortalidad en los ratones IL-10 KO), aumentando de manera gradual y siendo administradas en días consecutivos.

En la Tabla 3 se muestran las dosis de LPS inoculadas durante 7 días, con las que se logró alcanzar un estado de tolerancia a endotoxina, en los ratones IL-10 KO.

Tabla 3. Esquema de inoculación de LPS para inducir un estado de tolerancia a endotoxina.

Día	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
[LPS] µg/ratón	0.25	0.25	0.5	0.5	1	1	5	5	---	---	10

Un estado de tolerancia a endotoxina se caracteriza, entre otras cosas, por una evidente disminución de citoquinas pro-inflamatorias, como observamos por ejemplo para el caso del TNF- α (ver Figura 1), citoquina clave asociada a este fenómeno. Por lo tanto, una reducción de sus niveles es un claro marcador del establecimiento del fenómeno de tolerancia. Es por esto que, luego de cada nueva dosis, se obtuvieron muestras de sangre 90 minutos post inoculación de LPS y se midieron los niveles de TNF- α en plasma por ELISA (Figura 6.A).

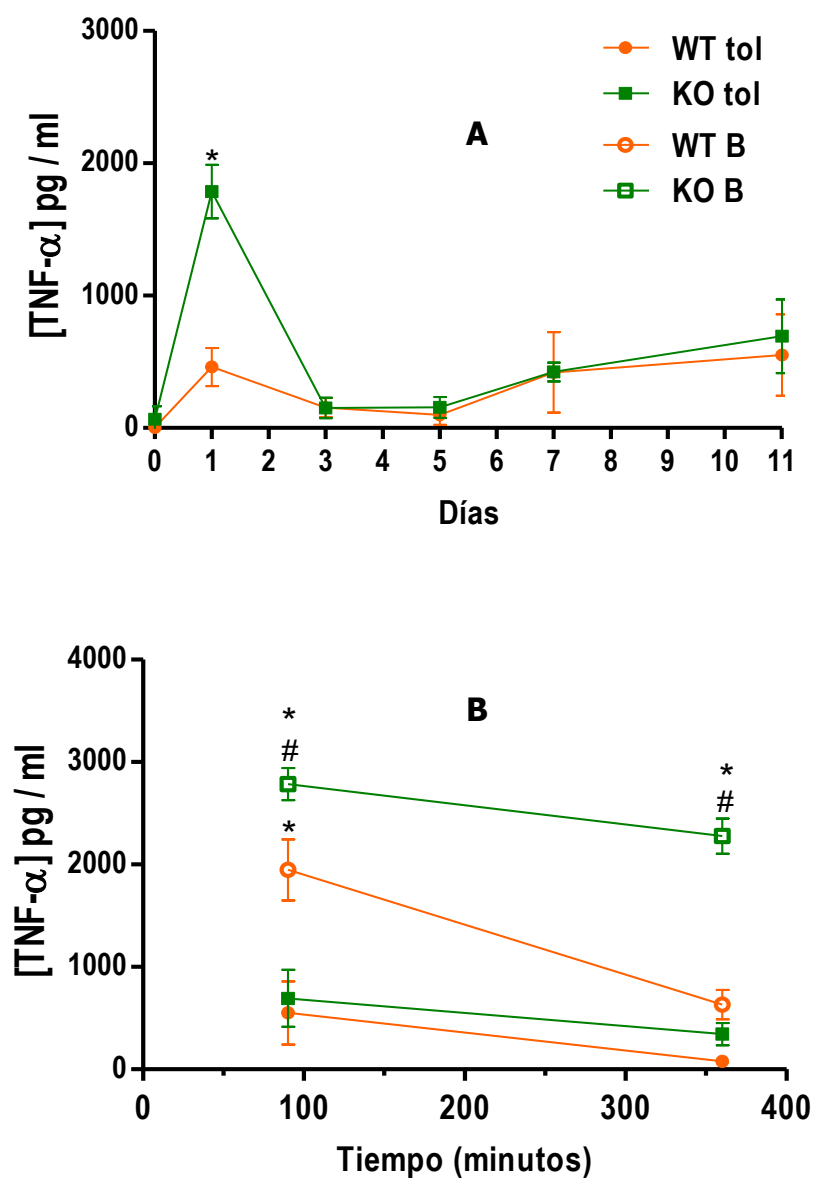


Figura 6. Ratones *wild type* tolerantes (WT tol) y tolerantes deficientes en IL-10 (KO tol) fueron tolerizados con diferentes dosis de LPS (vía i.p.) como se indica en el esquema de la Tabla 3. **A)** Las muestras de plasma fueron colectadas 90 minutos después de cada dosis de LPS a los 1, 3, 5, 7, y 11 días. **B)** Adicionalmente el día 11, ratones normales *wild type* (WT B) y deficientes en IL-10 (KO B) fueron desafiados con LPS 10µg/ratón (vía i.p.). Las muestras de plasma fueron colectadas a los 90 y 360 minutos post LPS. Los niveles de TNF-α fueron determinados por ELISA. Los resultados están expresados como la media ± ES de

la media de 3-4 ratones por grupo. *p < 0.05 significativamente diferente de los niveles del WT medidos en el mismo momento. #p < 0.05 significativamente diferente de los niveles del KO medidos en el mismo momento.

La disminución de los niveles de TNF- α vistos en los ratones IL-10 KO (KO tol), que a partir de la tercera dosis de LPS comienzan a ser no significativamente distintos de los ratones WT (WT tol), muestran que -aún en ausencia de IL-10- se puede lograr un estado de tolerancia a endotoxina (Figura 6.A). Para determinar el completo establecimiento y la fugacidad, o no, de dicha tolerancia, 48 horas después de la última dosis, los ratones fueron desafiados con una cantidad mayor de LPS (10 μ g/ratón), que en condiciones basales es letal para los deficientes en IL-10. Nuevamente se miden los niveles de TNF- α 90 y 360 minutos post LPS (figura 6.B).

Los resultados de la figura 6.B muestran que los ratones IL-10 KO tolerantes (KO tol) que recibieron las dosis consecutivas de LPS finalmente se tornan resistentes a una dosis que normalmente es letal para estos, lo cual se puede ver en el mantenimiento del TNF- α en niveles bajos, que pueden descender aún más 360 minutos posterior al estímulo con LPS (cosa que no sucede con los IL-10 KO basales). También se midió la mortalidad con esta última dosis y, como era de esperar, sólo los ratones IL-10 KO *naïve* tuvieron 100% de mortalidad 24 horas después de la inoculación de LPS (datos no mostrados).

4.6. EXACERBADOS NIVELES DE CORTICOSTERONA EN EL ESTABLECIMIENTO DEL ESTADO DE TOLERANCIA EN RATONES IL-10 KO

Los resultados mostrados hasta el momento nos sugieren una posible relación entre los GC y la IL-10, vista en mayores niveles de GC en plasma de ratones IL-10 KO en condiciones basales y frente a un estímulo con LPS, como así también el tratamiento con dexametasona logra un efecto refractario a un shock solamente a dosis muy bajas de LPS en ratones deficientes de IL-10.

En base a esto y teniendo en cuenta que en nuestro laboratorio se demostró previamente la participación sustancial de los GC en el mantenimiento del fenómeno de tolerancia, quisimos evaluar los niveles de dicha hormona durante el establecimiento de la tolerancia en ausencia de IL-10. Para ello, se repite el esquema mostrado en la Tabla 3 con ambas cepas de ratones y 180 minutos después se colectan muestras de plasma para medir los niveles de GC a través de un radioinmunoensayo -RIA- (Figura 7).

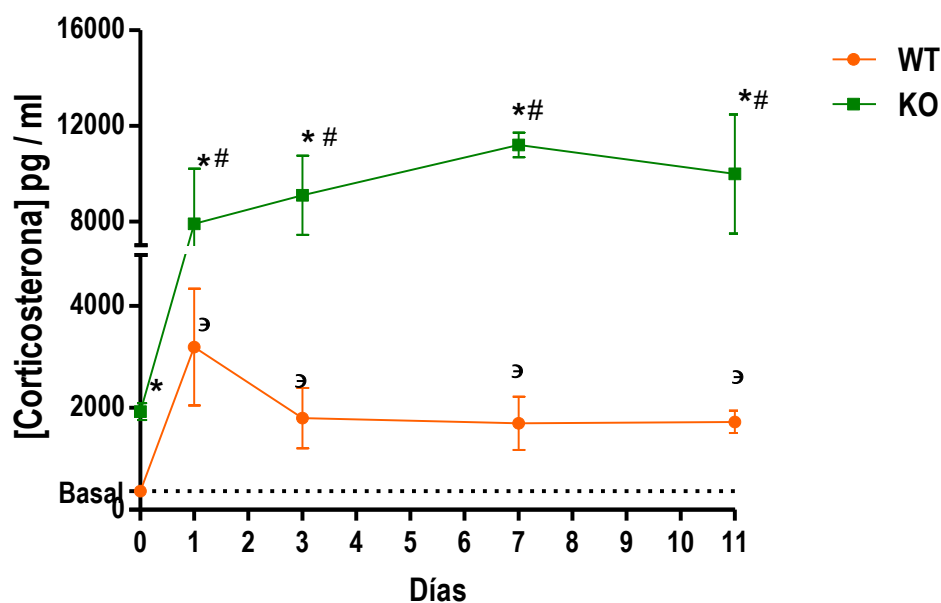


Figura 7. Ratones *wild type* (WT) y deficientes en IL-10 (KO) fueron tolerizados con diferentes dosis de LPS (vía i.p) como se indica en el esquema de la Tabla 3. Las muestras de plasma fueron colectadas 180 minutos después de cada dosis de LPS a los 1, 3, 7, y 11 días. Los niveles de corticosterona fueron determinados por RIA. Los resultados están expresados como la media \pm ES de la media de 3-4 ratones por grupo. * $p < 0.05$ significativamente diferente de los niveles del WT medidos en el mismo momento; # $p < 0.05$ significativamente diferente del KO basal (tiempo 0); $\epsilon p < 0.05$ significativamente diferente del diferente del WT basal (tiempo 0).

Por los datos expuestos en la Figura 7, se puede observar que el establecimiento de la tolerancia a LPS claramente va acompañada por un incremento en los niveles de GC en plasma, siendo en los ratones IL-10 KO, un aumento exacerbado significativamente mayor que en ratones WT. Nuevamente estos datos nos permiten inferir una conexión entre GC/IL-10.

4.7. RATONES IL-10 KO LLEGAN A NIVELES DE INMUNOSUPRESIÓN SIMILARES A LOS DE UN RATÓN WT EN UNA RESPUESTA INMUNE HUMORAL.

Una vez que se pudo comprobar la posibilidad de establecer el fenómeno de tolerancia a endotoxina en ausencia de IL-10 y sabiendo que su persistencia en el tiempo lleva a la inmunosupresión, quisimos llegar a este estado alargando el esquema de dosis consecutivas de LPS mostrado en la Tabla 3 (adaptando el esquema normalmente usado en los ratones WT, con el que se logra la inmunosupresión. Ver en Materiales y Métodos). Para determinar el establecimiento de la inmunosupresión es necesario desafiar con un antígeno y medir la respuesta inmune que este desencadena. Es por esto que, ratones WT e IL-10 KO fueron sometidos a un esquema de inoculación de LPS vía i.p. como el descrito en el apartado 3.4 de la sesión de Materiales y Métodos, seguido por la inmunización con glóbulos rojos de carnero (GRC, vía i.p.), como se muestra en la Figura 8.

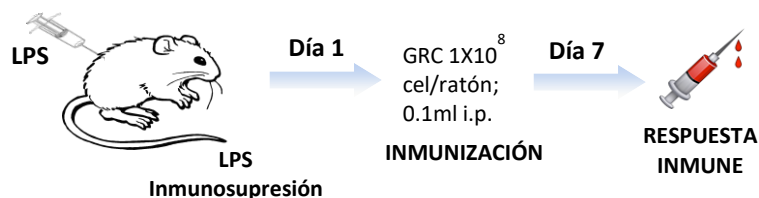


Figura 8. Esquema de inmunización. Las dosis de LPS administradas y las cantidades de las mismas, para alcanzar un estado de inmunosupresión, se encuentran descritas en el apartado 3.4 de Materiales y Métodos.

La sangre colectada el día 7 post inmunización (Figura 8) fue usada para determinar el título de anticuerpos anti-GRC en plasma de ambas cepas de ratones (WT e IL-10 KO), mediante un ensayo de hemaglutinación (ver Materiales y Métodos). Los resultados de la hemaglutinación se muestran en la Figura 9.

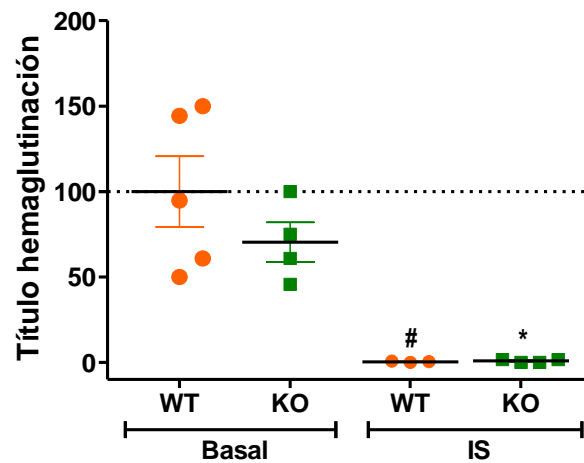


Figura 9. Ratones *wild type* (WT) y deficientes de IL-10 (KO) inmunosuprimidos o no, como se indica en Materiales y Métodos, fueron inmunizados con glóbulos rojos de carnero (GRC). Siete días después de la inmunización, se colectan muestras de plasmas y se evalúa la producción de anticuerpos a través de un ensayo de hemaglutinación. Los resultados están expresados como la media \pm ES de la media (título de hemaglutinación como porcentaje del control -WT-). Cada punto representa a un ratón individual. IS: ratón inmunosuprimido por LPS; Basal: ratones no inmunosuprimidos; # $p < 0.05$ versus basal WT; * $p < 0.05$ versus basal KO.

Los resultados de la hemaglutinación de la Figura 9 revelan que en ausencia de IL-10 no se encuentran diferencias significativas en el título de

anticuerpos tanto en un estado basal como en uno de inmunosupresión, mostrando cómo los ratones IL-10 KO pueden alcanzar un grado de inmunosupresión con una disminución en el título de anticuerpos similar a la que alcanzan los ratones WT.

4.8. MAYOR RESPUESTA INMUNE HUMORAL SECUNDARIA EN AUSENCIA DE IL-10.

Como es conocido, tanto el TNF- α como la IL-10 son prototipos de citoquinas pro y anti-inflamatorias muy importantes en la inducción y/o regulación de la respuesta inmune. Hasta este punto, los datos sugieren que esa participación de la IL-10 en la respuesta inmune parece no ser indispensable para el montaje de una respuesta primaria inmune humoral. Luego estudiamos si la ausencia de la IL-10 genera cambios en la respuesta inmune humoral frente a una segunda inmunización con glóbulos rojos de carnero (GRC), en ambas cepas (WT y KO). Con esta finalidad evaluamos la respuesta inmune secundaria, siguiendo el esquema mostrado en la Figura 10.

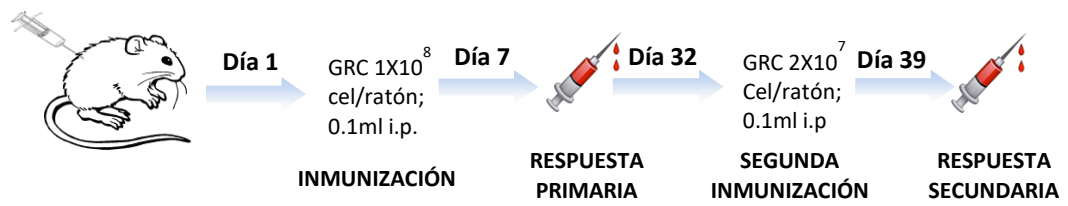


Figura 10. Esquema de inmunizaciones primaria y secundaria.

El plasma colectado en los tiempos post inmunización mostrados en la Figura 10 fue usado para medir la producción de anticuerpos anti-GRC en ambas cepas de ratones a través de ensayos de hemaglutinación, y citometría de flujo (descritos en Materiales y Métodos) para discriminar entre la producción de inmunoglobulinas M y G (IgM e IgG, respectivamente). Los resultados de la hemaglutinación se muestran en la Figura 11 y en la Tabla 4 se exhiben los resultados de citometría de flujo (producción de IgM para la respuesta primaria y producción de IgG para la respuesta secundaria).

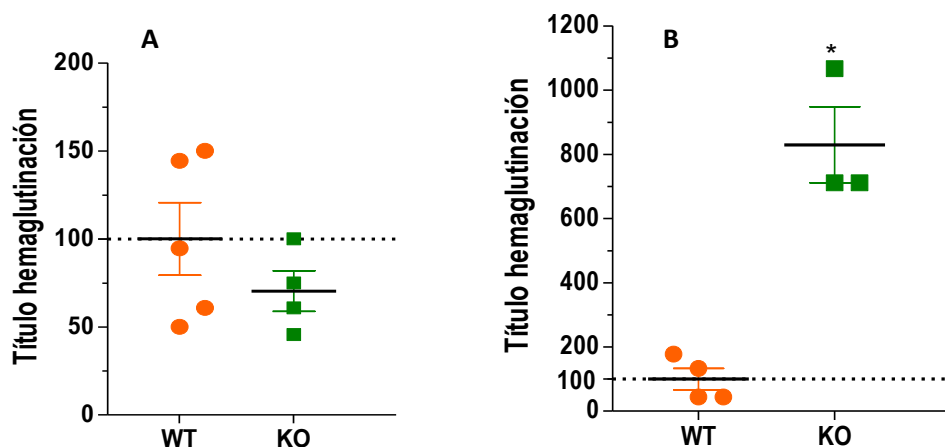


Figura 11. Ratones *wild type* (WT) y deficientes de IL-10 (KO) fueron inmunizados con glóbulos rojos de carnero (GRC). Siete días después del *booster*, se colectan muestras de

sangre y el título de anticuerpos anti-GRC en plasma es evaluado a través de un ensayo de hemaglutinación (ver figura 10). **A)** Respuesta inmune humoral primaria. **B)** Respuesta inmune humoral secundaria. Los resultados están expresados como la media \pm ES de la media, expresada como porcentaje del control (WT). Cada punto representa a un ratón individual. * $p < 0.05$ versus el WT.

Tabla 4. Producción de inmunoglobulinas en una respuesta inmune humoral.

(Dilución)⁻¹	MIF WT	MIF KO	MIF_{KO}/MIF_{WT}
Respuesta Primaria (IgM)			
80	83,70	64,19	0,77
Respuesta Secundaria (IgG)			
2000	19,58	56,38	2,88

Los resultados mostrados en la Figura 11 indican que mientras la respuesta inmune primaria a GRC en los animales IL-10 KO fue similar a la que se produjo en los ratones WT, la respuesta inmune secundaria es marcadamente diferente. Así, los animales IL-10 KO tienen una respuesta significativamente mayor que los WT, lo que se refleja claramente en un mayor título de anticuerpos anti-GRC en la hemaglutinación y que se confirma con una mayor cantidad de anticuerpos IgG por citometría de flujo (tabla 4).

5. DISCUSIÓN

Los procesos sépticos deben ser analizados como un estado bifásico con expresión concomitante de mediadores tanto pro como anti- inflamatorios. En la fase inicial o temprana, clínicamente hay un claro predominio de un estado pro-inflamatorio que, si no es superado a tiempo, puede desencadenar en un síndrome de disfunción multiorgánica (MODS), shock y muerte.

Sin embargo, si el organismo supera esa fase inicial pro-inflamatoria, la respuesta anti-inflamatoria compensatoria toma el protagonismo. En esta fase (etapa tardía o CARS), en el caso de infecciones por bacterias Gram negativas, se genera un estado de tolerancia a LPS que, si persiste en el tiempo, abre la puerta a una depresión inmune severa, que es la causa de las muertes que se producen en esta etapa debido a la incapacidad del organismo de erradicar la infección inicial, u otras oportunistas.

Para poder entender entonces las respuestas que se generan en todo el proceso que termina desencadenando la inmunosupresión inducida por LPS, hay que intentar entender primero cómo funciona cada fase, así como conocer los mediadores que prevalecen en cada una de ellas, y la sensibilidad a los mismos.

En la parte inicial de este trabajo evaluamos el primer encuentro del organismo con la endotoxina, analizando comparativamente la resistencia a distintas dosis de LPS entre los ratones WT e IL-10 KO. En un principio observamos que la falta de IL-10 torna al organismo mucho más sensible frente a una dosis de LPS, demostrando una sensibilidad de, por lo menos, 200 veces mayor que los WT. Esto claramente determina que la ausencia de la IL-10 deja desprotegido al organismo ante la acción del LPS.

Consistente con nuestros resultados, varios autores muestran que el tratamiento con anti-IL-10 previo a un proceso séptico disminuye la sobrevida de los ratones. Tal es el caso de Kalechman, et. al⁵⁵, utilizando AS101 - inhibidor transcripcional de la IL-10 - en un modelo de sepsis experimental (CLP; *cecal ligation puncture*) en ratones C57BL/6. Lo mismo observaron Berg, et al⁵⁶ utilizando ratones IL-10 KO y WT pretratados con anti-IL-10 sobre un modelo igual, y Nicoletti, et al⁵⁷ con anti-IL-10 previo una dosis de LPS en ratones BALB/c. En todos los casos observaron que esta mayor mortalidad se encuentra asociada a niveles más elevados de citoquinas pro-inflamatorias.

En nuestro trabajo también pudimos observar niveles exacerbados de las principales citoquinas inflamatorias asociadas a los cuadros sépticos en ratones IL-10 KO. Para el caso del TNF- α , citoquina clave de este proceso, observamos no solo una producción exacerbada sino, que además, los

niveles se mantienen sostenidos en el tiempo. Esto permite adjudicarle a la IL-10 un rol central en el control de la secreción de mediadores inflamatorios, por lo menos en las primeras fases de inducción (control del SIRS), ejerciendo un claro efecto anti-inflamatorio y regulador de la síntesis de TNF- α y otras citoquinas pro-inflamatorias.

Es sabido que el TNF- α es el primer mediador de la respuesta inflamatoria en la sepsis, siendo el agente causal principal del shock y muerte inducido por LPS. Dado que su actividad biológica depende de la expresión de los receptores de superficie p55 (TNF-R1) y p75 (TNF-R2), el porcentaje aumentado de células que expresan dichos receptores en ratones IL-10 KO, es un dato adicional muy importante que, aunque de forma indirecta, estaría indicando la influencia de la IL-10 en la regulación de los receptores para TNF- α (TNF-R). Esto permite interpretar que la mayor sensibilidad de los IL-10 KO a TNF- α no se debe sólo a la mayor cantidad de esa citoquina sino, además, al aumento de sus receptores a través de los cuales el TNF- α ejerce su acción.

Por otra parte, Leeuwenberg et al⁵⁸ y Joyce et al⁵⁹, demostraron en estudios *in vitro*, que la IL-10 regula negativamente la expresión de los TNF-R, mientras que incrementa la producción de los TNF-R solubles (inhibidores naturales del TNF- α). La integración de nuestros resultados con los obtenidos por otros autores nos permite comprender, en cierta medida, que la mayor

sensibilidad a la endotoxina observada en ratones IL-10 KO de debe a un mayor nivel de TNF- α en sangre, a un mayor número de receptores para TNF- α y, eventualmente, según Leeuwenberg et al⁵⁸ y Joyce et al⁵⁹, a una menor cantidad de receptores solubles que actuarían bloqueando el TNF- α circulante.

Algunos autores proponen posibles regulaciones y/o interacciones entre la IL-10 y los glucocorticoides (GC), dos moléculas anti-inflamatorias conectadas en la respuesta inmune e involucradas en los cuadros sépticos y cuyos modos de acción son, por el momento, no del todo comprendidos^{33,60}. Así, Marchant, et al⁶¹ demostraron que en respuesta al LPS, los GC inducen un aumento de los niveles de IL-10 en ensayos tanto *in vitro* como *in vivo*, usando Metilprednisolona, un GC sintético. Del mismo modo, Tom Van Der Poll, et al⁶⁰ observaron mayores niveles de IL-10 inducidos por GC, en estudios realizados en humanos que recibieron dosis de hidrocortisona y LPS. Por lo tanto, es ampliamente conocido el efecto inductor del LPS sobre los niveles de GC e IL-10, como así también la existencia de una regulación en sentido positivo del accionar de los GC sobre la síntesis e inducción de diversos mediadores anti-inflamatorios entre los cuales se encuentra la IL-10.

En línea con esto, si bien en nuestro trabajo observamos un incremento en los niveles de GC frente a un estímulo con LPS, nos encontramos llamativamente con niveles excesivamente elevados en los ratones IL-10 KO.

Esta observación podría sugerir un posible efecto de tipo compensatorio debido a la ausencia de la IL-10, mediador anti-inflamatorio eficaz y propicio para disminuir en eventos tempranos los niveles inducidos de TNF- α frente a un estímulo inflamatorio. Ahora bien, la observación de niveles elevados de dicha hormona también en condiciones basales, nos conduce a pensar en una posible regulación ejercida por la IL-10 sobre los niveles de GC basales e inducidos por estímulo. Estos datos concuerdan con los encontrados por Hughes, et al^{64,65} quienes observaron mayores niveles de GC en condiciones basales y durante un fenómeno de estrés en ratones IL-10 KO. En su modelo de estrés, tanto *in vivo* como *in vitro*, demostraron que la IL-10 regula la biosíntesis de los GC de una manera negativa, inhibiendo los efectos de la ACTH.

Sin embargo, un dato llamativo a considerar es que si bien presentan niveles exacerbados de GC frente a un estímulo inflamatorio, eso no sería suficiente para compensar la cascada pro-inflamatoria inducida en los IL-10 KO, pues dichos ratones presentan una sensibilidad aumentada frente a un estímulo con la endotoxina. Estas observaciones permiten sugerir que durante las etapas iniciales de un evento inflamatorio, la IL-10 participaría como uno de los reguladores centrales de la cascada pro-inflamatoria, asociada principalmente a la disminución de los niveles de TNF- α y a la modulación eficiente de la actividad biológica del mismo. En síntesis, los niveles elevados de GC en eventos inflamatorios tempranos estarían asociados a actuar como

un factor inductor de agentes anti-inflamatorios, como la IL-10, para contrarrestar la respuesta inflamatoria, más que como un modulador directo de la cascada inflamatoria.

Esta interpretación se ve reforzada con los datos obtenidos frente al tratamiento con dexametasona (DEXA), donde observamos que el efecto refractario frente a una dosis letal de LPS no se establece en ratones IL-10 KO, indicando nuevamente una posible necesidad de una acción conjunta entre GC e IL-10 para ejercer una acción anti-inflamatoria plena. Más aún, la observación de un efecto protector ejercido por la DEXA sólo a bajas concentraciones de LPS, contribuye a pensar que el efecto refractario ejercido por los GC dependería de la magnitud del estímulo inflamatorio. Dependiendo de ésta, los GC tendrían, por un lado, un accionar como anti-inflamatorio en el cual no requiera de la inducción de mediadores como es el caso de la IL-10, tal como observamos en el tratamiento con DEXA y bajas concentraciones de LPS en ratones IL-10 KO. Y por el otro, frente a una magnitud mayor del estímulo inflamatorio, el accionar de los GC requerirían de la inducción de otros factores anti-inflamatorios como, por ejemplo, la IL-10, la cual no sólo actúa inhibiendo la síntesis de citoquinas pro-inflamatorias, sino que también estimula la liberación del receptor antagonista de la IL-1 y de los receptores solubles de TNF- α ⁶¹. Todo esto en su conjunto contribuiría al accionar de los GC promoviendo el freno de una respuesta inflamatoria.

Por otro lado, si bien la IL-10 participa en los eventos tempranos del encuentro con la endotoxina atenuando la respuesta inflamatoria y resguardando al huésped del shock, en este trabajo se muestra que es posible establecer un estado de tolerancia a endotoxina aún en ausencia de la IL-10. Más aún, durante el establecimiento de dicho fenómeno observamos claramente un incremento exacerbado en los niveles de GC en ratones IL-10 KO respecto de los WT. Estos resultados indican la importancia de los mismos en dicha fase, un dato consistente con resultados previos de nuestro laboratorio -y de otros autores^{62,63}- donde dejamos de manifiesto la participación crucial de los GC tanto en el fenómeno de tolerancia como en la inmunosupresión inducida por LPS^{39,40,44}.

En función de los resultados obtenidos en este trabajo y considerando lo visto por otros autores, podemos considerar que la IL-10 participaría como un posible regulador de la síntesis y/o inducción de los GC tanto en un contexto fisiológico en condiciones basales como también en cuadros inflamatorios o de tolerancia/inmunosupresión. Por lo tanto, nuestros datos apoyarían la tesis de Hughes la cual sostiene la existencia de una regulación bidireccional entre ambas moléculas; por un lado, los GC ejercen sobre la IL-10 una regulación positiva, mientras que la IL-10 sobre los GC accionaría en sentido contrario^{64,65}.

A demás, en este trabajo demostramos que también es posible alcanzar un estado de inmunosupresión a nivel de la respuesta humoral primaria aún en ausencia de IL-10. Además, observamos que en condiciones basales la respuesta humoral primaria en un KO no difiere de la respuesta observada en los WT. Estos datos resultaron llamativos teniendo en cuenta que la IL-10 es una citoquina involucrada en los procesos de inmunosupresión⁵², siendo considerada por diversos autores un agente responsable de la depresión inmune vista en sepsis^{52,55}.

En función de lo anterior, lo esperado era encontrar en condiciones basales una respuesta exacerbada y una inmunosupresión más tenue en los ratones IL-10 KO. Sin embargo, los resultados indican que, al igual que en el fenómeno de tolerancia, la IL-10 no sería crucial para la inducción de la inmunosupresión por LPS. Además, de los resultados se desprende que dicha citoquina no presenta un efecto modulador a nivel de la respuesta humoral primaria en condiciones basales.

Por otra parte, la evaluación de la respuesta humoral secundaria mostró un exacerbado título de anticuerpos en ratones IL-10 KO. Esto estaría indicando que en este contexto la IL-10 actuaría como moduladora de la respuesta inmune secundaria, evitando una producción exacerbada de anticuerpos, más compatible con cuadros de enfermedades autoinmunes con respuestas descontroladas, que con una respuesta fisiológica finamente regulada⁶⁶. Así,

y en función de estos resultados un punto interesante a desarrollar en el futuro será evaluar el grado de inmunosupresión que puede establecerse a nivel de una respuesta secundaria, con el objetivo de identificar qué grado de participación presenta la IL-10 en la modulación de una respuesta secundaria en un contexto de depresión inmune.

El futuro inmediato de los tratamientos de los procesos sépticos, seguramente dependerá -en principio- de la dilucidación de los complejos mecanismos que regulan los eventos fisiopatológicos. En ese sentido, este trabajo relacionado a la influencia de la IL-10 sobre los mismos, es un intento de ampliar el conocimiento que, eventualmente, pueda ayudar a incorporar la implementación de procedimientos terapéuticos sobre bases más racionales.

6. CONCLUSIONES

Los ratones deficientes de interleuquina 10 (IL-10 KO) mostraron una sensibilidad aumentada a un desafío con el lipopolisacárido (LPS), la cual está reflejada en los niveles elevados y sostenidos en el tiempo de las diferentes citoquinas pro-inflamatorias, en particular, el TNF- α , la IL-12 y el IFN- γ . Dicha sensibilidad puede, en parte, deberse al mayor porcentaje de células en sangre que expresan ambos receptores para el TNF- α (TNF-R1 y TNF-R2), especialmente en monocitos y neutrófilos. Estos resultados indican que la IL-10 está implicada en los acontecimientos tempranos de encuentro con la endotoxina para prevenir una respuesta inflamatoria exacerbada y evitar de ese modo la muerte.

Sin embargo, una vez superado los efectos del TNF- α , incluso en ausencia de IL-10, se puede establecer un estado de tolerancia a LPS y de inmunosupresión similar a la observada en ratones *wild type* (WT). Por otro lado, dicha ausencia indujo una diferencia sustancial, exacerbando la respuesta inmune secundaria en condiciones basales.

Asimismo, se observó que el tratamiento con dexametasona (DEXA) induce una protección parcial en los ratones IL-10 KO, lo que sugiere que el efecto

refractario de la DEXA podría manifestarse plenamente sólo en presencia de IL-10.

El efecto parcial de la DEXA junto con el aumento en los niveles de corticosterona endógena tanto en estado basal, como inoculados con LPS en los ratones IL-10 KO claramente sugieren que la complementación entre GC e IL-10 son centrales en los mecanismos de inducción de la tolerancia y/o inmunosupresión inducida por LPS, así como en la regulación de la respuesta inmune humoral secundaria.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Hotchkiss, R. S., Coopersmith, C. M., McDunn, J. E. & Ferguson, T. a. The sepsis seesaw: tilting toward immunosuppression. *Nat. Med.* **15**, 496–497 (2009).
2. Hotchkiss, R. S., Monneret, G. & Payen, D. Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy. *Nat. Rev. Immunol.* **13**, 862–74 (2013).
3. Venet, F., Lukaszewicz, A.-C., Payen, D., Hotchkiss, R. & Monneret, G. Monitoring the immune response in sepsis: a rational approach to administration of immunoadjuvant therapies. *Curr. Opin. Immunol.* **25**, 477–83 (2013).
4. Adib-Conquy, M. & Cavaillon, J. M. Compensatory anti-inflammatory response syndrome. *Thromb. Haemost.* **101**, 36–47 (2009).
5. Otto, G. P. *et al.* The late phase of sepsis is characterized by an increased microbiological burden and death rate. *Crit. Care* **15**, R183 (2011).
6. Hotchkiss, R. S., Monneret, G. & Payen, D. Immunosuppression in sepsis: a novel understanding of the disorder and a new therapeutic approach. *Lancet Infect. Dis.* **13**, 260–68 (2013).
7. Baue, A. E., Durham, R. & Faist, E. Systemic inflammatory response syndrome (SIRS), multiple organ dysfunction syndrome (MODS), multiple organ failure (MOF): are we winning the battle? *Shock* **10**,

- 79–89 (1998).
8. Matsuda, N. & Hattori, Y. Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS): Molecular Pathophysiology and Gene Therapy. *J. Pharmacol. Sci. J Pharmacol Sci* **101**, 189–198 (2006).
 9. Bone, R. C. Sir Isaac Newton, sepsis, SIRS, and CARS. *Crit. Care Med.* **24**, 1125–8 (1996).
 10. Faist, E. in *Pathology of Septic Shock* **216**, 259–74 (Springer Berlin Heidelberg, 1996).
 11. Deitch, E. A. Multiple organ failure: pathophysiology and potential future therapy. *Ann. Surg* **216**, 117–134 (1992).
 12. Ayala, A., Perrin, M. M., Wang, P., Ertel, W. & Chaudry, I. H. Hemorrhage induces enhanced Kupffer cell cytotoxicity while decreasing peritoneal or splenic macrophage capacity. Involvement of cell-associated tumor necrosis factor and reactive nitrogen. *J. Immunol.* **147**, 4147–54 (1991).
 13. Napolitano, L. M., Faist, E., Wichmann, M. W. & Coimbra, R. IMMUNE DYSFUNCTION IN TRAUMA. *Surg. Clin. North Am.* **79**, 1385–1416 (1999).
 14. Prevention, C. for D. C. and. Data Reports. (2008). Available at: <http://www.cdc.gov/sepsis/datareports/index.html>. (Accessed: 31st May 2016)
 15. Vincent, J.-L. *et al.* Sepsis in European intensive care units: results of the SOAP study. *Crit. Care Med.* **34**, 344–53 (2006).

16. Nueva, L. Un riesgo que puede terminar en la muerte. (2005). Available at: <http://www.lanueva.com/deportes-impresa/661058/-un-riesgo-que-puede-terminar-en-la-muerte-.html>. (Accessed: 31st May 2016)
17. Capital, L. La sepsis mata 50 argentinos por día. (2005). Available at: http://archivo.lacapital.com.ar/2005/09/21/salud/noticia_231345.shtml. (Accessed: 31st May 2016)
18. Deans, K. J., Haley, M., Natanson, C., Eichacker, P. Q. & Minneci, P. C. Novel therapies for sepsis: a review. *J. Trauma* **58**, 867–74 (2005).
19. Riedemann, N. C., Guo, R.-F. & Ward, P. A. Novel strategies for the treatment of sepsis. *Nat. Med.* **9**, 517–24 (2003).
20. Liu, C. *et al.* Changes in intestinal mucosal immune barrier in rats with endotoxemia. *World J. Gastroenterol.* **15**, 5843–50 (2009).
21. Benjamim, C. F., Lundy, S. K., Lukacs, N. W., Hogaboam, C. M. & Kunkel, S. L. Reversal of long-term sepsis-induced immunosuppression by dendritic cells. *Blood* **105**, 3588–95 (2005).
22. Fumeaux, T., Pugin, J., Fumeaux, T. & Pugin, J. Is the measurement of monocytes HLA-DR expression useful in patients with sepsis? *Intensive Care Med* **32**, 1106–1108 (2006).
23. Cobb, P. *et al.* Macrophages, in Patients with Sepsis Depletion of Dendritic Cells, But Not Depletion of Dendritic Cells, But Not Macrophages, in Patients with Sepsis. *J Immunol Ref.* **168**, 2493–2500 (2002).

24. Hotchkiss, R. S. *et al.* Lymphocytes in Humans T + Profound Depletion of B and CD4 Sepsis-Induced Apoptosis Causes Progressive Sepsis-Induced Apoptosis Causes Progressive Profound Depletion of B and CD4 $\%$ T Lymphocytes in Humans. *J. Immunol.* **166**, 6952–6963 (2001).
25. Kaufmann, I. *et al.* Polymorphonuclear leukocyte dysfunction syndrome in patients with increasing sepsis severity. *Shock* **26**, 254–61 (2006).
26. Cavillon, J.-M. & Adib-Conquy, M. Bench-to-bedside review: Endotoxin tolerance as a model of leukocyte reprogramming in sepsis. *Crit. Care* **233**, (2006).
27. Cavillon, J.-M., Adrie, C., Fitting, C. & Adib-Conquy, M. Endotoxin tolerance: is there a clinical relevance? *J. Endotoxin Res.* **9**, 101–7 (2003).
28. Heagy, W. *et al.* Lower levels of whole blood LPS-stimulated cytokine release are associated with poorer clinical outcomes in surgical ICU patients. *Surg. Infect. (Larchmt)*. **4**, 171–80 (2003).
29. West, M. & Heagy, W. Endotoxin tolerance: A review. *Crit. Care Med.* **30**, S64–S73 (2002).
30. Biswas, S. K. & Lopez-Collazo, E. Endotoxin tolerance: new mechanisms, molecules and clinical significance. *Trends Immunol.* **30**, 475–87 (2009).
31. Ikeda, T., Yang, L., Ikenoue, T., Mallard, C. & Hagberg, H. Endotoxin-Induced Hypoxic-Ischemic Tolerance Is Mediated by Up-regulation of

- Corticosterone in Neonatal Rat. *Pediatr Res* **59**, 56–60 (2006).
32. Randow, F. *et al.* Mechanism of Endotoxin Desensitization: Involvement of Interleukin 10 and Transforming Growth Factor Beta. *J. Exp. Med.* **181**, 1887–92 (1995).
 33. Allary, J. & Annane, D. Glucocorticoids and sepsis. *MINERVA ANESTESIOLOG* **71**, 759–68 (2005).
 34. Japiassú, A. M., Salluh, J. I., Bozza, P. T., Bozza, F. A. & Castro-Faria-Neto, H. C. Revisiting steroid treatment for septic shock: molecular actions and clinical effects -A review. *Mem Inst Oswaldo Cruz Rio Janeiro* **104**, 531–548 (2009).
 35. Annane, D. *et al.* Corticosteroids in the Treatment of Severe Sepsis and Septic Shock in Adults. *JAMA* **301**, 2362–2375 (2009).
 36. Christ-Crain, M. *et al.* Free and Total Cortisol Levels as Predictors of Severity and Outcome in Community-acquired Pneumonia. *Am. J. Crit. Care Med.* **176**, 913–20 (2007).
 37. Le Tulzo, Y. *et al.* Monocyte Human Leukocyte Antigen-DR Transcriptional Downregulation by Cortisol during Septic Shock. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **169**, 1144–51 (2004).
 38. Mesotten, D., Vanhorebeek, I. & Van Den Berghe, G. The altered adrenal axis and treatment with glucocorticoids during critical illness. *Nat. Clin. Pract. Endocrinol. Metab.* **4**, 496–505 (2008).
 39. Rearte, B., Landoni, V., Laborde, E., Fernández, G. & Isturiz, M. Differential effects of glucocorticoids in the establishment and

- maintenance of endotoxin tolerance. *Clin. Exp. Immunol.* **159**, 208–216 (2010).
40. Rearte, B. *et al.* Mifepristone (RU486) restores humoral and T cell-mediated immune response in endotoxin immunosuppressed mice. *Clin. Exp. Immunol.* **162**, 568–577 (2010).
 41. Szabo, C., Thiernemann, C., Wu, C.-C., Perretti, M. & Vane, J. R. Attenuation of the induction of nitric oxide synthase by endogenous glucocorticoids accounts for endotoxin tolerance in vivo. **91**, 271–275 (1994).
 42. Oberbeck, R. & Kobbe, P. Dehydroepiandrosterone (DHEA): a steroid with multiple effects. Is there any possible option in the treatment of critical illness? *Curr. Med. Chem.* **17**, 1039–47 (2010).
 43. Shalet, S. & Mukherjee, A. Pharmacological treatment of hypercortisolism. *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes. Obes.* **15**, 234–8 (2008).
 44. Rearte, B. *et al.* Dehydroepiandrosterone and metyrapone partially restore the adaptive humoral and cellular immune response in endotoxin immunosuppressed mice. *Innate Immun.* **20**, 585–597 (2013).
 45. Ayala, A. *et al.* Role of interleukin 6 and transforming growth factor-beta in the induction of depressed splenocyte responses following sepsis. *Arch. Surg.* **128**, 89–94 (1993).
 46. Chen, W., Frank, M. E., Jin, W. & Wahl, S. M. TGF- β Released by

- Apoptotic T Cells Contributes to an Immunosuppressive Milieu. *Immunity* **14**, 715–725 (2001).
47. Choudhry, M. A., Ahmad, S., Ahmed, Z. & Sayeed, M. M. *Prostaglandin E2 down-regulation of T cell IL-2 production is independent of IL-10 during gram-negative sepsis. Immunology Letters* **67**, (1999).
 48. Salicrú, A. N., Sams, C. F. & Marshall, G. D. Cooperative effects of corticosteroids and catecholamines upon immune deviation of the type-1/type-2 cytokine balance in favor of type-2 expression in human peripheral blood mononuclear cells. *Brain. Behav. Immun.* **21**, 913–920 (2007).
 49. Delano, M. J. *et al.* MyD88-dependent expansion of an immature GR-1+CD11b+ population induces T cell suppression and Th2 polarization in sepsis. *JEM* **204**, 1463–1474 (2007).
 50. Wisnoski, N., Chung, C.-S., Chen, Y., Huang, X. & Ayala, A. The Contribution of CD4 + CD25 + T-Regulatory-Cells to Immune Suppression in Sepsis. *Shock* **27**, 251–257 (2007).
 51. Monneret, G., Venet, F., Pachot, A. & Lepape, A. Monitoring Immune Dysfunctions in the Septic Patient: A New Skin for the Old Ceremony Guillaume. *Mol. Med.* **14**, 64–78 (2008).
 52. Muenzer, J. T. *et al.* Characterization and modulation of the immunosuppressive phase of sepsis. *Infect. Immun.* **78**, 1582–1592 (2010).
 53. Spooner, C. E., Markowitz, N. P. & Saravolatz, L. D. The role of tumor

- necrosis factor in sepsis. *Clin. Immunol. Immunopathol.* **62**, S11-7 (1992).
54. Schulte, W. *et al.* Cytokines in sepsis: potent immunoregulators and potential therapeutic targets--an updated view. *Mediators Inflamm.* **2013**, 165974 (2013).
55. Kalechman, Y. *et al.* Anti-IL-10 therapeutic strategy using the immunomodulator AS101 in protecting mice from sepsis-induced death: dependence on timing of immunomodulating intervention. *J. Immunol.* **169**, 384–392 (2002).
56. Berg, D. J. *et al.* Interleukin-10 is a central regulator of the response to LPS in murine models of endotoxic shock and the Shwartzman reaction but not endotoxin tolerance. *J. Clin. Invest.* **96**, 2339–2347 (1995).
57. Nicoletti, F. *et al.* Endotoxin-induced lethality in neonatal mice is counteracted by interleukin-10 (IL-10) and exacerbated by anti-IL10. *Clin. Diagnostic Lab. Immunol.* **4**, 607–10 (1997).
58. Leeuwenberg, J. F., Jeunhomme, T. M. & Buurman, W. A. Slow release of soluble TNF receptors by monocytes in vitro. *J. Immunol.* **152**, 4036–43 (1994).
59. Joyce, D. A. *et al.* Two inhibitors of pro-inflammatory cytokine release, interleukin-10 and interleukin-4, have contrasting effects on release of soluble p75 tumor necrosis factor receptor by cultured monocytes. *Eur. J. Immunol.* **24**, 2699–2705 (1994).
60. Van Der Poll, T., Barber, A. E., Coyle, S. M. & Lowry, S. F.

Hypercortisolemia Increases Plasma Interleukin-10 Concentrations during Human Endotoxemia - A Clinical Research Center Study. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **81**, 3604–3606 (1996).

61. Marchant, a *et al.* Methylprednisolone differentially regulates IL-10 and tumour necrosis factor (TNF) production during murine endotoxaemia. *Clin. Exp. Immunol.* **106**, 91–96 (1996).
62. Coutinho, A. E. & Chapman, K. E. The anti-inflammatory and immunosuppressive effects of glucocorticoids, recent developments and mechanistic insights. *Mol. Cell. Endocrinol.* **335**, 2–13 (2011).
63. Evans, G. F. & Zuckerman, S. H. Glucocorticoid-dependent and -independent mechanisms involved in lipopolysaccharide tolerance. *Eur. J. Immunol.* **21**, 1973–9 (1991).
64. Koldzic-Zivanovic, N. *et al.* Regulation of adrenal glucocorticoid synthesis by interleukin-10: A preponderance of IL-10 receptor in the adrenal zona fasciculata. *Brain. Behav. Immun.* **20**, 460–468 (2006).
65. Smith, E. M., Cadet, P., Stefano, G. B., Opp, M. R. & Hughes, T. K. IL-10 as a mediator in the HPA axis and brain. *J. Neuroimmunol.* **100**, 140–8 (1999).
66. Asadullah, K., Sterry, W. & Volk, H. D. Interleukin-10 Therapy — Review of a New Approach. *Med. Immunol.* **55**, 241–269 (2003).