Biblioteca Digital
F C E N - U B A

BIBLIOTECA CENTRAL LUIS F LELOIR
BIBLIOTECA CENTRAL LELOIR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES UBA

Tesis Doctoral

Estrategias para revertir la inmunosupresión en el fenómeno de tolerancia a endotoxinas

Rearte, María Bárbara

2011

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:
Rearte, María Bárbara. (2011). Estrategias para revertir la inmunosupresión en el fenómeno de tolerancia a endotoxinas. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:
Rearte, María Bárbara. "Estrategias para revertir la inmunosupresión en el fenómeno de tolerancia a endotoxinas". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2011.

EXACTAS UBA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

UBA
Universidad de Buenos Aires

Dirección: Biblioteca Central Dr. Luis F. Leloir, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Intendente Güiraldes 2160 - C1428EGA - Tel. (++54 +11) 4789-9293

Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

"ESTRATEGIAS PARA REVERTIR LA INMUNOSUPRESIÓN EN EL FENÓMENO DE TOLERANCIA A ENDOTOXINAS"

Tesis presentada para optar al título de
Doctor de la Universidad de Buenos Aires
en el área: CIENCIAS BIOLÓGICAS

Autora: **Lic. María Bárbara Rearte**

Director de Tesis: Dr. Martín A. Isturiz
Consejero de Estudios: Dr. Enrique Rodríguez

Sección Inmunología
Instituto de Investigaciones Hematológicas (IIHEMA)
Instituto de Leucemia Experimental (ILEX-CONICET)
Academia Nacional de Medicina

Buenos Aires, 2011

Estrategias para revertir la inmunosupresión en el fenómeno de tolerancia a endotoxinas

Resumen

Los fenómenos de sepsis y shock séptico pueden ser causados por bacterias Gram-positivas y negativas como también por otros microorganismos. En el caso de las bacterias Gram-negativas, las endotoxinas, componentes normales de la pared bacteriana, también conocidas como lipopolisacáridos (LPS), han sido consideradas como uno de los principales agentes causales de los efectos indeseables de estas enfermedades. La respuesta a LPS implica, en principio, la generación de un estado inflamatorio, caracterizado por la rápida secreción de citoquinas proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral (TNF)-α, interleuquina (IL) -1, IL-6, e interferón (IFN)-γ, seguido por un estado anti-inflamatorio en donde predominan mediadores como la IL-10, el factor de transformación del crecimiento-β (TGF)-β o glucocorticoides (GC), los cuales conducen al huésped a un estado de refractariedad temporal frente a una nueva exposición al LPS, un proceso conocido como tolerancia a LPS o tolerancia a endotoxina. Si bien se ha considerado como un mecanismo de protección frente al desarrollo de una sepsis o una inflamación sistémica, la tolerancia a endotoxina ha sido también señalada como una de las causas principales de la inmunosupresión inespecífica tanto humoral como celular descrita en dichos pacientes.

En este trabajo demostramos, mediante un modelo murino, que si bien el mantenimiento de la tolerancia depende de los GC, el establecimiento del fenómeno puede ser inhibido por un GC sintético como la dexametasona (Dex). Por el contrario, demostramos que el mifepristone (RU486), un conocido antagonista de receptores para GC, fue capaz de inducir una desarticulación transitoria y reversible de la tolerancia a endotoxina, permitiendo también una restauración parcial de tanto la respuesta inmune adaptativa humoral como celular en ratones inmunosuprimidos inducido por LPS, sugiriendo el involucramiento de los GC endógenos en este fenómeno.

Por otro lado, mediante el uso de ciclofosfamida y gemcitabina, demostramos que las células supresoras GR-1^{+}/CD11b^{+} y las células T regulatorias CD4^{+}CD25^{+}FoxP3^{+} no juegan un rol principal ni en el establecimiento ni en el mantenimiento de la tolerancia a endotoxina, un mecanismo central en la inducción de un estado de inmunosupresión.

Estos resultados permiten considerar una nueva perspectiva para el manejo de la inmunosupresión en sepsis y en shock no infecciosos y merecen de mayores estudios e investigaciones en el futuro.

Palabras claves: tolerancia a endotoxina; dexametasona; glucocorticoides; inmunosupresión; RU486

Summary

Sepsis and septic shock can be caused by Gram-positive and -negative bacteria and other microorganisms. In the case of Gram-negative bacteria, endotoxin, a normal constituent of the bacterial wall, also known as lipopolysaccharide (LPS), has been considered as one of the principal agents causing the undesirable effects in this critical illness. The response to LPS involves a rapid secretion of proinflammatory cytokines such as tumour necrosis factor (TNF)-a, interleukin (IL)-1, IL-6, interferon (IFN)-g and the concomitant induction of anti-inflammatory mediators such as IL-10, transforming growth factor (TGF)-b or glucocorticoids (GC), which render the host temporarily refractory to subsequent lethal doses of LPS challenge in a process known as LPS or endotoxin tolerance. Although protective from the development of sepsis or systemic inflammation, endotoxin tolerance has also been pointed out as the main cause of the non-specific humoral and cellular immunosuppression described in these patients.

In this report we demonstrate, using a mouse model, that while the maintenance of tolerance is dependent upon GC, the establishment of tolerance by LPS could be inhibited by dexamethasone (Dex), a synthetic GC. Conversely, we demonstrated that mifepristone (RU486), a known GC receptor antagonist, was capable of inducing a transient and reversible disruption of endotoxin tolerance, also permitting partial restoration of both adaptive humoral and cellular immune response in LPS immunosuppressed mice, suggesting the involvement of endogenous GC in this phenomenon.

On the other hand, using cyclophosphamide and gemcitabine, we demonstrated that regulatory/suppressor CD4+CD25+FoxP3+ and GR-1+CD11b+ cells do not play a major role in the establishment or the maintenance of endotoxin tolerance, a central mechanism for inducing an immunosuppression state.

These results are encouraging for the management of immunosuppression in sepsis and/or noninfectious shock, and deserve further investigation in the future.

Keywords: Endotoxin tolerance; dexamethasone; glucocorticoids; immunosuppression; RU486.

Agradecimientos

En primer lugar, le agradezco a Fer, Vicente y Maite por todas la que pasaron y por estar siempre a mi lado.

A mis viejos Julio y Rosario por haberme apoyado siempre en lo que quise. A mis hermanos por estar conmigo.

A mis amigos del alma porque siempre entendieron, gracias.

A Martín, por haberme enseñado tanto, por haberme bancado siempre y por haberlo conocido.

A mis compañeros de Inmuno I, Carmen, Kao, Lau, Lu, Merceditas, Mercedes, Connie, Pablo, Gaby, Paula, Vero, Evi, Juan, por la ayuda, por los momentos lindos y feos que vivimos. A Mabel y Evelia porque son las que más laburan.

A mis compañeros del ILEX, por haber estado siempre dispuestos para dar una mano. Gracias a Raúl, Tito, Gaby y Juancito y muy especialmetne a Andikiú porque sin ella la historia hubiera sido otra.

Al resto de mis compañeros de la Academia por su buena predisposición en todo: las chicas de Marina Palermo, las chicas de citometría, la gente de Viro de Química y la de InmunoOnco, en especial a Moni.

Las siguientes Instituciones aportaron los fondos, las becas, el espacio físico y el equipamiento necesario para la ejecución del trabajo: Instituto de Leucemia Experimental (ILEX)-CONICET e IIHema de la Academia Nacional de Medicina de Buenos Aires, CONICET, Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica, Fundación A. Roemmers. A sus miembros y autoridades, muchas gracias.

A Fer y a mis hijos,

Vicente y Maite.

1.- INDICE

Resumen……i

Summary……ii

Agradecimientos……iii

Dedicatoria……iv

1. INDICE……v

2.- INTRODUCCIÓN GENERAL Y OBJETIVOS……1

3.- INTRODUCCIÓN……7

3.1- Respuesta inflamatoria sistémica (SIRS) y sepsis……8

3.1.1 Características generales……8

3.1.2 Exacerbada producción de citoquinas proinflamatorias……8

3.1.3 Respuesta compensatoria CARS……10

3.1.4 Sepsis: cambio de perspectiva……11

3.1.5 Inmunosupresión en sepsis……13

3.1.5.a Mecanismos: Alteraciones fenotípicas y funcionales……13

3.1.5.b Mediadores asociados a la inmunosupresión: Agentes solubles y poblaciones celulares……14

3.2.- Tolerancia a endotoxina……16

3.2.1 Consideraciones Generales……16

3.2.2 Breve reseña histórica……17

3.2.3 Lipopolisacáridos (LPS)……18

3.2.4 Mecanismos de la tolerancia a endotoxina……19

3.2.4.a Vías de señalización extracelular……19

3.2.4.a.i Citoquinas y quimioquinas……19

3.2.4.a.ii Desensibilización mediada por agentes en plasma……20

3.2.4.a.iii Células inmaduras supresoras de origen mieloide GR-1+/CD11b+……22

3.2.4.a.iv Células T regulatorias CD4+CD25+Foxp3+……22

3.2.4.a.v Receptores de LPS……22

3.2.4.b Vías de señalización intracelular……23

3.2.4.b.i Mediadores de señalización asociados a los TLR……23

3.2.4.b.ii Reguladores negativos de la señalización intracelular……24

3.2.4.b.iii Inhibición del factor de transcripción NF-κB……25

3.2.5 Fenómenos de tolerancia cruzada……27

3.2.6 Reversión del fenómeno de tolerancia……28

3.2.7 Implicancias clínicas……29

3.2.7.a Tolerancia a endotoxina y procesos infecciosos……29

3.2.7.b Asociación con la inmunosupresión inducida en sepsis……30

3.2.7.c Fenómeno de tolerancia en diversas patologías:
¿Paradigma de la inmunosupresión?.....31
3.3.- Glucocorticoides……32
3.3.1 Características Generales……32
3.3.2 Mecanismos moleculares de la acción de los glucocorticoides……32
3.3.2.a Acción genómica clásica de los glucocorticoides……..……..32
3.3.2.b Acciones no-genómicas de los glucocorticoides……34
3.3.2.b.i Interacciones no específicas de glucocorticoides con membranas celulares…34
3.3.2.b.ii Efectos no-genómicos mediados por el GR citosólico……..……..34
3.3.2.b.iii Interacciones específicas con receptores de membrana (mGR)……..……..35
3.3.3 Efectos de los GC sobre la respuesta inmune……...35
3.3.4 Relevancia de los glucocorticoides en los procesos de sepsis……...38
3.3.5 Rol de los glucocorticoides en el fenómeno de tolerancia a endotoxina……...40

4.- MATERIALES Y MÉTODOS……...42
4.1 Reactivos: Estímulos, hormonas e inhibidores y drogas……43
4.2 Citoquinas, anticuerpos y productos relacionados……...43
4.3 Anticuerpos para citometría de flujo……43
4.4 Solución fisiológica……..44
4.5 Solución Buffer Fosfato (PBS)……44
4.6 Solución de Türk para el recuento de células……44
4.7 Solución de azul Tripán……44
4.8 Medio de cultivo completo……44
4.9 Buffer de lisis de eritrocitos……..45
4.10 Animales……45
4.11 Modelos de tolerancia a endotoxina……45
4.12 Estudios de letalidad……45
4.13 Macrófagos peritoneales de ratón estimulados con tioglicolato……45
4.14 Determinación de la secreción de TNF-α……46
4.15 Ensayos de ELISA……...47
4.16 Medición de corticosterona en plasma……47
4.17 Ensayo de cromatografía por filtración molecular……47
4.18 Macrófagos, tolerización y tratamientos con inhibidores de TNF-α……....47
4.19 Macrófagos tolerantes y tratamiento con IFN-γ……...47
4.20 Macrófagos tratados con LPS y Dex……....48
4.21 Obtención de células de Bazo……48
4.22 Proliferación de esplenocitos……..48
4.23 Ensayo de hemoaglutinación……..48
4.24 Citometría de flujo……....49

4.25 Ensayos in vivo……49
4.25.1 Protocolo de tratamiento con Dex y dosis letal de LPS……..49
4.25.2 Tratamiento con Dex y Mifepristone (RU486) en el establecimiento de la tolerancia……...50
4.25.3 Tratamiento con mifepristone (RU486) en el mantenimiento de la tolerancia……50
4.25.4 Tratamiento con RU486 e inmunización en ratones tolerantes/inmunosuprimidos con LPS: Respuesta primaria……51
4.25.5 Tratamiento con RU486 e inmunización en ratones tolerantes/inmunosuprimidos con LPS: Respuesta secundaria……51
4.25.6 Respuesta inmune celular y tratamiento con RU486 en ratones tolerantes/inmunosuprimidos con LPS……...51
4.25.7 Tratamiento con drogas citostáticas en ratones tolerantes……...52
4.25.8 Tratamiento con drogas citostáticas durante el establecimiento de la tolerancia……...52
4.26 Análisis estadísticos……52

5.-RESULTADOS……...53
5.1 Dexametasona induce refractariedad a los efectos inducidos por LPS……..…54
5.1.1 Perfil de secreción de TNF-α y corticosterona en el fenómeno de tolerancia a endotoxina…54
5.1.2 Efecto de la dexametasona frente a una dosis letal de LPS in vivo……..……55
5.1.3 Efecto de la dexametasona *in vitro*……..57
5.1.4 Efecto específico de la dexametasona……58
5.2 La dexametasona inhibe el establecimiento de la tolerancia……61
5.2.1 Administración exógena de glucocorticoides y establecimiento de la tolerancia……..…61
5.2.2 Relevancia de la secreción temprana de TNF-α en el establecimiento de la tolerancia……..64
5.3 Mifepristone (RU486), un antagonista para receptores de glucocorticoides, desarticula el mantenimiento de la tolerancia pero no altera el establecimiento del fenómeno…….....66
5.3.1 Participación de los glucocorticoides endógenos durante el establecimiento de la tolerancia……66
5.3.2 Participación de los glucocorticoides endógenos durante el mantenimiento de la tolerancia……69
5.3.3 Acción del IFN-γ en la desarticulación del fenómeno de tolerancia *in vitro*……72
5.4 Mifepristone (RU486) induce una restauración parcial de la respuesta inmune humoral y celular en ratones tolerantes/inmunosuprimidos por LPS……....73
5.4.1 Efecto del tratamiento con RU486 sobre la respuesta inmune humoral primaria……73
5.4.2 Efecto del tratamiento con RU486 sobre la respuesta inmune humoral secundaria……...76
5.4.3 Efecto del tratamiento con RU486 sobre la respuesta inmune celular……78
5.5 Características fenotípicas y funcionales asociadas a un estado de depresión inmune en poblaciones celulares de ratones tolerantes/inmunosuprimidos por LPS…….....80

5.5.1 Características generales de las poblaciones celulares esplénicas……81
5.5.2 Capacidad fagocítica de población esplénica CD11b^{+}……..83
5.5.3 Proliferación inespecífica y específica de antígeno de células esplénicas……84
5.6 Inducción de poblaciones celulares inmunosupresoras (GR-1^{+}CD11b^{+}) y T regulatorias (CD24^{+}CD25^{+}Fopx3^{+}) en ratones tolerantes/ inmunosuprimidos por LPS: relevancia en el fenómeno de tolerancia……....85
5.6.1 Efecto del tratamiento con dexametasona in vivo sobre la inducción de poblaciones supresoras/regulatorias……..….86
5.6.2 Inducción de poblaciones supresoras/ regulatorias en el fenómeno de tolerancia/ inmunosupresión……..……88
5.6.3 Relevancia de las células supresoras/regulatorias durante el establecimiento de la tolerancia……..88
5.6.4 Relevancia de las células supresoras/regulatorias en el mantenimiento de la tolerancia……..90
6.- DISCUSIÓN……..……..93
6.1 Etapa de Establecimiento del fenómeno de tolerancia a endotoxina……95
6.2 Etapa de Mantenimiento del fenómeno de tolerancia a endotoxina……...97
6.3 Respuesta inmune humoral y celular……100
7.- CONCLUSIÓN GENERAL……..106
8.- REFERENCIAS……..…108

2.- Introducción General y Objetivos

Los fenómenos inflamatorios sistémicos (SIRS**:** *systemic inflammatory response syndrome*) son la resultante de la exposición de un organismo a estímulos capaces de inducir una violenta respuesta inflamatoria generalizada que, habitualmente, se inicia con la liberación de citoquinas proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral-α (TNF-α), el interferón -γ (IFN-γ), las interleuquinas (IL) IL-6, IL-1 e IL-12, entre otras, y que puede concluir en un shock con fallas orgánicas múltipes (MODS: *Multiple organ dysfunction syndrome*) y muerte del individuo[1-3].

Como respuesta compensatoria a esa exacerbada inflamación sistémica se produce una oleada de sustancias anti-inflamatorias como IL-4, IL-10, IL-13, factor de transformación del crecimiento-β (TGF-β) y glucocorticoides (GC), entre otros, que tienden a contrarrestar la inflamación aguda y restablecer la homeostasis. Esta fase anti-inflamatoria, conocida bajo la denominación genérica de CARS (*compensatory anti-inflammatory response syndrome*), puede constituirse como un estadío predominante y, frecuentemente, conducir a un estado de **inmunosupresión** con una duración de días, semanas o meses, siendo la causa de infecciones oportunistas que, eventualmente, lleva a la muerte de esos pacientes[4] .

Los SIRS pueden ser ocasionados por una gama de diferentes estímulos, entre los cuales encontramos infecciones, estímulos no infecciosos como la injuria por isquemia/ reperfusión, el insulto térmico, o el shock hemorrágico y el traumático. Los casos de SIRS causados por infecciones se los conoce bajo la denominación genérica de sepsis[2,3].

La sepsis es, quizás, el SIRS más relevante, y puede definirse como un síndrome clínico asociado a una infección severa que se acompaña con fiebre, leucocitosis o leucopenia, frecuencia cardiaca elevada y reducida resistencia vascular. Además, la sepsis puede derivar en variantes de mayor complejidad y peor pronóstico como la sepsis severa, el shock séptico y la disfunción orgánica múltiple (MODS)[5].

Los síndromes sépticos se han triplicado desde la década del 70 hasta la actualidad, afectando aproximadamente a 750.000 personas/ año en los Estados Unidos, que se ha traducido en una incidencia de 210.000 muertes por año, constituyendo aproximadamente un 8% del total de las muertes en ese país[6].

A lo largo de más de 30 años las diversas estrategias terapéuticas contra los procesos sépticos se han centrado en atenuar la respuesta inflamatoria inicial. Sin embargo, la frustración ha sido grande, ya que a pesar de haberse llevado a cabo más de 25 ensayos clínicos (*trials*), no se ha conseguido aumentar la sobrevida de esos pacientes. Entre ellos: anticuerpos anti-LPS, antagonistas de LPS, anti-lípido A, anti-TNF-α, anti-IL-1, receptor soluble de TNF-α, inhibidores de la óxido nítrico sintetasa, GC en altas dosis, etc.[7].

Este fracaso en el desarrollo de terapias adecuadas, ha sido en parte debido a la carencia, que aún hoy persiste, sobre la comprensión plena de los mecanismos patogénicos que acompañan a las sepsis. Datos estadísticos muestran que, si bien en etapas tempranas de los procesos sépticos, donde la fase proinflamatoria es predominante, y sobre la cual se han dirigido las diversas estrategias terapéuticas, la mortalidad se ubica entre un 2 al 11%, mientras que el resto de las muertes, entre 89 y 98%, ocurren en las etapas tardías donde existe un predominio de citoquinas anti-inflamatorias e inmunosupresión en los pacientes con sepsis[8,9].

La inmunosupresión observada en sepsis ha sido asociada a diferentes alteraciones tanto a nivel de la respuesta inmune innata como de la adquirida. Así, se han descrito deficiencias regulatorias y/o efectoras en linfocitos T o B, jugando en esta disfunción un rol clave los mecanismos de apoptosis, eliminación o alteración funcional de células dendríticas, monocitos/ macrófagos y neutrófilos, importantes efectores de la inmunidad innata. Todo esto a menudo va acompañado por una disminución marcada de antígenos de histocompatibilidad de clase II (HLA-DR) en las células de respuesta inmune, que se traduce en una caída abrupta de la síntesis de anticuerpos y en un deterioro masivo de la inmunidad celular, sea innata o adaptativa, a nivel sistémico o de mucosas[8,10-12]. Más recientemente, se ha demostrado que en estos estados de inmunosupresión en pacientes críticos, se manifiestan enfermedades virales que resultan de la activación de virus latentes como el citomegalovirus[13] y el herpes simplex[14].

Numerosos mediadores han sido propuestos como factores causales del estado de inmunosupresión observado en pacientes. Entre ellos, citoquinas anti-inflamatorias como IL-10 y TGF-β, mediadores lipídicos como las prostaglandinas (PG-E2), neuromediadores y hormonas como ser las catecolaminas y los GC. Además, diferentes estudios utilizando modelos animales han definido la participación de ciertas poblaciones celulares que contribuyen a la alteración del *status* inmune, como ser las células T regulatorias

($CD4^+CD25^+Foxp3^+$) y las células supresoras inmaduras de origen mieloide ($GR\text{-}1^+/CD11b^+$)[4,10,15,16].

Como mencionamos anteriormente, si bien durante años las teorías que prevalecieron sobre el síndrome séptico lo consideraban un evento asociado a una inflamación exacerbada en respuesta a una infección, en la actualidad la sepsis está pasando a ser reconocida también como un evento que conduce a un estado anti-inflamatorio que, finalmente, concluye en una inmunosupresión severa[17].

El línea con esto, y considerando que en el 50% de las sepsis las infecciones se dan por bacterias Gram-negativas, los lipopolisacáridos de la membrana externa de esas bacterias (LPS), juegan un rol importante tanto en el proceso inflamatorio como en la subsiguiente inmunosupresión[5]. En efecto, la acción del LPS promueve, por un lado, una rápida secreción de citoquinas proinflamatorias tales como TNF-α, IL-.1, IL-6, IL-8 e IFN-γ, que constituyen la fase inicial o proinflamatoria. Por el otro, las endotoxinas actúan como moduladores de la respuesta compensatoria estimulando la liberación concomitante de potentes factores anti-inflamatorios como la IL-10, TGF-β o GC mediante la activación del eje hipotálamo-pituitario-adrenal (HPA), lo cual conduce al huésped a una refractariedad temporal frente al desafío de nuevas dosis de LPS**. Este estado refractario es conocido como tolerancia a LPS o tolerancia a endotoxinas[18-21], y debe distinguirse de la tolerancia inmunológica convencional la cual es específica de antígeno.**

Dicho fenómeno es definido por una capacidad muy reducida del huésped para responder frente nuevos a estímulos inflamatorios -LPS u otros- lo que habla de la inespecificidad del fenómeno[20]. El fenotipo tolerante se caracteriza por una marcada disminución en la producción de citoquinas proinflamatorias, en particular el TNF-α, una disminución en la expresión del receptor TLR-4 (receptor para LPS), como también por una inhibición en la generación de intermediarios de la cascada de señalización y alteraciones en la translocación del factor de transcripción NF-κB (*Nuclear factor-kappa B*), entre otros efectos [19,21,22]. Sin embargo, la tolerancia no debe considerarse como un estado de anergia celular sino como un estado fisiológico o fisiopatológico en donde hay predominancia de síntesis y secreción de sustancias anti-inflamatorias.

En pacientes que cursan fases más avanzadas o tardías de un cuadro de sepsis también se ha observado la ocurrencia del **fenómeno de tolerancia**. Varias similitudes se han encontrado en los estudios comparativos entre las deficiencias funcionales observadas

en monocitos de pacientes sépticos y macrófagos tolerizados con LPS. Así, estos mecanismos podrían servir como una importante estrategia para limitar una exacerbada respuesta inflamatoria frente a una infección por patógenos, protegiéndose al huésped de una lesión mayor[17,23].

Sin embargo, las evidencias indican claramente que el fenómeno de tolerancia está asociado a un estado clínico con peor pronóstico y evolución en pacientes hospitalizados en unidades de terapia intensiva. Así, se ha observado una correlación directa entre el estado de tolerancia y una internación más prolongada, una sostenida ventilación mecánica, una mayor incidencia de infecciones clínicas y un elevado recuento de glóbulos blancos[24-26]. Por otro lado, se ha descrito que en pacientes que mueren después de 72 horas de iniciado un shock séptico (sepsis tardía) muestran signos clínicos similares al fenómeno de tolerancia[27,28]. **Por lo tanto, si bien se ha pensado a la tolerancia como una respuesta adaptativa beneficiosa para el huésped, hoy se considera que constituye un componente importante de la desregulación inmune siendo una de las principales causas de la inmunosupresión inespecífica reportada en estos pacientes, jugando un rol clave en la susceptibilidad a la reinfección por bacterias oportunistas[21,25].**

La integración de estos conceptos permitió considerar al fenómeno de tolerancia como un evento crucial que ocurre en procesos de sepsis tardías y que puede ser entendido como la fase inicial o la vía aferente de la instalación de la inmunosupresión inespecífica inducida por LPS, tanto en modelos experimentales como durante el curso de un proceso séptico[23].

Éstas son algunas de las razones por las cuales el estudio de la regulación del fenómeno de tolerancia a LPS ha sido, y sigue siendo, una temática de interés para muchos grupos de investigación. Sin embargo, a pesar de los esfuerzos, el complejo fenómeno de tolerancia aún no ha sido completamente entendido. Parte de esta complejidad puede deberse a la gama de diferentes agentes, factores o mecanismos involucrados en el fenómeno de tolerancia/ inmunosupresión inducido por LPS. Entre los actores principales que han sido considerados responsables del fenómeno de tolerancia se encuentran las citoquinas anti-inflamatorias como la IL-10 y el TGF-β como así también los GC[29-31].

La importancia de los GC ha sido observada en modelos de ratón adrenalectomizados en los cuales no es posible establecer la tolerancia. Por otro lado, si bien se han demostrado niveles aumentados de GC en plasma en modelos experimentales, algunos autores

sostienen la idea de mecanismos dependientes e independientes de GC en el fenómeno de tolerancia[32]. De esta manera, si bien existen evidencias de la importancia de los GC, la importancia de los mismos ha sido relativizada y en la actualidad no se tiene una idea acabada en cuanto a la participación y acción de los mismos en el fenómeno[30,33].

Así, en pacientes con sepsis se han observado alteraciones en los mecanismos que regulan el funcionamiento del eje hipotálamo-pituitario-adrenal (HPA). Esta disfunción se traduce en un desbalance de hormonas de origen adrenocortical que dan como resultado niveles elevados de GC en plasma de pacientes. Este hecho podría ser considerado como causal de la susceptibilidad aumentada a infecciones secundarias durante la fase más tardía de la enfermedad[34].
Por otro lado, varios estudios clínicos han demostrado la incidencia de cuadros de insuficiencia adrenal en pacientes cursando síndromes de shock séptico, denotando en estos casos una reducida reserva secretora de cortisol a nivel adrenal[35,36].

La discrepancia entre estos dos eventos que tienen como actor protagonista a los GC, puede develarse teniendo en cuenta los diferentes estadios por los cuales van cursando los procesos sépticos, como la complejidad y la gran heterogeneidad que se observa en los pacientes. No obstante, es relevante considerar la “paradoja” que, tanto los altos niveles de GC, así como los niveles reducidos de producción, han sido asociados a un peor pronóstico de la enfermedad[20]. A todo esto le debemos agregar el fracaso de los corticoides en alta dosis en el tratamiento de las sepsis.

Durante varios años se han desarrollado algunas estrategias focalizadas en la reversión del fenómeno de tolerancia en su fase anti-inflamatoria. Así, se ha demostrado que el tratamiento con IFN-γ o el factor estimulador de colonias de macrófagos-granulocitos (GM-CSF) permiten restaurar la respuesta de TNF-α frente a un estímulo de LPS tanto en modelos de tolerancia *in vitro* como *in vivo*[37,38].

Además, en pacientes con sepsis se ha demostrado que la utilización de IFN-γ conduce a una recuperación de la capacidad de las células a responder a una estimulación *ex vivo* con LPS y una restauración en los niveles de expresión de la molécula HLA-DR sobre la superficie de monocitos[28]. Sin embargo, la utilización de citoquinas como posibles estrategias terapéuticas muestra como desventaja el difícil manejo terapéutico de las mismas así como una amplia variedad de efectos colaterales inducidas por esas sustancias.

En consecuencia, el estudio y la comprensión de los actores involucrados en el fenómeno de tolerancia/ inmunosupresión inducido por bacterias Gram-negativas puede significar de gran relevancia para abordar estrategias que permitan desarticular el fenómeno de tolerancia/ inmunosupresión, causa principal en la muerte de estos pacientes.

Teniendo en cuenta lo mencionado previamente, el **objetivo general** de esta tesis fue estudiar diferentes aspectos del fenómeno de tolerancia a endotoxinas e investigar mecanismos y/o procedimientos que permitan regular y/o revertir la inmunosupresión que generan. Para ello, recurrimos a un modelo murino en donde el LPS es el agente inductor de la tolerancia y de la inmunosupresión.

Además, y con la finalidad de abordar el fenómeno más integralmente, tuvimos en cuenta que la tolerancia y/o la inmunosupresión son eventos que consisten, esencialmente, de dos fases antagónicas y bien diferenciadas: una fase inicial o de establecimiento de la tolerancia y una fase tardía o de mantenimiento de la misma y que, por lo tanto, fueron estudiadas por separado.

Por otra parte, los **objetivos específicos** fueron:

1.- Estudiar la participación de diferentes actores en las distintas fases de la tolerancia: la etapa inicial o de establecimiento del fenómeno, y la etapa final o de mantenimiento.

2.- Evaluar particularmente el rol de los GC en las diferentes fases del fenómeno.

3.- Evaluar la participación en las diferentes fases de la tolerancia de poblaciones celulares que han sido asociadas con los fenómenos de inmunosupresión y su posible relación con los GC.

4.- Analizar la participación de los GC en la inmunosupresión a nivel de la respuesta humoral, analizando tanto la respuesta primaria como la secundaria.

5.- Evaluar la participación de los GC en la inmunosupresión a nivel de la respuesta celular utilizando un modelo tumoral en ratón.

INTRODUCCIÓN

3.- Introducción

3.1- Respuesta inflamatoria sistémica (SIRS) y sepsis

3.1.1 Características generales

Los fenómenos inflamatorios sistémicos (SIRS; *systemic inflammatory response syndrome*) son una expresión clínica de la acción de agentes exógenos y mediadores intrínsecos que dan como resultado un cuadro de inflamación sistémica. Los SIRS pueden ser inducidos por diferentes eventos tales como procesos infecciosos, como así también por estímulos no infecciosos como son la injuria por isquemia/ reperfusión, el insulto térmico, el shock hemorrágico y traumático, las pancreatitis y las cirugías. En los casos de SIRS donde existe un foco de infección identificable al síndrome se lo conoce bajo la denominación de sepsis[1,3,39].

En términos generales, el fenómeno de SIRS es una respuesta normal del organismo frente a un estímulo determinado. Sin embargo, frente a una respuesta exacerbada, puede verse comprometida la función de distintos sistemas de órganos conduciendo a un cuadro de disfunción multiorgánica (MODS; *multiple organ dysfunction syndrome*). Cuando los SIRS conducen hacia un cuadro de falla orgánica la mortalidad aumenta drásticamente, reflejándose en más del 50% de los casos[40,41]. Por lo tanto, en términos de importancia clínica, frente a estímulos infecciosos, la inducción de un fenómeno de SIRS en ocasiones es una complicación mucho más problemática que la toxicidad inducida por la propia infección bacteriana.

El SIRS es manifestado por dos o más de las siguientes condiciones: temperatura corporal mayor a 38°C o menor a 36°C, ritmo cardíaco mayor a 90 latidos/min, ritmo respiratorio mayor a 20 respiraciones/min, hiperventilación, recuento de blancos totales mayor a $12x10^9$/L o menor a $4x10^9$/L y/o la presencia de más de 10% de formas inmaduras[1].

3.1.2 Exacerbada producción de citoquinas proinflamatorias

Las citoquinas son importantes componentes del sistema inmune que actúan como vías de comunicación entre distintos tipos celulares y se encuentran involucradas en diferentes aspectos patológicos de la cascada que conduce a un cuadro de SIRS y, eventualmente, a un MODS[42]. Así, tanto los SIRS como las sepsis se caracterizan por una exacerbada producción de citoquinas proinflamatorias, incluyendo el TNF-α, el IFN-γ y las IL-6, IL-1 e IL-12, entre otras, secretadas por diversos tipos celulares incluyendo macrófagos y monocitos. La secreción de citoquinas es un proceso altamente regulado y

su expresión, en la gran mayoría de los casos, se encuentra modulada por factores de transcripción tales como NF-*κ*B. Todas las citoquinas causan sus efectos vía receptores de superficie celular altamente específicos, teniendo, en su mayoría, actividad pleiotrópica y múltiples efectos funcionales sobre una variedad de células blanco. Si bien las citoquinas inducen una respuesta inflamatoria beneficiosa que promueve una coagulación local para limitar el daño de tejido, una producción exacerbada puede ser incluso más peligroso que el estimulo original, sorteando la regulación normal de la respuesta inmune y conduciendo, eventualmente, a desordenes inflamatorios patológicos como es posible observar habitualmente en cuadros de sepsis[2,41,42].

Este cuadro exacerbado de producción de citoquinas proinflamatorias habitualmente se lo denomina como "*cytokine storm*" o bien "*tormenta de citoquinas*", haciendo alusión a un tipo particular de respuesta inmune descontrolada que se observa en diferentes cuadros de SIRS[43,44]. Dicho fenómeno constituye una reacción inmune potencialmente fatal, en la cual se induce un *loop* de *feed-back* positivo entre la producción de citoquinas y las células inmune que se retroalimentan continuamente, pudiendo eventualmente promover un daño significativo en diferentes tejidos y órganos [2].

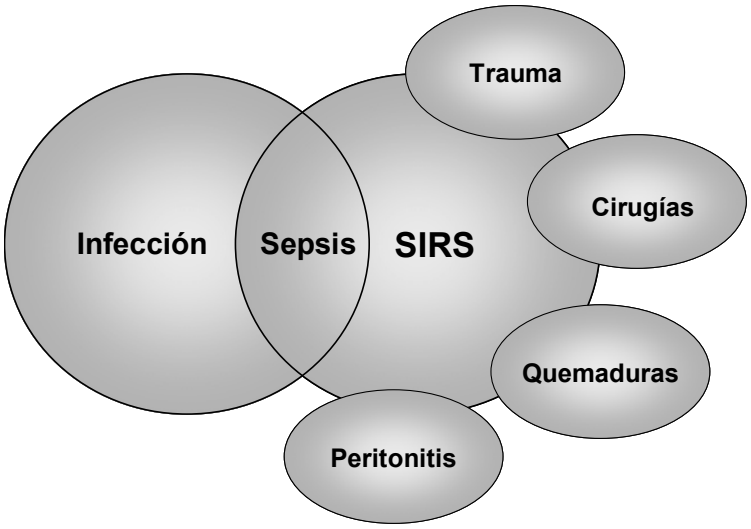


Figura ilustrativa denotando el concepto de SIRS como una respuesta común a diferentes estímulos inflamatorios. Definición de sepsis.

3.1.3 Respuesta compensatoria CARS

Si bien, tanto los cuadros de SIRS como las sepsis se han asociado a una exacerbada producción de mediadores proinflamatorios, tal como se ilustra con la terminología de "*tormenta de citoquinas*"[45], resulta imprescindible destacar que como respuesta compensatoria a esa exacerbada inflamación ocurre una oleada de mediadores anti-inflamatorios, tales como: el receptor soluble del factor de necrosis tumoral (sTNFR)[46], IL-10[47,48], el receptor antagonista de IL-1 (IL-1Ra)[49], el TFGβ[50,51], mediadores lipídicos como las prostaglandinas (PG-E2), neuromediadores y hormonas como catecolaminas y GC[52,53].

Varios autores han propuesto que dichos mediadores anti-inflamatorios circulantes contribuyen a la respuesta normal del cuerpo a fin de evitar una inflamación sistémica y reestablecer la homeostasis[54]. Sin embargo, se ha observado una liberación exacerbada de dichos mediadores denotando una fuerte asociación entre los niveles elevados encontrados en sangre y un peor pronóstico de la enfermedad. De hecho, observaciones han demostrado que el plasma de pacientes con sepsis tiene la capacidad de inhibir las funciones de leucocitos siendo considerado como un "medio inmunosupresivo"[55]. En línea con esto, numerosos indicios confirman un estado inmune alterado en pacientes con SIRS y sepsis, evaluado tanto en ensayos *in vivo*, como *in vitro*[4].

Por otro lado, la alta susceptibilidad de pacientes en cuidados intensivos a infecciones hospitalarias ha sido asociada con la ocurrencia de esta alteración del *status* inmune[56-58]. Así, si bien la respuesta anti-inflamatoria es un componente esencial para restaurar la homeostasis inmune, luego de un estimulo inflamatorio tal como una infección, un estado anti-inflamatorio exacerbado como puede observarse en etapas avanzadas de sepsis, puede resultar eventualmente en una inmunosupresión y conducir a la muerte del paciente debido a la incapacidad de resolver infecciones secundarias en períodos post sépticos[59,60].

Diferentes términos se han utilizado para definir estos eventos anti-inflamatorios: anergia[61], inmunodepresión[62], inmunoparalisis[63]. Sin embargo, considerando las diferentes propiedades alteradas de las células inmunes en pacientes con sepsis y SIRS no infecciosos, un término más adecuado para referirse a estos eventos es la denominación de CARS o síndrome de respuesta anti-inflamatoria compensatoria, definido por Bone en 1997[64], es un concepto que acuña la idea de un fenómeno de reprogramación leucocitaria más que un defecto global del *status* inmune.

3.1.4 Sepsis: cambio de perspectiva

Como se ha visto antes, la sepsis es definida como un SIRS en el cual existe un foco de infección identificable causado por bacterias, virus, hongos o parásitos y que se acompaña por dos o más signos o síntomas descritos para los SIRS. De los pacientes con SIRS asociados con una infección, la mayoría presentan cuadros de sepsis debido a bacterias Gram-negativas[65,66]. Además, la sepsis puede derivar en variantes de mayor complejidad y peor pronóstico: *sepsis severa*, siendo un cuadro de sepsis acompañado por una disfunción orgánica, hipoperfusión o hipotensión, *shock séptico* el cual se define como una sepsis severa acompañada por un cuadro de hipotensión arterial persistente a pesar de una adecuada restitución de líquidos, y finalmente, el *síndrome de disfunción orgánica múltiple* (MODS)[1]

Desde la década del setenta se han visto triplicados los casos de sepsis, observando un incremento en la ocurrencia de estos síndromes en hospitales de todo el mundo. Las estimaciones actuales sugieren que aproximadamente unos 750.000 casos de sepsis grave se producen anualmente en los Estados Unidos, con una tasa de mortalidad de alrededor del 29%[67]. Estudios recientes de SOAP (Sepsis Occurrence in Acutely Ill Patients) en Europa informaron que más del 35% de los pacientes que se encuentran en unidades de terapia intensiva (UCI) tuvieron sepsis en algún momento durante su estancia en la UCI, con una tasa de mortalidad variable entre el 27%-80%[68].

Si bien en nuestro país no se cuenta con datos fidedignos del impacto de la sepsis, el Grupo Argentino de Estudio Difusión e Investigación de la Sepsis reportó la ocurrencia de 50 muertes diarias por sepsis severa en nuestro país.

Los fenómenos de sepsis inducen una compleja respuesta inmunológica que varía con el tiempo[9,57]. Si bien estudios recientes demuestran una activación de la fase proinflamatoria de manera concomitante con la respuesta anti-inflamatoria, en las etapas tempranas del curso de la enfermedad, se observa el predominio de una respuesta hiper-inflamatoria. La magnitud de esta fase depende de muchos y variados factores, la carga de patógenos, su virulencia y otras condiciones que afectan a la enfermedad del paciente[57]. A medida que la sepsis progresa, en etapas más tardías, la respuesta anti-inflamatoria pasa a tener un rol predominante conduciendo al paciente a un estado de inmunosupresión que algunos autores han denominado “inmunoparállisis”. Durante este estadío los pacientes manifiestan una pérdida de la respuesta de hipersinsibilidad retardada a antígenos de control positivo, fallas para eliminar o combatir a la infección primaria y el desarrollo de nuevas infecciones secundarias[4,69]. En este sentido, se han observado infecciones

secundarias que incluyen organismos virulentos como ser *Staphylococcus aureus,* como así también organismos que no son particularmente peligrosos para individuos inmunocompetentes como *Candida albicans* y *Pseudomonas aeuroginosa*, entre otros. La infección con este tipo de organismos y las observaciones de reactivación de virus como ser *citomegalovirus* (CMV)[13] y *herpes simplex* (HSV)[14] demarcan claramente un estado de inmunosupresión en estos pacientes.

En consecuencia, el concepto de sepsis como un evento asociado a una fase inflamatoria exacerbada en respuesta a una infección está siendo actualmente reevaluada, pasando a tener gran relevancia los eventos anti-inflamatorios que se observan en etapas avanzadas de la enfermedad, los cuales pueden conducir a un estado de inmunosupresión severa. Datos estadísticos demuestran que mientras en las etapas tempranas de la sepsis donde la mortalidad se ubica entre un 2 al 11%, y es consecuencia de diferentes eventos asociados al *"cytokines storm"* (**SIRS**), el resto de las muertes, entre 89 y 98%, ocurren en las etapas tardías donde existe un predominante estado anti-inflamatorio e inmunosupresión (**CARS**) lo cual imposibilita el control y una adecuada eliminación de patógenos[5,8,9,69].

Esta nueva concepción del fenómeno de sepsis explica en gran medida los fracasos observados en el desarrollo de estrategias terapéuticas durante más de 30 años. Tradicionalmente las estrategias para sepsis se basaron en la atenuación de la respuesta inflamatoria, como ser mediante el bloqueo de diferentes productos bacterianos como los lipopolisacáridos de membrana (LPS) utilizando anticuerpos anti-LPS, antagonistas de LPS, anti-lípido A, o bien bloqueando mediadores claves de la respuesta inflamatoria resultante como ser anti-TNF-α, anti-IL-1, receptor soluble de TNF-α, inhibidores de la óxido nítrico sintetasa (iNOS), GC en altas dosis, entre otras[70,71].

En los últimos años varios estudios se encuentran evaluando la utilización de la proteína C humana activada como posible terapéutica en procesos de sepsis severas, aprovechando su capacidad anticoagulante y anti-inflamatoria[72]. También la utilización de bajas dosis de GC por períodos más largos, han demostrado tener ciertos beneficios en cuadros de shock sépticos que manifiestan una insuficiencia adrenal, aunque hoy por hoy es un punto de grandes controversias[73].

Sin embargo, a pesar de haberse llevado a cabo más de 25 ensayos clínicos (*trials*) con agentes anti-inflamatorios, no se ha conseguido aumentar la sobrevida de esos pacientes[7,60].

Este fracaso en el desarrollo de terapias adecuadas, ha sido en parte debido la carencia, que aún hoy persiste, sobre la comprensión plena de los mecanismos patogénicos que conducen al fenómeno de sepsis.

La sepsis ya no puede ser caracterizada simplemente como un síndrome de respuesta inflamatoria sistémica asociado con una infección. Sería más adecuado considerar que los pacientes con sepsis adquieren fenotipos inmune heterogéneos con un desequilibrio inmunológico que varía no solo de individuo a individuo, sino durante el curso de la enfermedad dentro de cada individuo[58]. A su vez, la respuesta inmune de un individuo a una sepsis puede ser modulada por una variedad de factores: la naturaleza del estímulo infeccioso en sí mismo, la composición genética, factores exógenos como, por ejemplo, medicamentos, transfusiones de sangre, etc[74-76]. Así, los pacientes sépticos no son un grupo homogéneo y aquí radica la dificultad de encontrar estrategias terapéuticas adecuadas y eficaces. Algunos pacientes pueden necesitar la supresión de su respuesta inflamatoria mientras que otros, especialmente aquellos que sobreviven a la fase inicial de la sepsis y adquieren un estado de inmunosupresión severa, sería más adecuado trazar estrategias que mejoren o aumenten su función inmune permitiendo restaurar la capacidad de montar una respuesta inflamatoria a fin de evitar el desarrollo de infecciones secundarias que pueden conducir, eventualmente, a la muerte del paciente.

3.1.5 Inmunosupresión en sepsis

3.1.5.a Mecanismos: Alteraciones fenotípicas y funcionales

Múltiples mecanismos se encuentran asociados a la inmunosupresión en pacientes con sepsis. Entre ellos, se han descrito alteraciones funcionales en la respuesta inmune adquirida asociado particularmente a mecanismos de apoptosis que afectan principalmente a linfocitos de sangre periférica y bazo[77,78]. Varios trabajos han reportado una marcada linfopenia, afectando a células B y células T $CD4^+$ [79,80].

En asociación con este *status* inmune alterado, también se ha reportado una importante eliminación de células dendríticas esplénicas y alteraciones en su funcionalidad[81,82]. En estudios de células dendríticas utilizando modelos experimentales de sepsis, se ha demostrado una debilitada capacidad para inducir respuestas de citoquinas de tipo Th-1 y una marcada producción de citoquinas de perfil Th-2, como IL-10, frente a una exposición ex vivo con componentes microbianos[83,84]. Por otro lado, también se han observado alteraciones tanto a nivel de monocitos/ macrófagos y neutrófilos, importantes efectores de la inmunidad innata. Una reducida apoptosis de polimorfonucleares y una marcada neutrofilia, es una característica observada en sepsis[85-87]. A nivel funcional, resultados variados y opuestos se han observado en la bibliografía, encontrándose tanto un

aumento como una disminución de diferentes funciones de los neutrófilos circulantes en pacientes con sepsis. Así, se ha reportado una capacidad fagocítica aumentada o disminuida, como también un aumento o disminución en la generación de especies reactivas de oxigeno[88-90]. A nivel de monocitos se observa una pérdida en su capacidad para montar una respuesta inflamatoria luego de una estimulación con productos bacterianos en ensayos *ex vivo.* Frente a un estímulo con LPS muestran una disminuida producción de TNF, IL-1α, IL-1β, IL-6 y IL-12,[91,92] y por el contrario una elevada producción de mediadores anti-inflamatorios tales como IL-10 y IL-1ra[58,91,93]. Otra característica que se observa en monocitos de sepsis es una reducción en la expresión de moléculas HLA-DR[94,95], no solo en el número de células que expresan dicha molécula sino también en la cantidad expresada por célula[96]. Los bajos niveles de expresión de HLA-DR se encuentran correlacionados con una pérdida en las funciones de los monocitos, tales como, en la capacidad para producir citoquinas proinflamatorias e inducir una respuesta de células T antígeno específicas [58]debido a una presentación antigénica alterada[97]. En la mayoría de los estudios los bajos niveles de esta molécula han sido asociados con un peor pronóstico[98] y se ha relacionado con un riesgo aumentado de infecciones bacterianas secundarias[99]. Por otro lado, a nivel de alteraciones de señalizaciones intracelulares, se ha observado un desbalance en las formas activas e inactivas del factor de transcipción NF-κB prevaleciendo la forma inactiva siendo el homodímero p50/p50[100,101]. A nivel de reguladores negativos de la vía TLR, se ha descrito una expresión aumentada del IRAK-M en monocitos de pacientes con sepsis frente a una estimulación *ex vivo* con LPS[102,103]. La expresión aumentada de estos y otros inhibidores de la vía del factor NF-κB, probablemente contribuyen con el fenotipo alterado en la producción de citoquinas proinflamatorias frente a una estimulación *ex vivo* con LPS.

3.1.5.b Mediadores asociados a la inmunosupresión: Agentes solubles y poblaciones celulares

Se han propuesto numerosos mediadores asociados a la disminución de la respuesta proinflamatoria y, eventualmente, a la inmunosupresión en pacientes con sepsis. Un hecho considerable fue la observación de una recuperación de la respuesta de leucocitos provenientes de pacientes con shock séptico, luego de la filtración y absorción de las muestras, denotando fuertemente la presencia de mediadores circulantes inhibitorios y/o inmunosupresores[104]. Así, Prins *et al* demostraron que el suero proveniente de pacientes con sepsis tuvo la capacidad de disminuir la producción de TNF-α en monocitos activados de voluntarios sanos[105]. La idea de considerar al “plasma séptico” como un medio

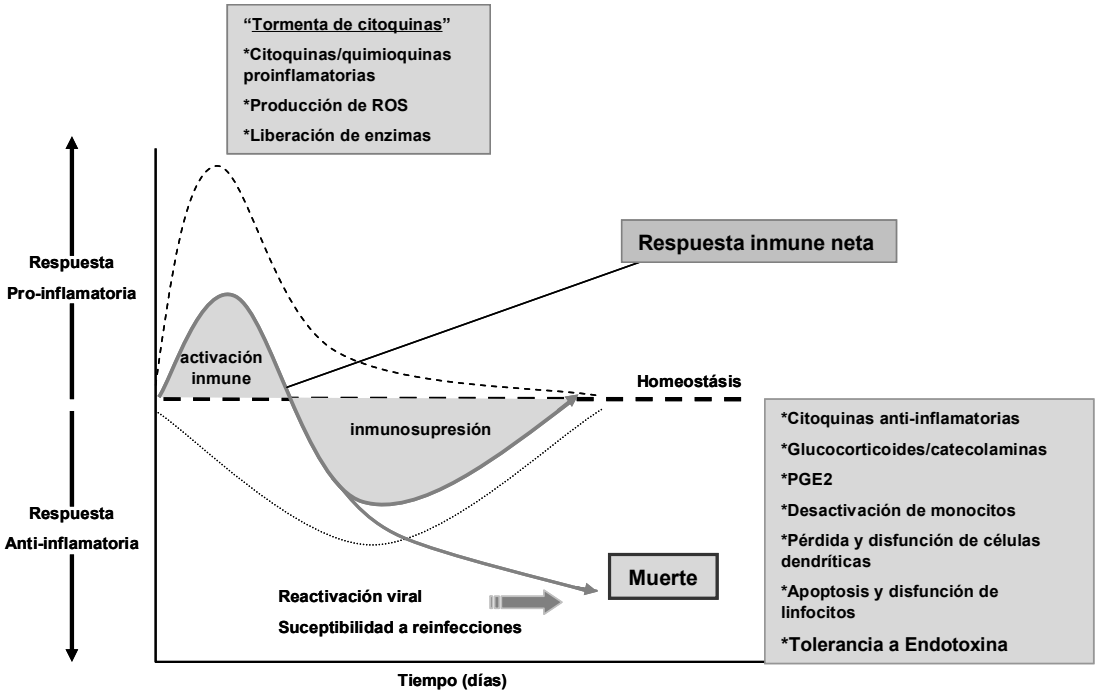
inmunosupresor[55] fue más claramente ilustrado mediante la observación de la inducción de inhibidores en plasma en voluntarios sanos tratados con endotoxina[106].

Entre los mediadores propuestos, como ya definimos en la descripción de CARS, se encuentran las citoquinas anti-inflamatorias como IL-10 y TGF-β[48,51]. Esta última, se ha reportado que puede ser liberada por linfocitos apoptóticos siendo esto una característica de la sepsis[107]. En cuanto a la IL-10, considerada como un desactivador importante de monocitos, algunos trabajos sostienen que participa en la disminución de la expresión de HLA-DR en monocitos induciendo un secuestro intracelular[108]. Por otro lado, varios modelos de sepsis experimental han demostrado la participación de poblaciones celulares en la inmunosupresión observada en sepsis. Entre ellas, las células T regulatorias, productoras también de IL-10 y TGF-β, contribuyen en la supresión inmune a nivel de linfocitos, dado que la depleción de ésta población *in vivo* antes del desarrollo de la sepsis experimental (CLP), restauró considerablemente la capacidad proliferativa de linfocitos y aumentó el perfil de citoquinas de tipo Th-1[16,109]. Las células supresoras mieloides ($GR\text{-}1^{+}/CD11b^{+}$) que constituyen una población altamente heterogénea, también productoras de IL-10, se han observado dramáticamente aumentadas en bazo, ganglios linfáticos y medula ósea en modelos de sepsis polimicrobiana. Varios trabajos han demostrado que contribuyen en la supresión de la proliferación de células T y en la polarización hacia un perfil de citoquinas de tipo Th-2[10,110].

Otros mediadores asociados al estado de desregulación inmune son las catecolaminas y los GC, actuando tanto de manera individual como cooperativamente, reduciendo el perfil de citoquinas Th-1 y favoreciendo la producción de citoquinas Th-2[53,111]. Algunos trabajos sostienen que este efecto es mediado por la inhibición de la producción de IL-12 sobre monocitos[112], aunque también puede ser un efecto directo sobre las células Th-1[52].

En breve, esta variedad de mecanismos y de mediadores que constituyen el estadio CARS de los cuadros de sepsis, fase en la cual se observa una gran susceptibilidad a infecciones secundarias y una imposibilidad de resolver la infección primaria, pueden conducir inevitablemente a la muerte del paciente, como se ha demostrado claramente por datos estadísticos. Como veremos más adelante, siendo entonces el eje de nuestro trabajo, durante este período de depresión inmune, diferentes tipos celulares de pacientes con sepsis presentan características muy similares, tanto desde el punto de vista del perfil de citoquinas como a nivel de mecanismos moleculares, como el denominado **fenómeno de tolerancia a endotoxina o tolerancia a LPS.**

Varios autores consideran que la respuesta compensatoria denominada CARS refleja o bien describe al estado de tolerancia a endotoxina [4,23]. Considerando que clínicamente este estado se encuentra correlacionado, en la gran mayoría de los casos, a la susceptibilidad a reinfecciones y a la mortalidad[4,17,21,23], es que consideramos relevante realizar este estudio a fin de comprender diferentes aspectos del fenómeno de tolerancia.



Respuesta inmunológica en sepsis a lo largo del tiempo. Las líneas de puntos representan las respuestas pro y anti-inflamatorias. La línea continua representa la respuesta inmunológica resultante neta a nivel sistémico. Si bien tanto la respuestas pro como anti-inflamatorias son activadas de manera concomitante, en las fases tempranas predomina la respuesta proinflamatoria. A medida que la sepsis progresa la fase anti-inflamatoria pasa a ser predominante, y durante esta fase tardía es donde ocurren fenómenos de reactivación viral e infecciones secundarias. Las muertes tempranas, durante la fase proinflamatoria, ocurren por eventos mediados por la "tormenta de citoquinas, mientras que las muertes tardías, durante la fase anti-inflamatoria, ocurren debido a fallas en el control de patógenos.

3.2.- Tolerancia a endotoxina

3.2.1 Consideraciones Generales

Un proceso inflamatorio constituye un complejo estado fisiopatológico inducido, en primer lugar, por células del sistema inmune innato en respuesta a una infección y/o daños de tejidos[113,114]. Estos tipos celulares tales como macrófagos/monocitos detectan y responden frente a "señales de peligro" a través de receptores de reconocimiento de patrones (PRR) expresados en su superficie celular. El receptor tipo Toll-4 (TLR4) es el

principal PPR involucrado en la detección de bacterias Gram-negativas y sus endotoxinas asociadas[27,115]. La detección de patógenos y / o endotoxinas por células del sistema inmune innato promueve una robusta respuesta inflamatoria, esencial para permitir la eliminación del patógeno.

Sin embargo, es de gran relevancia que dicha respuesta se encuentre altamente regulada, pues de lo contrario una inflamación descontrolada conduciría a un excesivo daño tisular y manifestaciones de estados patológicos como la sepsis y otras enfermedades[113]. Así, adaptaciones fisiopatológicas que permiten regular la inflamación exacerbada sirven como un mecanismo esencial para la protección del huésped frente a un shock endotóxico. Uno de estos mecanismos claves de protección frente a este contexto es el fenómeno de **tolerancia a endotoxina**[19,22,116], en el cual las células o los organismos expuestos a dosis repetidas de endotoxinas entran en un estado de refractariedad transitorio incapaces de responder a una nueva exposición frente a estimulos inflamatorios. Dicho fenómeno es un estado de tolerancia inespecífica que en nada se asemeja a la tolerancia inmunológica específica de antígeno[117]. Tanto estímulos proinflamatorios endógenos como exógenos e incluso insultos inflamatorios sistémicos de diferente origen como, por ejemplo, la injuria térmica o traumática, un shock hemorrágico o cualquier otro evento SIRS pueden conducir a este estado refractario[18,118]. De manera paradójica, en ocasiones, este estado de protección puede asociarse clínicamente a un cuadro de inmunosupresión relacionado con una susceptibilidad aumentada a infecciones secundarias pudiendo concluir en la muerte del paciente[4,21,23].

3.2.2 Breve reseña histórica

Richard Pfeiffer acuñó por primera vez el término endotoxina en el año 1904. Sus experimentos con *V. cholerae* lo llevaron a considerar la existencia de una sustancia tóxica, estable al calor que se asociaba con la parte insoluble de la célula bacteriana. Denominó a esta sustancia endotoxina, del griego “endo” que significa dentro[119,120].

Paul Besson fue el primero en reportar el fenómeno de tolerancia en el año 1946 al demostrar en conejos que inoculaciones repetidas de la vacuna tifoidea causaban una progresiva disminución de la fiebre inducida por la vacuna[121]. A mediados de los años 60 se observó que animales sometidos a una preexposición con bajas dosis de LPS mostraron una mortalidad dramáticamente reducida cuando fueron desafiados a una dosis letal de LPS[122]. Así, el pretratamiento con endotoxina no solo reduce los factores involucrados en la respuesta frente a un estimulo con LPS, además reduce la mortalidad frente a una dosis letal[123]. Por otro lado, Freudenberg y Galanos mediante un diseño experimental de transferencia especifica de células provenientes de ratones resistentes a

LPS hacia ratones sensibles a LPS, demostraron el rol principal de los macrófagos en la inducción de la tolerancia a endotoxina *in vivo*[124].

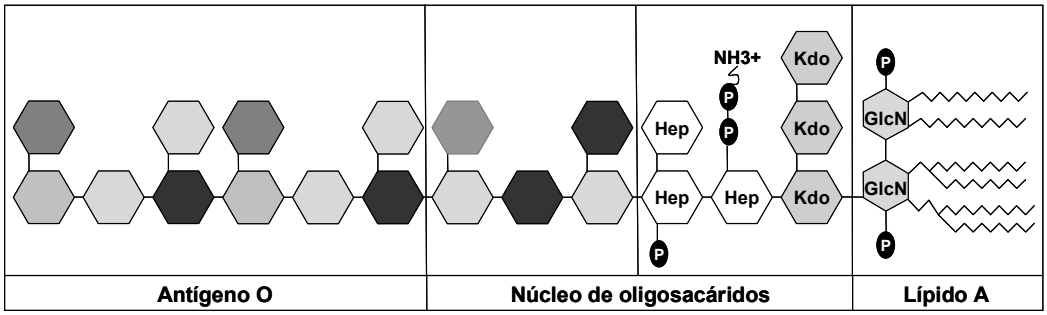
3.2.3 Lipopolisacáridos (LPS)

Los LPS, también conocidos como endotoxinas, son constituyentes normales de la membrana externa de bacterias Gram-negativas que contribuyen en gran medida a la integridad estructural de la membrana bacteriana y a la protección de la misma, siendo un componente esencial para la vida y patogenicidad del microorganismo[27]. Dicha endotoxina es un complejo glicolípido conformado por tres regiones diferentes: un dominio hidrofóbico conocido como lípido A, un núcleo corto de oligosacáridos y un polisacárido o Antigeno-O conformando estos dos últimos el dominio hidrofílico. Durante procesos infecciosos el LPS puede ser liberado hacia el torrente sanguíneo desencadenando un amplio espectro de actividades biológicas, siendo así considerado como uno de los principales y potentes estimulantes microbianos tanto en células inmune como no inmunes[27,125,126].

El sistema inmune, en particular monocitos y macrófagos, responden frente al estimulo con endotoxinas induciendo una fuerte respuesta inflamatoria promovida principalmente por citoquinas como TNF-α, IL1-β, IL-6, IL-12 como así también otros mediadores de respuesta biológica incluyendo factor activador de plaquetas, prostaglandinas, enzimas y radicales libres como oxido nítrico, a fin de controlar el crecimiento bacteriano y concluir finalmente con la eliminación del patógeno[41,127]. Sin embargo, una producción de sustancias inflamatorias exacerbadas puede conducir a síntomas clínicos enmarcados en un cuadro de SIRS, shock séptico o disfunción de órganos[30,41,42].

De manera concomitante, la estimulación con LPS promueve una respuesta compensatoria exacerbada induciendo la liberación de sustancias anti-inflamatorias como IL10, TGF-β o GC que permiten, en ocasiones, contrarrestar la fase inflamatoria sistémica pudiendo, eventualmente, conducir, a cuadros de tolerancia /inmunosupresión[34,128].

La administración diaria de dosis subletales de LPS en ratones constituye un modelo de tolerancia a endotoxina que se asemeja en varios aspectos a los fenómenos de refractariedad a LPS observado en procesos de sepsis tardías.



Arquitectura del lipopolisacárido (LPS). Representación de sus tres regiones diferenciadas: un dominio hidrofóbico conformado por el lípido A y un dominio hidrofílico conformado por el núcleo corto de oligosacáridos y por el antígeno O. GlcN: D-glucosamina; Hep: L-glicero-D-mano-heptosa; Kdo: 2-keto-3-deoxy-ácido octulosónico; P: grupo fosfato

3.2.4 Mecanismos de la tolerancia a endotoxina

3.2.4.a Vías de señalización extracelular

3.2.4.a.i Citoquinas y quimioquinas

En variados estudios realizados con animales y con muestras humanas *in vitro* se ha demostrado una respuesta diferencial de varias citoquinas frente a una reestimulación con LPS caracterizada por una atenuada respuesta de citoquinas proinflamatorias y una no alteración, o incluso aumentada producción, de citoquinas anti-inflamatorias[31,129,130].

El factor de necrosis tumoral-α (TNF-α) es probablemente el principal marcador del fenómeno de tolerancia como se evaluó por su producción dramáticamente reducida luego de un desafío con LPS en animales tolerantes, en contraste con su elevado y rápido pico que se observa en respuesta a la primera inyección con LPS[131]. Sin embargo, no todas las citoquinas se comportan de manera similar. En modelos murinos de tolerancia a endotoxina, el comportamiento de las citoquinas IL-6, IFN-γ y ciertas quimioquinas CXC y CC (CCL3, CCL4, CXCL10) se asemeja al observado para el TNF-α, denotando una marcada disminución en plasma frente a una reestimulación[132,133], mientras que, para el caso de IL-12p70 y las quimioquinas KC y MCP-1, los niveles en circulación disminuyen pero no tan drásticamente como se observó para las citoquinas anteriormente menocionadas[134]. Por otro lado, los niveles de IL-1β y de IL-18 fueron mantenidos independientemente del proceso de tolerización[19].

Por otro lado, en un contexto tolerante se ha observado una regulación positiva para receptores de lectina tipo-C tales como MARCO y CD64 en monocitos/macrófagos, como así también niveles de expresión normales o inclusive aumentados de citoquinas anti-

inflamatorias como IL-10, TGF-β y IL-1ra[132,133] y del receptor II de TNF-α[129,135]. Las citoquinas anti-inflamatorias han sido consideradas de relevancia sustancial en el desarrollo del fenómeno. Se ha reportado la participación de IL-10 y TGF-β en la disminución de la expresión de moléculas MHC clase II y moléculas coestimuladoras CD86, un fenotipo característico de monocitos tolerantes que conduce a una reducida capacidad de presentación antigénica[136,137]. Randow F. *et al.* han demostrado que la utilización de anticuerpos anti-IL-10 y anti-TGF-β durante el proceso de tolerización impide el establecimiento del fenómeno[31]. Por otro lado, el tratamiento con ambas citoquinas sobre monocitos humanos en cultivo, promueve el desarrollo de un fenómeno que imita, al menos parcialmente, a una tolerización *in vitro*[138]. Sin embargo, el rol de la IL-10 es controversial en la tolerancia a endotoxina, ya que si bien participa en el establecimiento del fenómeno, su presencia es prescindible tal como se ha observado en ratones *knock -out* para IL-10 donde la tolerización se establece normalmente[139].

En experimentos en los cuales IL-1ra fue administrada en ratones, se observó una reversión parcial de la inducción de la tolerancia denotando la implicancia de la IL-1 en el desarrollo del fenómeno[140]. En línea con esto, Alves-Rosa *et.al.* han demostrado que la inoculación diaria de IL-1β en un modelo murino permitió la inducción de un estado tolerante a LPS manifestado en la resistencia frente a un shock endotoxico[141].

Otros tipos celulares, además de los macrófagos/monocitos, pueden verse afectados durante el fenómeno de tolerancia. Así, las células dendríticas (DC) tolerantes muestran una expresión disminuida de citoquinas proinflamatorias como IL-12, TNF-α y IL-6, pero una elevada expresión de IL-10 y una capacidad de endocitosis aumentada[142].
Por otro lado, los neutrófilos en un contexto tolerante, si bien no muestran alteraciones en el perfil de citoquinas proinflamatorias, presentan una pérdida de la expresión de TLR4 y un debilitado estallido respiratorio[143].

Así, la observación de genes inducidos y niveles aumentados de ciertos mediadores en un contexto tolerante acuña la idea de un fenómeno en el cual ocurre una profunda **reprogramación** más que una supresión global de la reactividad celular inducida por LPS[19,132,144].

3.2.4.a.ii Desensibilización mediada por agentes en plasma

En la década del 60 Freeman *et al.* demostraron que la tolerancia a endotoxina puede ser transferida mediante la incubación de monocitos normales con plasma proveniente de voluntarios tratados con endotoxina, sugiriendo que los mediadores circulantes

involucrados en la inducción de la tolerancia se encuentran presentes pudiendo contribuir al estado de hipo-respuesta que se observa en leucocitos circulantes[145].
Así, como mediadores extracelulares jugando un rol clave en el fenómeno de la tolerancia, claras evidencias han apuntado a considerar a diferentes componentes asociados con la interacción entre el sistema inmune y el sistema neuroendócrino. Numerosos neurotransmisores han sido mostrados a actuar como inmunosupresores tales como las catecolaminas, la hormona estimulante de melanocito-α, el péptido intestinal vasoactivo o el polipéptido activante de la adelinato ciclasa de la pituitaria, entre otros[146-150].

Por otro lado, se ha observado una fuerte activación del eje hipotálamo-pituitario-adrenal en contextos de tolerancia como así también en procesos de SIRS/sepsis[34,146]. Esta activación conduce a una gran liberación de GC, los cuales son ampliamente conocidos como potentes inhibidores de las respuestas inflamatorias. Evans y Zuckerman demostraron la importancia de los glucocorticoides en tolerancia a endotoxina observando que en ratones adrenalectomizados no es posible establecer el fenómeno. Así mismo, resultados de los mismos autores sugieren que tanto mecanismos independientes como dependientes de los GC se encuentran involucrados en la tolerancia[32,151,152].

Las prostaglandinas, entre otros mediadores extracelulares, se han observado en procesos de sepsis pudiendo también contribuir a la disminución de la producción de citoquinas[153]. En este mismo contexto un aumento en los niveles circulantes de proteínas *heat shock* ha sido encontrado en pacientes, pudiendo ser otro agente involucrado en los procesos de desensibilización[154,155].

El óxido nítrico (NO) es una importante molécula de señalización en una gran variedad de procesos fisiológicos. El estimulo con LPS induce un aumento de la expresión de la enzima óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS), enzima responsable de la producción de NO. Varios estudios sostienen que el efecto protector de la tolerancia a endotoxina es mediada por la alta producción de NO[156,157], reportando que la inhibición de la iNOS elimina los efectos protectores de la tolerancia a endotoxina[158,159]. Sin embargo, un estudio realizado por Szabó y col. sostiene que la inducción de la tolerancia promueve una disminución en la expresión de la iNOS, efecto que se encuentra regulado por los niveles elevados de GC[160]. Ahora bien, para sumar más controversia a la participación del NO en el fenómeno de tolerancia otros autores sostienen que la inducción de la iNOS no es requerida para el desarrollo de la tolerancia a endotoxina[161] o bien que no se ven

afectados los niveles de NO en ratones tolerantes[162]. Estas controversias pueden en parte ser explicadas por las observaciones de Hirohashi N. *et al.* quienes demostraron que los niveles inducidos de NO son dependientes de la dosis tolerogénica de LPS utilizada[163].

3.2.4.a.iii Células inmaduras supresoras de origen mieloide GR-1$^+$/CD11b$^+$

En el campo de la oncología es bien conocido que la mayoría de los tumores inducen una inmunosupresión severa y específica contra el tumor. Esto es debido, en parte, a la proliferación y/o aparición de células mieloides inmaduras tanto en bazo como en ganglios linfáticos constituyendo una población altamente heterogénea que ha sido definida principalmente mediante los marcadores GR-1 y CD11b. Las células mieloides inmaduras han sido descriptas como una población con una potente actividad inmunosupresora[164,165]. Más recientemente en el fenómeno de tolerancia a endotoxina y en modelos de sepsis experimental se ha observado un dramático incremento de dicha población tanto en bazo, ganglios linfáticos como en médula ósea[166,167]. Varios trabajos han descrito la participación de dicha población en la alteración del *status* inmunológico, principalmente, mediante la supresión de la proliferación de células T [10,110].

3.2.4.a.iv Células T regulatorias CD4$^+$CD25$^+$Foxp3$^+$

Al igual que las poblaciones mieloides inmaduras, las células T regulatorias (CD4$^+$CD25$^+$Foxp3$^+$) han sido asociadas con los fenómenos de supresión inmune tanto en procesos tumorales como en modelos de sepsis polimicrobiana[168,169].

Así, tanto en fenómenos de tolerancia como en pacientes y modelos de sepsis se ha observado un incremento significativo de células T regulatorias[16,170]. En modelos de sepsis experimental (CLP: *cecal ligation and puncture*) las células T regulatorias se han asociado a la supresión inmune de linfocitos T, visto que la depleción de células T regulatorias *in vivo* antes del estímulo séptico, restauró marcadamente la capacidad proliferativa de los linfocitos aunque no modificó la mortalidad en los animales[169]. Por el contrario, otros trabajos han reportado que la transferencia adoptiva de células T regulatorias estimuladas *in vitro* aumentó significativamente la producción de TNF-α y mejoró la sobrevida en modelos de sepsis CLP[109].

3.2.4.a.v Receptores de LPS

Los mecanismos de la tolerancia inducida por LPS son meramente complejos e involucran a muchos factores de señalización. Cuando el LPS se encuentra libre en el torrente sanguíneo se asocia en primer lugar con una proteína del suero LBP (*LPS-binding protein*), la cual funciona transfiriendo monómeros de LPS hacia el receptor

CD14[171], un receptor de alta afinidad para el LPS que puede encontrarse anclado a membrana de distintos tipos celulares como los macrófagos[172]. Otro componente del complejo receptor para LPS es el MD-2 (*myeloid differentiation protein-2*), una proteína pequeña soluble que carece de dominio transmembrana y es encontrada sobre la superficie celular en asociación con un dominio del receptor tipo *Toll*-4[173]. Los receptores tipo *Toll* (TLR) pertenecen al grupo de receptores de reconocimiento de patrones (PPRs) y se encuentran encargados del reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs). Así, la señalización a través de los TLR4 es uno de los principales mecanismos moleculares para la detección de patógenos bacterianos gram–negativos y sus endotoxinas por parte de las células del sistema inmune. Dicho receptor se encuentra expresado en células endoteliales, monocitos, macrófagos, neutrófilos y células dendríticas[115,174,175].

El TLR4, receptor que transduce las señales de los LPS, ha sido involucrado en la señalización inducida por LPS jugando un rol de pivote en el desarrollo de la tolerancia a endotoxina[27].

En modelos de macrófagos tolerantes, la disminución en la producción de citoquinas proinflamatorias se correlacionó con una disminución en la expresión en superficie del receptor TLR4[176], como así también con una disminución en la expresión del CD14 y/o del MD-2[177]. Sin embargo, actualmente se conoce que varios son los eventos que pueden estar asociados al establecimiento de la tolerancia. Así, cambios tanto cuantitativos estructurales y funcionales a nivel de receptores, como también alteraciones en proteínas adaptadoras y factores de transcripción enmarcados en las vías de señalización de los TLR4, son algunos de los procesos asociados con la disminución de citoquinas proinflamatorias y el incremento en citoquinas anti-inflamatorias.

3.2.4.b Vías de señalización intracelular

3.2.4.b.i Mediadores de señalización asociados a los TLR

La vía de transducción del receptor TLR4 desencadena una cascada de señales *downstream* utilizando dos proteínas adaptadoras diferentes, el MyD88 (*myeloid differentiation factor 88*) y el TRIF (*TIR domain-containing adaptor inducing IFN-β)*[174], definiendo así dos vías de señalización: vía de señalización MyD88-dependiente y señalización MyD88- independiente [128].

La señalización mediante el MyD88 dispara una cascada de mecanismos involucrando procesos de reclutamiento de las quinasas IRAK-1 e IRAK-4 (*IL-1 receptor-associated kinases*) permitiendo la activación de esta última que promueve la fosforilación y subsiguiente activación de IRAK-1. La activación de IRAK-1 promueve su disociación del complejo receptor permitiendo su interacción con nuevas proteínas adaptadoras como ser TRAF-6 (*TNF receptor-activated factor 6).* TRAF-6 dispara las vías de las MAPKs pudiendo de esta manera activar la vía del factor de transcripción AP-1. Por otro lado, vía MAPKs, se promueve la activación del complejo de kinasas inhibidor de IκB (IKK) que conducen a la degradación, por mecanismos de fosforilación y ubiquitinación, del factor inhibidor Iκ-Bα, permitiendo la activación del factor de transcripción NF-κB. Así, el factor liberado transloca a núcleo y promueve la transcripción de genes inflamatorios, tales como TNF-α, IL1-β, IL6, IL12[115,128].

La señalización a través del TRIF conduce a la activación de los factores de transcripción IRF3 (*interferon regulatory factor 3*) y STAT1 (*Signal transducer and activator of transcription 1*), los cuales a su vez inducen la expresión del gen de IFN-β y de genes inducibles por interferón como las quimioquinas CCL5 y CXCL10 y la expresión del gen iNOS[178,179 115,174]. Sin embargo, existe un *cross-talk* entre ambas vías y se ha propuesto que la señalización vía TLR4/MyD88 se asocia con una actividad en etapas tempranas del factor NF-κB y de la vía de las MAPKs, mientras que la vía TRL4/TRIF parece estar relacionada con la actividad transcripcional tardía del NF-κB y MAPKs luego de la administración del LPS[180].

Diferentes alteraciones en la señalización de los TR4 se han observado en modelos de tolerancia. Así, una disminuida formación del complejo TLR4/MyD88, una actividad disminuida de la quinasa IRAK1, defectos en la activación de las MAPKs y en los factores de transripción[22,181], son algunas de las alteraciones asociadas a un contexto tolerante. Los posibles mecanismos implicados en los defectos de las vías de señalización de los TLR son detallados y explicados en los párrafos siguientes.

3.2.4.b.ii Reguladores negativos de la señalización intracelular

Como se observó anteriormente, la tolerancia a endotoxina se encuentra asociada a una sobreexpresión de sustancias anti-inflamatorias, tales como IL10, TGF-β y GC, entre otras, que contribuyen a la desactivación de monocitos/macrófagos y a la supresión de citoquinas proinflamatorias[19]. Sin embargo, el descubrimiento de una variedad de reguladores negativos de las vías del TLR ha tomado relevancia en el fenómeno de la tolerancia[182-184]. De tal modo, inhibidores de la señalización del LPS como MyD88s, SHIP,

MKP1, SOCS-1 y 3 e IRAK-M, entre otros, han sido encontrados a ser *upregulados* en diferentes modelos de tolerancia a endotoxina, considerándolos de este modo, mediadores potencialmente relevantes en el fenómeno.

El mediador MyD88s constituye una variante de *splicing* del MyD88 denominada *MyD88 short* la cual carece de un dominio esencial para la interacción con IRAK-4. De esta manera el MyD88s se asocia al TLR4 pero no recluta y activa las kinasas IRAK actuando finalmente como un regulador negativo inhibiendo la activación del factor NF-κB[185,186]. Varios trabajos han descrito la inducción de MyD88s en monocitos humanos frente al tratamiento con LPS como también en monocitos de pacientes sépticos[186,187].

SHIP (*SH2-containing inositol phosphatase*) es un mediador producido en respuesta al TGF-β y ejerce su acción inhibitoria mediante la hidrólisis de la PI3K, mediador importante en la activación del factor NFκB mediante la vía TLR4/MyD88[188]. En modelos de ratón deficientes de SHIP se ha observado su relevancia, dado que no fue posible establecer el fenómeno de tolerancia[189].

El inhibidor MKP1 (*MAP kinase phosphatase 1*) ejerce su acción controlando la activación de la p38 MAP kinasa involucrada en la activación del factor AP-1[190] y se ha observado una inducción muy marcada en endotoxemia humana[191].

Los reguladores SOCS (*suppressor of cytokine signaling*) actúan inhibiendo la cascada de señalización JAK/STAT1 la cual se encuentra relacionada con la señalización TLR4/TRIF durante la fase tardía. Su relevancia se ha observado en ratones deficientes de SOCS-1 en los cuales no es posible establecer el fenómeno de tolerancia[192].

El mediador IRAK-M (*interleukin-1 receptor-associated kinase-M*) impide la disociación de IRAK-1 e IRAK-4 del MyD88 y por ende la formación del complejo IRAK-TRAF-6[103]. Se ha observado que la tolerancia a endotoxina es significativamente reducida en ratones deficientes de IRAK-M[103]. En estudios de tolerancia *in vitro* a partir de leucocitos humanos se ha observado una inducción del mediador IRAK- M durante el fenómeno de tolerancia[191]. Por otro lado, en monocitos de pacientes con sepsis la expresión de IRAK-M frente al estimulo con LPS ocurre más rápidamente comparando con monocitos provenientes de individuos sanos[102].

Estas consideraciones conjuntamente con la observación de un aumento de la susceptibilidad a un shock endotóxico en ratones *knock-out* para estos reguladores, sugieren la relevancia de estos factores en el fenómeno de tolerancia.

3.2.4.b.iii Inhibición del factor de transcripción NF-κB

El factor de transcripción NF-κB regula la expresión de un gran número de citoquinas proinflamatorias involucradas en la patogénesis de la inflamación. Dicho factor está

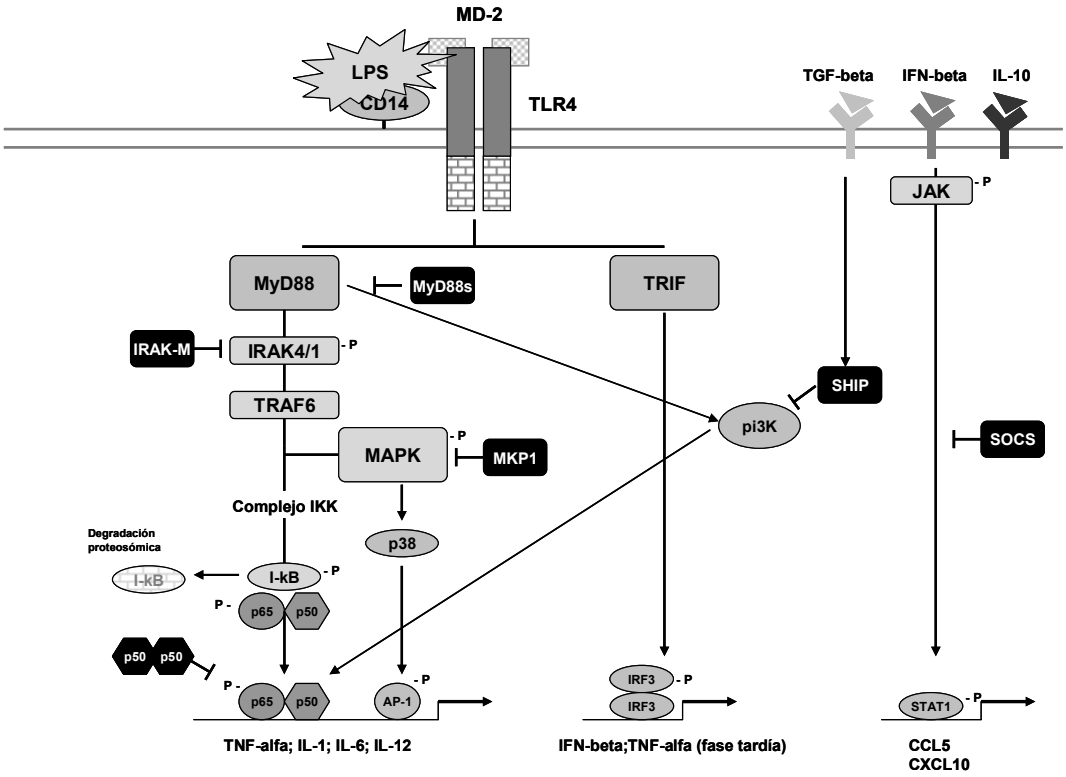
constituido por 2 subunidades de proteínas pertenecientes a la familia de proteínas de *transactivación* Rel (p65, p50, c-rel, relB and p52)[193] y puede expresarse como un heterodímero p65/p50 siendo la forma activa del factor, o bien como un homodímero p50/p50 siendo su forma inactiva. La conformación de homodímeros carece del dominio de *transactivación* y por ende no promueve la transcripción cuando se encuentra asociado a promotores de genes blanco. Así, la sobreexpresión de homodímeros p50/p50 ejerce un efecto inhibitorio sobre la expresión de genes proinflamatorios compitiendo con los heterodímeros p65/p50 por las regiones promotoras. Por otro lado, la activación y regulación de este factor de transcripción se encuentra rigurosamente controlada por un grupo de proteínas inhibitorias (Iκ-B) las cuales mantienen al NF-κB en el citoplasma, bloqueando la translocación nuclear[193].

Varios estudios han investigado el rol de dicho factor en el fenómeno de tolerancia demostrando una actividad disminuida en macrófagos murinos tolerantes a endotoxinas y monocitos humanos[19]. En un modelo de tolerancia en macrófagos de rata, la tolerancia, monitoreada por la producción de citoquinas, fue asociada con una debilitada activación del factor NF-κB y con una depleción de tanto las formas p65 como p50. Este trabajo sugirió que el fenómeno de tolerancia puede estar mediado limitando las cantidades disponibles de este factor para la activación, inhibiendo, de este modo, la transcripción de genes dependientes de NF-κB[194]. En otros trabajos el fenómeno de tolerancia estuvo asociado con un aumento de las formas inactivas del factor, el homodímero p50/p50 y una disminución del heterodímero p65/p50, su forma activa[101]. Por otro lado, varios estudios han demostrado que frente a la activación con LPS *in vitro,* pacientes con SIRS o cuadros de sepsis muestran un patrón de expresión del NF-κB que se asemeja al observado en el fenómeno de tolerancia: una *downregulación* global del NF-κB de su forma activa p65/p50, en pacientes que sobreviven a la sepsis, y una marcado aumento de la forma inactiva, p50/p50, en pacientes que no sobreviven[100,101,194].

Otro mecanismo asociado al establecimiento de la tolerancia es la observación de niveles elevados de proteínas inhibitorias Iκ-B en macrófagos tolerantes murinos y líneas celulares de monocitos humanos que conduce a la inactivación del factor NFκ-B[195].

Resulta interesante destacar que las consecuencias de la activación del factor NF-κB pueden ser diferentes dependiendo del contexto en el cual está siendo activado y, por ende, de la conformación (hetero u homodímero) que dicho contexto le impone. Así, mientras que los heterodímeros p65/p50 del factor NF-κB promueven la expresión de genes proinflamatorios como TNF-α e IL-12 durante la inflamación temprana, la predominancia de homodímeros p50/p50 de NF-κB durante el fenómeno de tolerancia ha

sido asociado no solo a la inhibición de la expresión de estos genes proinflamatorios sino que además, se ha demostrado que dicha conformación promueve la expresión de genes que codifican para mediadores anti-inflamatorios como ser TGF-β, IL-10 y COX2 [196]. Estas observaciones constituyen la idea de plasticidad funcional del factor NF-κB a través de diferentes estadios de la inflamación, hecho que podría conducir a macrófagos/monocitos a la adquisición de diferentes fenotipos, desde uno inflamatorio hacia uno anti-inflamatorio siendo este último un fenotipo asociado a un estado tolerante[23].



Esquema ilustrando las diferentes vías de señalización del receptor TLR4 y sus reguladores negativos en el fenómeno de tolerancia a endotoxina (ver texto).

3.2.5 Fenómenos de tolerancia cruzada

Por largo tiempo se ha acuñado la idea de que el fenómeno de tolerancia a endotoxina era específico al LPS. Sin embargo numerosas evidencias han permitido reconsiderar esta visión. Así, hoy el concepto de tolerancia cruzada o heterotolerancia (*cross-tolerance*) es una visión ampliamente aceptada[195]. Varios trabajos han reportado que

monocitos humanos tolerizados con LPS mostraron una capacidad disminuida, en términos de producción de TNF-α, frente a un estimulo con zymosán o frente a bacterias como *Streptococcus pyrogens*, y *Staphylococcus aureus* muertas por calor[138].

También se ha observado una tolerancia cruzada frente a la exposición con ligandos del receptor TLR2, vía de señalización para bacterias Gram-positivas. Así, macrófagos estimulados con ácido lipoteicoico (LTA), Pam3Cysk4 o MALP-2 (*Macrophage-activating lipopeptide*), todos ligandos para TLR2, se vuelven tolerantes a LPS[195,197]. Ahora bien, aunque se establece el estado tolerante, se han observado diferencias entre la tolerancia con LPS (Gram-negativas) y la tolerancia establecida con endotoxinas de bacterias Gram-positivas. A diferencia del LPS, en la tolerancia por Gram-positivas no se observa una disminución en la expresión del TLR, como tampoco se visualizan alteraciones en la interacción entre MyD88/TLR o sobre-expresión de homodímeros p50/p50 del factor NF-κB. Por el contrario, un mecanismo propuesto fue el bloqueo de la movilización del heterodímero p65/p50 del factor NF-κB[195,197,198].

En línea con esto, en pacientes con sepsis se ha reportado el fenómeno de tolerancia cruzada. Así, una disminuida producción de TNF-α fue observada en muestras de sangre entera provenientes de pacientes con sepsis luego de la infección con *Staphylococcus aureas*[4]. En otro estudio, monocitos de pacientes con sepsis mostraron una producción aumentada de IL-10 frente a la estimulación ex vivo con Pam3CysSK4[19].

El fenómeno de tolerancia cruzada también se ha observado que ocurre entre endotoxinas y citoquinas como TNF-α e IL-1β. En estudios con ratas *in vivo* se observó que inyecciones repetidas o infusión de TNF-α induce una protección frente a una dosis letal 50 (LD50) de LPS[199], suprime la fiebre inducida por LPS[200] y la producción de citoquinas por células adherentes derivadas de medula ósea[201]. Por otro lado, se ha observado que la IL-1β se encuentra involucrada en la inducción de la tolerancia tanto *in vivo* como *in vitro*[138,140,141].

3.2.6 Reversión del fenómeno de tolerancia

Varios trabajos han demostrado la reversión del fenómeno de tolerancia *in vitro* mediante el uso de IFN-γ o del factor estimulador de colonias de granulocitos (GM-CSF). Así, Hass y col. demostraron que el pretratamiento de una línea celular Mono Mac 6 con LPS e IFN-γ bloqueó la inducción de la tolerancia, a diferencia del pretratamiento solo con LPS[202]. Por otro lado, en monocitos humanos, Randow et al. observaron que el IFN-γ y el GM-

CSF fueron capaces de revertir el efecto del pretratamiento con LPS[38]. En trabajos recientes se ha demostrado que ambas citoquinas impiden la tolerancia inducida con bajas dosis pero no con altas dosis de LPS. Frente a bajas dosis actúan inhibiendo la degradación de IRAK y promoviendo su asociación con MyD88 después de una segunda estimulación con LPS, lo cual a su vez conduce a la activación del NF-κB y a la producción de TNF-α[203,204]. En trabajos *in vivo*, se observó que el tratamiento con ambas citoquinas restaura la respuesta sistémica del TNF-α en respuesta al LPS en ratones tolerantes[37].

En estudios *in vitro* el pretratamiento con IFN-γ de monocitos provenientes de pacientes con sepsis condujo a una producción aumentada de TNF-α en respuesta al LPS[28]. Tratamientos *in vivo* de pacientes con IFN-γ, luego de la admisión a unidades de terapia intensiva, condujo a una recuperación de la capacidad de las células para responder a una estimulación *ex vivo* con LPS y una restauración en los niveles de expresión de moléculas HLA-DR sobre la superficie de monocitos [28,205].

3.2.7 Implicancias clínicas

3.2.7.a Tolerancia a endotoxina y procesos infecciosos

Existe un debate en curso respecto de la relevancia clínica de la tolerancia a endotoxinas, dado que si bien es un fenómeno que promueve una atenuación de la gravedad de infecciones y otro tipo de insultos, por el contrario, otros estudios sugieren que la inducción de la tolerancia podría poner en riesgo la resistencia a nuevos procesos infecciosos[19].

Así, algunos trabajos reportaron niveles reducidos de IFN-γ en animales pretratados con LPS y desafiados con el virus de la enfermedad Newcastle[206]. Por otro lado, macrófagos pretratados con LPS presentaron una reducida actividad microbicida contra la bacteria *leishmania*[207], y un disminuido *clearance* pulmonar de *Pseudomonas aeruginosa* fue observado luego de una exposición a LPS[208].

Sin embargo, otros trabajos de investigación utilizando modelos de infección con *Cryptococcus neoformans*[209] o *Salmonella enteritidis*[210] han postulado que ratones tolerantes a LPS mostraron una resistencia aumentada a infecciones fúngicas y bacterianas, asociado con una reducida carga de patógenos dentro de los tejidos.

En base a esto, algunos autores consideran dificultoso asumir que la tolerancia a endotoxinas *per se* esté directamente asociada a la susceptibilidad aumentada a infecciones hospitalarias en pacientes con SIRS o sepsis. Sin embargo, existen evidencias que asocian al fenómeno de tolerancia a endotoxinas a una mayor incidencia de infecciones en pacientes de unidades de terapia intensiva que se encuentran cursando un cuadro de sepsis severa[4,60,211,212].

3.2.7.b Asociación con la inmunosupresión inducida en sepsis

Numerosos trabajos han reportado que el fenómeno de tolerancia a endotoxina es observado en leucocitos de pacientes que se encuentran cursando un cuadro de sepsis tardía[4,211]. Así, durante la fase predominantemente anti-inflamatoria (CARS), la cual puede eventualmente conducir a un estado de inmunosupresión, las células de la inmunidad innata muestran un fenotipo refractario al LPS denotando el fenómeno de tolerancia a endotoxina[211,213]. Monocitos de sangre entera provenientes de pacientes sépticos reflejan características del fenómeno de tolerancia observando una producción dramáticamente disminuida de citoquinas proinflamatorias, como TNF-α, IL-6, IL-1α, IL-1β y IL-12 frente a un desafío *ex vivo* con LPS, comparado con monocitos provenientes de voluntarios sanos. Asimismo, en este mismo contexto se ha reportado una elevada expresión de citoquinas anti-inflamatorias como IL-10, TGFβ y IL-1RA[91,211,214-217]. Por otro lado, y en concordancia con un estado tolerante, se ha observado una disminución en la expresión de moléculas MHCII, CD86 y CIITA en monocitos de pacientes con sepsis, datos que se correlacionaron con el *status* clínico[212,218].

Además, varios estudios han reportado mecanismos moleculares comunes entre las disfunciones observadas en células tolerantes inducidas con LPS y monocitos de pacientes con sepsis. En ambas condiciones se ha observado una predominancia del factor de transcripción NF-κB en su forma inactiva, siendo ésta la conformación de homodímeros p50/p50[100,101]. Otra característica compartida se encuentra asociada a la kinasa-M asociada al receptor de IL-1 (IRAK-M). Esta kinasa ha sido señalada recientemente como un inhibidor de la señalización del TLR4 y está implicada en mediar la tolerancia a LPS[103,219]. Notablemente en monocitos y macrófagos aislados de pacientes y de modelos experimentales con sepsis, respectivamente, se ha observado un aumento en la expresión de este inhibidor frente a una estimulo con LPS *ex vivo*[102,220].

Finalmente, varios trabajos han examinado la relevancia clínica del fenómeno de tolerancia en los procesos sépticos. En estudios utilizando pacientes hospitalizados en unidades de terapia intensiva se ha observado que los bajos niveles de TNF-α e IL-6

encontrados frente a un estimulo *ex vivo* con LPS pudo ser correlacionado con una estadía más prolongada en unidades de terapia intensiva, una prolongada ventilación mecánica, una mayor incidencia de infecciones clínicas, un elevado recuento de glóbulos blancos y un peor pronóstico y evolución de los pacientes[24-26].

3.2.7.c Fenómeno de tolerancia en diversas patologías: ¿Paradigma de la inmunosupresión?

El fenómeno de tolerancia a endotoxinas, como ya se describió previamente, es caracterizado por una reducción significativa en la capacidad inflamatoria del sistema inmune frente a una nueva exposición con la endotoxina. Sin embargo, este estado no se encuentra restringido solo a los procesos de sepsis, por el contrario ha sido observado en numerosas patologías tales como isquemia renal y hepática, oclusión coronaria, síndromes coronarios agudos, fibrosis quística, e incluso en cáncer[221-224]. Mientras que la tolerancia a endotoxinas ha sido pensada como un mecanismo protectivo contra el desarrollo de un shock séptico e isquemia, su incidencia está cada vez más asociada con un mayor riesgo de infecciones secundarias. Como ya se dijo anteriormente, en sepsis la mortalidad debido a infecciones secundarias está asociada con la incidencia de un estado tolerante[211]. De manera similar, en el síndrome pulmonar agudo y en fibrosis quística, el fenómeno de tolerancia se relaciona a una aumentada susceptibilidad a infecciones hospitalarias. Varios estudios han reportado algunos paradigmas mecanísticos comunes del fenómeno de tolerancia en diferentes enfermedades. Monocitos de pacientes con septicemia por Gram-negativas[102] y pacientes con síndrome coronario agudo[224], mostraron un rápido incremento en los niveles del regulador negativo IRAK-M y una diminuida producción de TNF-α. Estudios recientes reportaron un estado de tolerancia en monocitos de pacientes con fibrosis quística. Además de la refractariedad a la endotoxina, estos monocitos mostraron una debilitada presentación antigénica y una potente capacidad fagocítica[222]. En estudios de cáncer, los macrófagos asociados a tumor (TAM) mostraron un fenotipo inmunosuprimido similar al observado en un fenómeno de tolerancia. Estas células frente a una estimulación con LPS ex vivo mostraron una producción disminuida de citoquinas proinflamatorias tales como TNF-α, IL12p40 y un aumento en la expresión de citoquinas anti-inflamatorias como IL-10 y TGF-β[221]. Estos perfiles fueron explicados por una defectuosa activación del factor NF-κB debido principalmente por la sobreexpresión de homodímeros p50/p50 similar a la tolerancia[116,221,225].

Así, todas estas observaciones nos muestran la ocurrencia del fenómeno de tolerancia en diferentes patologías evaluadas, asociado en todos los casos con cuadros de desregulación inmune/inmunosupresión. Estos resultados también demuestran que el

fenómeno de tolerancia a endotoxina es más que una simple capacidad de respuesta inflamatoria alterada frente a una estimulo con LPS.

3.3.- Glucocorticoides

3.3.1 Características Generales

Los corticoides son compuestos lipofílicos derivados del colesterol producidos en la corteza de la glándula adrenal. Dentro de este grupo encontramos los mineralocorticoides, involucrados en el mantenimiento del equilibrio sodio-potasio y en el volumen de fluidos extracelulares, y los glucocorticoides (GC). La secreción de GC está regulada por el hipotálamo y la hipófisis a través de la vía CRH-ACTH. CRH (*corticotropin releasing hormone*) es un neuropéptido de 41 aminoácidos producido en el hipotálamo que estimula la secreción de ACTH (*adrenocorticotropic hormone*), sintetizada a partir de la prohormona propiomelanocortina (POMC), en las células corticotrofas de la adenohipófisis. La regulación de la síntesis y secreción de GC es, sin embargo, bastante más compleja e incluye otros múltiples factores. Los principales efectos biológicos de los GC se dan a nivel del metabolismo energético del organismo, crecimiento, reproducción, respuesta al estrés crónico, función cardiovascular, equilibrio hidroeléctrico, conducta, memoria, aprendizaje y regulación del sistema inmune.

3.3.2 Mecanismos moleculares de la acción de los glucocorticoides

Diferentes estudios han mostrado que la actividad de los GC puede ser dividida entre los efectos genómicos clásicos, mediado por los receptores de GC citosólicos, y los efectos no-genómicos identificados más recientemente[226-229]. A su vez esta acción no genómica puede ser dividida en tres diferentes modos de acción de los GC: efectos no-genómicos mediados por el receptor de glucocorticoides (GR), efectos no-genómicos no-específicos, y efectos que son considerados estar mediados por GR unidos a membranas celulares (mGR)[228,230].

3.3.2.a Acción genómica clásica de los glucocorticoides

El GR es un miembro de la familia de receptores de hormonas esteroideas clásicamente descrito como una proteína de 94 KDa expresada ubicuamente, aunque varios trabajos han identificado isoformas generadas por *splicing* diferencial[227,229,231]. En su conformación inactiva se encuentra en el citoplasma formando un complejo multiproteico con *heat*

shock proteins (Hsp), inmunofilinas, cochaperonas y distintas kinasas del sistema de las MAPKs [231]. El GR consiste de tres dominios con funciones diferenciadas: un dominio N-terminal de *transactivación*, un dominio central de unión a DNA (DBD) que contiene dedos de zinc y que también se encuentra involucrado en la dimerización del receptor, y un dominio C-terminal de unión al ligando (LBD). Como resultado del *splicing* alternativo del pre-RNAm del GR se han descrito al menos dos isoformas del GR denominadas GRα y GRβ. La isoforma GRβ no une GC y se considera que actúa como un inhibidor dominante de la actividad GRα mediante la formación de heterodímeros GRα/GRβ antagonistas[232]. Sin embargo hay algunas controversias respecto a la importancia del GRβ sobre la acción de los GC dado que dicho receptor no ha sido encontrado en todas las especies[233].

Por su naturaleza lipofílica los GC ingresan a la célula atravesando la membrana celular y se unen al GR. Una vez unido al ligando, el GR se disocia del complejo proteico de chaperonas y es translocado a núcleo para modular la expresión de genes específicos tanto positivamente (*transactivación*) como de manera negativa (*transrepresión*)[227,229,231].
La regulación positiva de la expresión de genes por GC ocurre mediante la unión directa de homodímeros del GR a secuencias específicas (elementos respondedores de glucocorticoides, GREs) en regiones del promotor de genes blancos. La interacción entre el GR y GRE resulta en el reclutamiento de co-activadores y factores basales de la transcripción que reclutan a la polimerasa II (Pol II) y disparan la iniciación de la misma[234]. Entre los genes regulados positivamente se encuentran tanto enzimas involucradas en la gluconeogénesis (ej: tirosina aminotransferasa, alanina aminotransferasa) como también agentes anti-inflamatorios como la lipocortina-1 y las interleuquinas IL-10 e IL-1ra, entre otros[235]. Por este mecanismo de *transactivación*, el GR puede además regular negativamente la expresión génica, induciendo la expresión de proteínas inhibitorias de vías de transducción de señales. En el sistema inmune, como ejemplos, encontramos a MKP-1 (*mitogen-activated protein kinase phosphatase 1)* que bloquea la señalización por las MAPKs[236,237] y al IκB que se une a los factores de transcripción NF-κB y los secuestra en el citoplasma[238,239].

Por otro lado, los GR pueden regular de manera negativa la expresión de genes mediante la unión a sitios GREs negativos, sitios que difieren en estructura y función de los GREs positivos. Algunos trabajos han demostrado que los GC inhiben la transcripción de genes inflamatorios como ser IL-1 e IL-2 a través de GRE negativos[240,241]. Por otro lado el gen del precursor de ACTH (POMC) y el gen de prolactina también se encuentran regulados

negativamente mediante sitios GREs negativos. Sin embargo, el principal mecanismo de regulación negativa o *transrepresión* por los GR es la inhibición de la actividad de otros factores de transcripción mediante una asociación directa con dichos factores interfiriendo de manera negativa en el mecanismo transcripcional. Algunos de los factores de transcripción con los cuales interactúa el monómero GR activado ejerciendo un efecto negativo son los factores NF-κB, AP-1 y IRF3 [242,243], entre otros.

3.3.2.b Acciones no-genómicas de los glucocorticoides

Varias evidencias sugieren que no todos los efectos observados por los GC pueden explicarse mediante un mecanismo de acción genómica clásica, tales como los efectos que se producen en muy corto tiempo, desapareciendo rápidamente su efecto y sin involucrar síntesis de proteínas.

Se han propuesto tres mecanismos diferentes no-genómicos para explicar los efectos rápidos anti-inflamatorios e inmunosupresores de los GC que no son compatibles con el mecanismo de acción genómica[228,244,245]: (i) las interacciones no específicas de los GC con las membranas celulares, (ii) los efectos no genómicos que están mediados por el GR citosólico y (iii) las interacciones específicas con un mGR.

3.3.2.b.i Interacciones no específicas de glucocorticoides con membranas celulares

Las membranas plasmáticas y mitocondriales son un tipo de blanco para los GC. En altas concentraciones los GC pueden intercalarse en las membranas afectando las propiedades fisicoquímicas y la actividad de proteínas asociadas a membranas[228,246]. Algunos trabajos han demostrado que dichos efectos sobre células del sistema inmune pueden contribuir a la inmunosupresión rápida y a la disminución de la inflamación[228]. Otros autores han señalado que el efecto de los GC a nivel de la membrana mitocondrial y la consiguiente disminución en los niveles de ATP puede contribuir a los resultados clínicamente relevantes en células inmunes afectando la síntesis de citoquinas, la migración y la fagocitosis, en condiciones tales como sepsis[247].

3.3.2.b.ii Efectos no-genómicos mediados por el GR citosólico

Como se describió previamente, el GR no activo se encuentra en citoplasma conformando un complejo multiproteico constituido por diferentes proteínas. Luego de la unión con el ligando, el GR se disocia del complejo proteico y finaliza en la translocación nuclear. En este mecanismo no-genómico se propone que ciertas proteínas que conforman el complejo, como ser Src y MAPK, una vez disociado, pueden ejercer sus

efectos de señalización y, por tanto, mediar las acciones rápidas no-genómicas de los GC[244].

3.3.2.b.iii Interacciones específicas con receptores de membrana (mGR)

La existencia de un GR asociado a membrana fue demostrado por primera vez en células de linfoma y leucemias[247], y mas tarde fue identificado sobre células mononucleares de sangre periférica humanas .Si bien su origen aún no es del todo conocido, algunas hipótesis postulan a los mGR como variantes del GR producidas por *splicing* diferencial o mediante edición post-transduccional[248].

Frente a la estimulación con LPS se ha observado un aumento en el porcentaje de monocitos positivos para mGR, sugiriendo que la inmunoestimulación promueve la regulación positiva y el transporte transcelular del mGR[248,249].

Trabajos recientes han demostrado la participación de este mecanismo en la inmunosupresión inducida por GC sobre células T tanto *in vivo* como *in vitro*, mediante la inhibición específica de kinasas asociadas a la vía de señalización del receptor TCR[250,251].

3.3.3 Efectos de los GC sobre la respuesta inmune

La respuesta de la inmunidad innata juega un rol clave en la fisiopatología de la sepsis y del estado de tolerancia y se encuentra marcadamente influenciada por la acción de los GC como así también por otros sistemas neuroendócrinos. Como se mencionó anteriormente, el reconocimiento de patógenos o bien de sus endotoxinas, como ser el LPS, ocurre a través de receptores de reconocimiento de patrones, entre los cuales se encuentran los receptores tipo *toll* (TLR). La activación de estos receptores desencadena una cascada de señalización en la que participan diferentes proteínas adaptadoras como proteínas kinasas que converge finalmente en la activación de factores de transcripción como el NF-κB, AP-1 e IRFs, los cuales activan la transcripción de genes que codifican para diferentes agentes inflamatorios, como ser quimioquinas y citoquinas. Estas últimas, son capaces de activar el eje hipotálamo-pituitaria-adrenal causando un incremento en los niveles sistémicos de GC[252,253]. Los GC tienen efectos anti-inflamatorios / inmunosupresores y se encuentran relacionados con la regulación homeostática del sistema inmune. Así, la elevación de los niveles de GC en plasma resulta en la supresión de diferentes mediadores proinflamatorios como citoquinas (TNF-α; IL-1; IL-6; IL-12; IFN-γ; IL-8) y diversas quimioquinas (MIP-1α, MCP-1, RANTES). Uno de los mecanismos centrales que presentan los GC para ejercer dicho efecto es mediante la inhibición de los

factores de transcripción encargados de la regulación de genes proinflamatorios vía mecanismos de *transrepresión* (ejemplo: AP-1; NF-κB)[146].

Además, los GC pueden ejercer su acción inhibiendo otros tipos de mediadores inflamatorios. Este es el caso de la inhibición de la formación de eicosanoides en diferentes tipos celulares lo que conduce a una disminución en la producción de PGE2[146]. Además, los GC limitan la producción de radicales libres como oxido nítrico (NO) o del anión superóxido. El efecto a nivel del NO refleja la inhibición de la producción de la oxido nítrico sintetasa (iNOS) por macrógafos, neutrófilos y otros tipos celulares[254,255]. Uno de los mediadores anti-inflamatorios inducido por GC involucrado en estos efectos es la lipocortina-1. Este, miembro de la familia de las anexinas, se pega a fosfolípidos y calcio pudiendo así asociarse a receptores de macrófagos y neutrófilos inhibiendo la formación de anión superóxido, alterando la capacidad de estallido respiratorio, y la formación de eicosanoides, disminuyendo la producción de PGE2[256]. Además se ha descrito que puede inhibir la migración de neutrófilos y la proliferación de linfocitos[257,258].

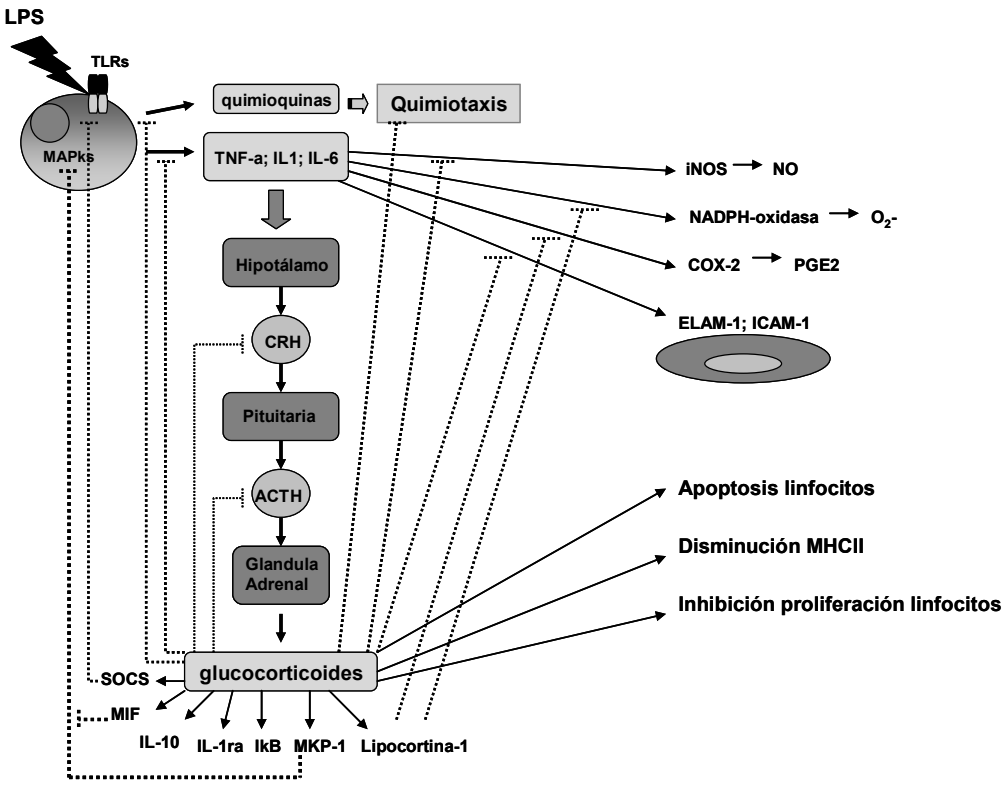
Varios trabajos han reportado que diferentes intermediarios de la cascada de señalización de los TLR también actúan como blancos importantes para los GC[253]. Uno de los mecanismos más caracterizados es la inducción de inhibidores endógenos de la vía de señalización de los TLRs. Un ejemplo clásico es la inducción del factor inhibitorio Iκ-B que secuestra al factor de transcripción NF-κB bloqueando su translocación al núcleo[239]. Como otros posibles blancos en la cascada de señalización se han reportado diferentes kinasas que participan en la vía de los TLR (JNK, p38), siendo inhibidas por la acción de los GC mediante mecanismos de desfosforilación[253]. Algunos autores proponen como posible mecanismo la inducción por GC de fosfatasas inhibitorias como ser la MKP-1 como se ha observado en células endoteliales y mastocitos[236,259]. Abraham *et. al.* observaron que el tratamiento con GC en macrófagos de ratón MKP-1 -/-, falló en inhibir la activación de p38 y JNK y la producción de mediadores inflamatorios inducido por LPS[260]. Además se observó que ratones MKP-1 -/- son extremadamente sensibles al desafío con LPS y parcialmente insensibles a los efectos anti-inflamatorios de GCs[261,262]. Sin embargo, y de manera paradójica, trabajos recientes han reportado la existencia de un mecanismo a través del cual los GC regulan su propia actividad anti-inflamatoria mediada por la fosfatasa MKP-1. Roger *et al.* han demostrado que los GC inducen el mediador MIF (*macrophage migration inhibitory factor*) una citoquina proinflamatoria que actúa inhibiendo la inducción de MKP-1 mediada por los GC[263].

Por otro lado, se han reportado mecanismos en los cuales los GC inducen la expresión de reguladores negativos como los SOCS-1(*suppressors of cytokine signalling*)[253]que inhiben la vía JAK/STAT involucrada en la señalización TLR4/TRIF[264].

A nivel celular, los GC inhiben la activación y proliferación de linfocitos T y B, inducen apoptosis de timocitos y controlan la apoptosis inducida por activación en la periferia[265]. Un factor clave inducido por GC asociado al aumento de apoptosis espontánea en timocitos es una proteína pequeña con un amplio espectro de actividades anti-inflamatorias llamada GILZ (*glucocorticoid-inducible leucine zipper*)[266,267]. Se postula que su mecanismo de acción es mediante una disminución en la expresión de factores anti-apoptóticos como el Bcl-X[268]. Por otro lado, varios trabajos han reportado un efecto clave de los GC ejerciendo una modulación negativa sobre la expresión de HLA-DR en monocitos, evaluado en diferentes cuadros clínicos inclusive en sepsis como así también mediante estudios *in vitro*[269-271]. Otros efectos de modulación negativa se han observado a nivel de receptores CD14 sobre monocitos/macrófagos[272] y a nivel de moléculas de adhesión (ELAM-1; ICAM-1) sobre células endoteliales[273]. Esto último se encuentra asociado con la capacidad de los GC de inhibir la adhesión de neutrófilos circulantes a endotelios, limitando así su migración hacia focos inflamatorios.

Un efecto paradójico ha sido reportado por varios trabajos los cuales han demostrado que los GC promueven la inducción del RNAm tanto del TRL4 como del TLR2 en diferentes tipos celulares[274-276] mediante mecanismos aún poco comprendidos[253]. Una explicación potencial para dicho efecto paradójico fue planeado por Bornstein *et al.* quienes demostraron la expresión de TLR4 y TLR2 en glándulas adrenales[277] y por Vakharia *et al.,* que observaron que el LPS y el ácido lipoteicoico pueden estimular de manera directa la liberación de GC de glándulas adrenales[278]. Así, estas observaciones acuñan la idea de la activación de un loop de *feed-back* positivo frente a la presencia de ligandos para TLR efecto que concluye como resultado neto en un incremento de la liberación de GC al torrente sanguíneo los cuales actuarán disparando diferentes mecanismos clásicos de reversión de la inflamación.

En concordancia con todo lo expuesto anteriormente, los GC regulan los procesos de inflamación evitando respuestas exacerbadas que, eventualmente, podrían conducir a un daño tisular concluyendo en una destrucción excesiva de tejidos[279]. Sin embargo, en procesos en los cuales ocurren alteraciones en los mecanismos de regulación y se producen niveles exacerbados de GC, sus efectos podrían pasar a ser peligrosos para el huésped pudiendo conducir a cuadros de inmunosupresión.



Resúmen esquemático de los efectos de los glucocorticoides. Frente a un estímulo inflamatorio (LPS) se induce la producción de diferentes citoquinas proinflamatorias (IL-1; TNF-α; IL-6) las cuales promueven la liberación de CRH (hormona liberadora de corticotrofina) a nivel de hipotálamo y de ACTH (hormona adrenocorticotrofina) en glándula pituitaria, finalizando en la producción de glucocorticoides a nivel adrenal. Los glucocorticoides inhiben la producción de citoquinas proinflamatorias y de mediadores inflamatorios inducidos por las mismas (NO; O^{-}_{2}; PGE2). También inhiben la quimiotaxis y la expresión de moléculas de adhesión (ELAM-1; ICAM-1). Por otro lado inducen mediadores que regulan negativamente la señalización de los TLRs (MKP1; SOCS; IκB), inducen apoptosis de células linfocitarias e inhibición de la proliferación y promueven una disminución en los niveles de MHCII a nivel de monocitos.

3.3.4 Relevancia de los glucocorticoides en los procesos de sepsis

En pacientes con sepsis severa o shock séptico la prevalencia de un cuadro inflamatorio exacerbado se encuentra presente. Esta disfunción se encuentra aparejada con cuadros de hipotensión, hipoperfusión, coagulación intravascular diseminada y, en ocasiones, puede presentarse un cuadro de disfunción orgánica que frecuentemente conduce a la muerte del paciente[1]. La participación de los GC en este proceso dinámico es encontrada bastante controversial. En estos síndromes se observa una activación del eje HPA que, en ocasiones, se encuentra asociado con altos niveles de GC en plasma. Esta respuesta serviría para la recomposición de la homeostasis inmune frente a la exacerbada inflamación. Sin embargo, varios trabajos han reportado que altos niveles de GC en plasma se encuentran asociados con la severidad de la enfermedad y un riesgo aumentado de muerte[35,270,280-282].

Por el contrario, otros trabajos han reportado la ocurrencia cada vez más frecuente de cuadros de insuficiencia adrenal en pacientes con shock séptico, encontrando bajos niveles de GC en plasma acompañado, eventualmente, por una resistencia a los GC a nivel de tejido. Este cuadro de insuficiencia adrenal promueve una exacerbada respuesta inflamatoria con un incremento en el daño tisular y disfunción de órganos[283,284].

Si bien los cuadros que se presentan en estos síndromes son de gran complejidad y muy dinámicos, presentando variaciones de distintos parámetros durante el curso de la enfermedad, un punto en el cual se ha focalizado desde hace años es en el control de la fase inflamatoria. Para ello se han desarrollado terapias utilizando GC abarcando diferentes estrategias en cuanto a dosis, tiempo de administración, tipo de GC y otras consideraciones[285]. Si bien continúa siendo un punto de mucha controversia, una estrategia adoptada y bastante aceptada es el uso de bajas dosis de hidrocortisona por un periodo de 7 días cada 6hs, observando efectos más favorables en cuanto a la tasa de mortalidad en pacientes con shock séptico que cursan con insuficiencia adrenal o con alteraciones hemodinámicas[73,285,286].

Ahora bien, relevando los 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, la tasa de mortalidad es mucho mayor en las fases predominantemente anti-inflamatorias[5,8,9,69]. Esta fase, denominada clásicamente CARS, ha sido utilizada para describir la fase inmunocomprometida o tolerante a endotoxinas asociada a procesos de sepsis o SIRS[4,23]. Clínicamente este estado se encuentra correlacionado, la mayoría de las veces, a un elevado riesgo de infecciones secundarias y mortalidad[4,17,21,23], hecho que le otorga relevancia al estudio y comprensión del fenómeno de tolerancia a endotoxina. Es conocida la participación de diversos agentes anti-inflamatorios durante esta etapa, entre los cuales se encuentran los GC. Sin embargo, en los estudios de procesos sépticos pocos trabajos han tenido en cuenta la participación de los GC, tomando siempre mayor protagonismo los diferentes perfiles de citoquinas anti-inflamatorias que se observan durante esta fase como actores involucrados en la inmunosupresión. Sin embargo, varios trabajos han demarcado no solo la prevalencia de altos niveles de GC en plasma de pacientes con sepsis, además han demostrado la existencia de una correlación entre los niveles hormonales con una peor evolución de la enfermedad[270,280] como así también con el deterioro del *status* inmune. Le Tulzo *et al.* reportaron en pacientes con sepsis que la disminución en la expresión de moléculas HLA-DR sobre monocitos circulantes se encuentra asociada a un peor pronóstico de la enfermedad y demostraron que los altos niveles de GC en plasma observados en estos pacientes, se

encuentran involucrados en el mecanismo que conduce a esa disminución en la expresión[270]. Otros reportes han denotado la existencia de un desbalance entre hormonas de origen adrenocortical en cuadros crónicos severos[34,280]. Los autores han observado una disminución en los niveles de hormonas inmunoestimuladoras, como ser la DHEA(S), y un aumento en los niveles de hormonas inmunosupresoras, como los GC. Estos resultados, según los autores, sugieren que la desregulación observada podría ser la causa de una aumentada susceptibilidad a complicaciones infecciosas durante las fases crónicas de la enfermedad, adjudicándole un rol relevante a los GC en este proceso[34].

3.3.5 Rol de los glucocorticoides en el fenómeno de tolerancia a endotoxina

Como se mencionó anteriormente, se ha reportado la relevancia clínica del fenómeno de tolerancia en procesos de sepsis, adjudicándole un rol crucial en los cuadros de inmunosupresión y en la susceptibilidad a reinfecciones observadas en sepsis tardías (CARS) [4,17,21,23].

Entre los posibles agentes implicados en la inducción del fenómeno de la tolerancia y el mantenimiento del mismo se encuentran los GC[32,151,160]. Varios trabajos han reportado el rol de los GC en la tolerancia. Así, Zuckerman *et. al.* demostraron un aumento en los niveles de GC en ratones tolerantes asociado con una regulación diferencial a nivel de la expresión de TNF-α e IL-1[151]. Se observó una correlación entre la caída abrupta de TNF-α en plasma con el aumento de los niveles de GC, mientras que la regulación de IL-1 se mostró bien diferente. Los niveles aumentados de esta citoquina frente al primer estímulo con LPS se correlacionaron con el aumento de los GC y frente a una segunda estimulación se observó un nuevo incremento en los niveles de IL-1, aún en presencia de altos niveles de GC. Este resultado puede verse relacionado considerando que las citoquinas proinflamatorias, como ser la IL-1β, estimulan, mediante la acción a nivel del eje HPA, la producción y liberación de GC a nivel adrenal[141]

Szabó *et al.* reportaron la inducción de altos niveles de GC en plasma de ratas tolerantes a endotoxinas y demostraron que dichos niveles de GC promueven la disminución de la expresión de iNOS enzima clave que se encuentra involucrada en las fallas cardiovasculares observadas frente al desafío con endotoxinas bacterianas[160].

Por otro lado, Evans *et al.* demostraron que en ratones adrenalectomizados no es posible establecer el fenómeno de tolerancia, mientras que, frente a la administración exógena de GC se logra restaurar la tolerancia en estos ratones[32]. Estos resultados demarcan la

relevancia de los GC en dicho fenómenos, sin embargo, algunos autores sostienen la existencia de mecanismos dependientes como independientes de GC en el fenómeno de tolerancia. Esto ha sido propuesto por la observación en experimentos con ratones tratados con galactosamina, compuesto que sensibiliza a los animales frente a una dosis de LPS, donde no es posible establecer la tolerancia a pesar de los altos niveles de GC en plasma[32].

De este modo, si bien existen evidencias de la importancia de los GC en la tolerancia a endotoxina, en la actualidad no se tiene una idea acabada en cuanto a la participación y acción de los mismos en el fenómeno. Este es el punto en el cual nos focalizaremos en este trabajo.

MATERIALES Y METODOS

4.- Materiales y Métodos

4.1 Reactivos

Estímulos, hormonas e inhibidores y drogas

Lipopolisacárido (LPS) de Escherichia coli O111:B4 (Sigma-Aldrich; St Louis, MO, USA); Mifepristone [RU486-17-hydroxy-11-(4-dimethylaminophenyl) 17-(1-propynyl) estra-4,9-diene-3-one] (Sigma-Aldrich; St Louis, MO, USA); caldo de tioglicolato (Sigma-Aldrich; St Louis, MO, USA); glucocorticoide sintético dexametasona (Dex; Decadrón Shock; from Sidus S.A.; Buenos Aires, Argentina); Dexametasona pura (Sigma-Aldrich; St Louis, MO, USA); Dexametasona-[3H]
([Dex-3H]; New England Nuclear; Boston, MA, USA) con una actividad específica de 35.00 Ci/mM (1254·00 GBq/mM); Ciclofosfamida (Lab Kampel Martian; Buenos Aires, Argentina); gemcitabina (Gemtro®; Eli Lilly and Company; Indianápolis, IN); Glóbulos rojos de carnero (GRc) (Alfredo Gutierrez®; Buenos Aires, Argentina).Todos los reactivos fueron preparados en solución fisiológica libre de pirógeno. El mifepristone fue preparado en propilenglicol a 37°C. La dexametasona pura y Dex-3H fueron preparadas en etanol.

4.2 Citoquinas, anticuerpos y productos relacionados

IFN-γ recombinante murino (PeproTech Inc. Mexico, DF); anticuerpo anti-TNF-α murino preparado en conejo (PeproTech Inc. Mexico, DF); receptor soluble TNF-α (sTNFR-Etanercept; Wyeth Pharmaceuticals Inc. Collegeville, PA, USA); TNF-α recombinante murino, (Sigma-Aldrich; St Louis, MO, USA). Todos los reactivos fueron preparados en solución fisiológica libre de pirógeno y utilizados en diluciones para cultivo celular preparados con medio completo.

4.3 Anticuerpos para citometría de flujo

Los siguientes anticuerpos monoclonales (mAb) fueron usados: anti-CD11b ratón conjugado con FITC (BD-Pharmingen; San Diego,CA); anti-Ly6G (GR-1) ratón conjugado con PE (BD-Pharmingen; San Diego,CA); anti-F4/80 ratón conjugado con PE/Cy5 (Bio Legend; San Diego, CA); anti-CD4 ratón conjugado con FITC (BD-Pharmingen; San Diego,CA); anti-CD25 ratón conjugado con PerCP (BD-Pharmingen; San Diego,CA); anti-CD3 ratón conjugado con PerCP (BD-Pharmingen; San Diego,CA); anti-B220 ratón conjugado con FITC (BD-Pharmingen; San Diego,CA); anti-Foxp3 ratón conjugado con PE (eBioscience; San Diego, CA). Para la tinción intracitoplasmática de Foxp3 se utilizó un Set de fijación/permeabilización de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Set Buffer de tinción Foxp3; eBioscience; San Diego, CA). Para la detección de anticuerpos

en suero utilizamos los siguientes anticuerpos: anticuerpo monoclonal (mAb) anti-inmunoglobulina (Ig) M conjugado con PE preparado en rata (BD-Pharmingen; San Diego, CA, USA); anticuerpo policlonal anti-Ig conjugado con FITC, preparado en cabra (Jackson Immuno-Research Laboratorios; West Grove, PA, USA); anticuerpo policlonal anti-IgG conjugado con FITC, preparado en cabra (Jackson Immuno-Research Laboratorios; West Grove, PA, USA)

4.4 Solución fisiológica

La solución fue preparada con NaCl 8,5 g/l.

4.5 Solución Buffer Fosfato (PBS).

La solución fue preparada con NaCl 0,138 M; KCl 0,027M; Na2HPO4 0,078M y KHPO4 0,015 M; pH = 7,4.

4.6 Solución de Türk para el recuento de células.

Se preparó una solución con violeta de genciana (100 mg), ácido acético glacial (31,25 ml) y agua destilada (500 ml). Para el recuento de células se realizaron diferentes diluciones en esta solución y se procedió al recuento en cámara de Neubauer.

4.7 Solución de azul Tripán.

La misma se preparó a partir de dos soluciones madres con el siguiente contenido: solución A, azul Tripán: 0,14%; solución B, cloruro de sodio: 4,25%. La solución de trabajo se obtuvo mezclando 4 partes de A y una parte de B. Para el recuento celular y la determinación de la viabilidad celular se realizaron diferentes diluciones en esta solución y luego, se procedió al recuento diferencial de las células que excluían el colorante (células viables) y de aquellas que lo incluían (células muertas).

4.8 Medio de cultivo completo.

Se empleó medio de cultivo RPMI 1640 (GIBCO, Invitrogen, Argentina) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) (GIBCO, Invitrogen, Argentina), inactivado por calentamiento a 56ºC durante 30 minutos, penicilina estreptomicina (Penicilina G 10.000 U/ml; Sulfato de estreptomicina 10.000 µg/ml en 0,85% de solución fisiológica) (GIBCO, Invitrogen, Argentina).

4.9 Buffer de lisis de eritrocitos

$ClNH_4$ 0.15M; $NaHCO_3$ 10mM; EDTA 0.1mM. Ajustar a pH: 7.3. Agregar 2ml por pellet de bazo e incubar por 5 minutos en hielo. Frenar la reacción por el agregado de SF-SFB10%.

4.10 Animales

En este estudio se utilizaron ratones provenientes del Bioterio del Departamento de Medicina Experimental, Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires, Argentina. Los animales utilizados en este trabajo fueron ratones de la cepa BALB/c, hembras y/o machos de entre 12-16 semanas de edad. Todos fueron criados en condiciones de luz y temperatura estándar con un ciclo de 12hs. luz-oscuridad a 22 ± 2ºC con comida y agua administrada *ad limitum.* Los experimentos realizados en este estudio fueron realizados de acuerdo a los principios establecidos en la Guía para el Cuidado y el uso de animales de laboratorio[287].

4.11 Modelos de tolerancia a endotoxina

Modelo de tolerancia clásico: los ratones fueron tolerizados mediante la inoculación intraperitoneal (i.p.) de dosis subletales de LPS (0,2mg/kg) durante 4 días consecutivos. Veinticuatro horas después de la última inoculación, los animales se mostraron resistentes al desafío con una dosis letal de LPS (LD) (2 LD_{50} = 8 mg/kg i.p.).

Modelo de tolerancia /inmunosupresión: Dado que la inmunosupresión es un efecto cuantitativo que depende del número de dosis y la concentración de las inoculaciones de LPS, desarrollamos un modelo que mostró una mayor inmunosupresión mediante el tratamiento con diferentes dosis de LPS durante 13 días consecutivos. El régimen de inoculación comenzó con 0,2mg/kg i.p. de LPS por los primeros 3 días seguido por 4 mg/kg i.p de LPS durante los 9 días restantes.

4.12 Estudios de letalidad

Los ratones fueron inoculados de manera i.p. con una dosis letal de LPS (2 LD_{50} = 200 µg) y se observaron hasta 72hs después de la dosis letal. Esta dosis indujo un 100% de mortalidad entre las 24hs y 48hs posteriores a la inyección. El mismo lote de LPS fue utilizado a lo largo de todos los experimentos.

4.13 Macrófagos peritoneales de ratón estimulados con tioglicolato

Los ratones fueron inoculados de manera intraperitoneal con 2 ml de caldo de tioglicolato al 3% (peso/vol). Luego de 4 días los animales fueron sacrificados y la células se

obtuvieron mediante sucesivos lavados peritoneales con una solución de buffer fosfato salino (PBS) frío suplementado con antibióticos penicilina/estreptomicina (Penicilina G 10.000 U/ml; Sulfato de estreptomicina 10.000 µg/ml en 0,85% de solución fisiológica). Luego las células fueron lavadas y contabilizadas en cámara de Neubauer utilizando una solución de azul tripán.

Las células fueron colocadas en placas de cultivo de 48 well (Costar, Cambridge, MA, USA) a una concentración de$2.5x10^5$ células /well en medio competo (200µl/well) e incubadas por 24hs a 37°C en una atmósfera a 5% CO_2. Luego las células fueron lavadas con PBS para remover las células no adherentes y mediante criterios morfológicos y de tinción con colorante de Turk, más del 90-95% de células adherentes fueron macrófagos.

4.14 Determinación de la secreción de TNF-α

Para cuantificar la actividad del TNF-α se realizó un bioensayo de citotoxicidad de L-929 modificado como se describió previamente[288]. Se utilizó la línea L-929 de fibroblastos murinos sensibles a la acción citotóxica del TNF-α, mantenida en crecimiento en presencia de medio completo, 2 mM de L-glutamina y 5µg/ml estreptomicina y 5U/ml penicilina. Las células L-929 en crecimiento exponencial fueron tratadas con tripsina (0,25%-EDTA). Luego, de inactivar la tripsina con 10% de SFB, las células se lavaron. Se sembraron $1.8x10^4$ por well en placas de 96 pocillos a razón de 100 µl por pocillo y se incubaron a 37ºC y 5% de CO_2 durante 18 hs. para permitir la formación de una monocapa de células en la superficie de cada pocillo. Luego, se agregaron 100 µl de medio sólo (control células viables) o sobrenadantes de macrófagos peritoneales tratados en diluciones seriadas. A cada pocillo se le adicionó 1 µg/ml de Actinomicina D (AmershamBiosciences; Piscataway, NJ, USA). Las placas fueron incubadas durante 24 hs a 37ºC. Transcurrido ese tiempo, se removieron las muestras, las células muertas fueron eliminadas por lavados y las monocapas fueron fijadas y teñidas con Violeta de Genciana 0,2 % en metanol 20%. Las placas se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente en presencia del colorante. El exceso de colorante se eliminó por repetidos lavados con agua. Posteriormente, las células teñidas se despegaron por el agregado de 50 µl de ácido acético 30% y una leve agitación. Finalmente, la absorbancia fue medida en un espectrofotómetro a 550 nm de longitud de onda (Organon Tecnika, Argentina). El título de actividad de TNF-α expresado como unidades líticas /ml (UL/ml) fue calculado a partir del valor recíproco de la dilución necesaria para obtener una lisis celular del 50%.

4.15 Ensayos de ELISA

Muestras de sangre de ratones tratados bajo diferentes protocolos fueron colectadas en tubos heparinizados para la obtención de plasma. Luego las muestras de plasma colectadas fueron almacenadas a -20°C hasta su uso. La cuantificación de los niveles de citoquinas en dichas muestras fue realizada mediante ensayos de ELISA en placas de poliestireno de fondo plano, de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Para IL-10 y TNF-α se utilizaron Sets de ELISA proveniente de BD Biosciences (OptEIA set; BD Biosciences; San Diego, CA, USA); para la detección de IFN-γ e IL-12p70 se utilizaron Sets de ELISA proveniente de eBioscience (ELISA Ready-SET-Go!; eBioscience; San Diego, CA)

4.16 Medición de corticosterona en plasma

Muestras de plasma provenientes de ratones tratados bajo diferentes protocolos fueron preparadas a una dilución 1:500 y los niveles de corticosterona fueron determinados mediante un kit de inmunoensayo enzimático, según las indicaciones del fabricante (corticosterone Enzyme Immunoassay Kit, (EIA); Assay Designs, Inc.; Ann Arbor, MI 48108, USA)

4.17 Ensayo de cromatografía por filtración molecular

Seroalbúmina bovina al 10% (BSA, PM = 66KDa), o de ^{3}H-dexametasona fueron pasadas por una columna de 1,7g de Sephadex G-10 (diámetro de partículas: 40-120 μ), con el fin de determinar el volumen de exclusión de la columna -con BSA- (900-1000 ul), así como el volumen de aparición de la ^{3}H-dexametasona (1400ul).

4.18 Macrófagos, tolerización y tratamientos con inhibidores de TNF-α

Las monocapas de macrófagos peritoneales fueron pretratadas con anticuerpo anti-TNF-α (14μg/ml), receptor soluble de TNF-α (Etanercept, 12.5μg/ml) o medio solo durante 15 minutos en medio completo. Luego se adicionó a los cultivos 20ng/ml de LPS y se incubaron por 20hs a 37°C y 5% CO_2. Finalmente las células fueron lavadas 3 veces con PBS y reestimuladas con LPS 100ng/ml en medio completo durante 6 hs. Los sobrenadantes fueron colectados y se determinó la actividad biológica del TNF-α mediante un ensayo de citotoxicidad con L-929.

4.19 Macrófagos tolerantes y tratamiento con IFN-γ

Macrófagos peritoneales fueron pretratados con 20ηg/ml de LPS o solución fisiológica en medio completo durante 20hs. Luego las monocapas fueron lavadas 3 veces con PBS y se incubaron durante 18hs con IFN-γ murino (500U/ml). Finalmente las células fueron

lavadas y reestimuladas con 100ng/ml de LPS por un período de 6hs. La reestimulación se realizó a diferentes tiempos luego del estímulo con la citoquina a) 0hs,b) 24hs o c) 72hs. Los sobrenadantes fueron colectados y se determinó la actividad biológica del TNF-α mediante un ensayo de citotoxicidad con L-929.

4.20 Macrófagos tratados con LPS y Dex

Los macrófagos fueron tratados con 40µg/ml de dexametasona (Dex) por 30 minutos, luego las células fueron lavadas, o no, y 20ng/ml de LPS fueron adicionados a los cultivos y se incubaron por un período de 6hs. Luego de este tiempo, los sobrenadantes fueron colectados y se determinó la actividad biológica del TNF-α mediante un ensayo de citotoxicidad con L-929.

4.21 Obtención de células de Bazo

Los bazos fueron removidos en condiciones de esterilidad y fueron disgregados mediante el pasaje a través de una malla estéril con SF-SFB10% a fin de obtener un única suspensión celular. Luego las células fueron lavadas con SF-SFB10% y se centrifugaron 1250rpm por 10minutos. El pellet celular fue resuspendido y se lisaron los eritrocitos mediante la adición de un buffer de lisis. Luego se lava y se resuspende el pellet en volumen de medio completo conocido y se cuentan las células.

4.22 Proliferación de esplenocitos

Esplenocitos ($2x10^5$cells/well) fueron incubados en 200µl de medio completo sobre microplacas de 96 wells fondo redondo en presencia o ausencia de 10ul de GRc ($2 x10^5$cells/well). Para los ensayos con Concanavalina A (CoA) los esplenocitos se incubaron en 200µl de medio completo sobre microplacas de 96 wells plano en presencia o ausencia de 1µg/ml de CoA. Las células se incubaron 72 horas a 37°C adicionando 1uCi [3H] timidina (10ul) 18h antes de la cosecha de las células. La actividad proliferativa se calculó midiendo la incorporación de timidina y los datos fueron expresados como el delta de c.p.m. en el que la media de los pozos que no recibieron la estimulación se restó de los valores experimentales.

4.23 Ensayo de hemoaglutinación

Las muestras de suero de ratones inmunizados fueron inactivadas a 56°C por 30 minutos. Para la evaluación de la respuesta primaria, los sueros fueron diluidos al medio de manera seriada usando PBS-BSA 0,2%. Luego, 50µl de cada dilución se colocaron en microplacas de 96 wells de fondo redondo, y se adicionó, a cada well, 50µl de una suspensión de GRC 0,25% en PBS-BSA. Las placas fueron incubadas por 24hs a

temperatura ambiente y el título de anticuerpos fue considerado como el valor recíproco de la última dilución positiva. Para el ensayo de respuesta secundaria los sueros fueron preparados en una dilución inicial 1:50 y fueron seriadamente diluídas en una relación 1:0,25.

4.24 Citometría de flujo

*Anticuerpo*s. Para la determinación de las inmunoglobulinas (Ig) y los isotipos IgG y IgM anti-GRc las muestras de suero fueron preparadas en diferentes diluciones en PBS–BSA 0,5%. Luego, 10µl de suero fueron incubados con 3µl de GRc 1% (PBS-BSA 0.5%) por 30 minutos a 4°C. Las células fueron lavadas 3 veces, se adicionaron los anticuerpos anti-IgM (PE), anti-IgG (FITC) o anti-Ig (FITC) y se incubaron por 30 minutos a 4°C. Luego fueron lavadas y las Ig fueron evaluadas.

Células. Los esplenocitos fueron teñidos con una combinación de los siguientes anticuerpos: anti-CD11b FITC, anti--Ly6G (GR-1) PE y anti-F4/80 PE/Cy5. Este último se utilizó para la exclusión de poblaciones de macrófagos. Para evaluar las células T regulatorias se usaron anti-CD4 FITC, anti-CD25 PerCP y anti-Foxp3 PE. También se realizaron marcaciones con anti-CD3 PerCP y anti-B220 FITC para la determinación de poblaciones linfocitarias T y B respectivamente. Las células fueron incubadas en 10µl de PBS-1% de suero normal por 15 minutos, luego se adicionaron los anticuerpos correspondientes y se incubaron por 30 minutos a 4°C. Para el análisis de fagocitosis las células se incubaron con zymosán-FITC durante 30 minutos a 37°C luego de la marcación de superficie. Se lavaron y se fijaron en PBS-0,5% de paraformaldheido (PFA) y fueron evaluadas en un FACScan Becton Dickinson usando el software FSC Express (Software De Novo, Los Angeles, CA). Para la tinción intracitoplasmática de Foxp3 las células fueron incubadas con un set de fijación/permeablilización de acuerdo a las instrucciones del fabricante.(Foxp3 Staining Buffer Set; eBiosciences).

4.25 Ensayos *in vivo*

4.25.1 Protocolo de tratamiento con Dex y dosis letal de LPS

En este esquema ratones vírgenes fueron inoculados de manera i.p. con un dosis de Dex (2,5mg/Kg) y a diferentes tiempos (0hs, 3hs, 5hs, 10hs y 24hs) fueron desafiados con una dosis letal de LPS (8mg/Kg;i.p.). Se evaluó la mortalidad de los diferentes grupos hasta 72hs después de la exposición a la dosis letal. Se llevó en paralelo un grupo control tratado solo con Dex y otro tratado solo con la dosis letal de LPS. En algunos grupos experimentales se determinaron los niveles de citoquinas y para esto se colectaron muestras de plasma 90minutos después del desafío con la dosis letal.

4.25.2 Tratamiento con Dex y Mifepristone (RU486) en el establecimiento de la tolerancia

Tratamiento con Dex: Los ratones fueron inyectados con una dosis tolerizante de LPS (0,2mg/Kg) de manera intraperitoneal. La endotoxina fue administrada sola o en simultáneo con Dex (2,5mg/Kg; i.p.) por un período de 4 días. Un grupo control fue inoculado solo con solución fisiológica. Un segundo esquema experimental consistió en la administración de una dosis de Dex y 24hs después una dosis de LPS tolerizante extendiendo esta secuencia de tratamientos por un período de 10 días. Se llevó en paralelo un control de tolerancia. Después de 24 hs. de la última dosis de LPS todos los grupos recibieron una dosis letal de LPS (8mg/kg; i.p.) y la mortalidad fue evaluada hasta las 72hs. En el esquema de inoculación simultánea se determinaron los niveles de citoquinas y para esto se colectaron muestras de plasma 90 minutos después del desafío con la dosis letal.

Tratamiento con RU486: En un esquema similar al anterior, ratones fueron inoculados con una dosis de RU486 (12mg/Kg; vía subcutánea, s.c.) de manera simultánea con una dosis de LPS tolerizante (0,2mg/Kg; i.p.) durante 4 días consecutivos. Un grupo de ratones recibió solamente la dosis de LPS como control de tolerización. Un segundo grupo recibió solamente el esquema de inoculación de RU486. Luego, 72hs de la última dosis tolerizante, todos los grupos recibieron una dosis letal de LPS (8mg/kg; i.p.) y la mortalidad fue evaluada hasta las 72hs. En algunos grupos experimentales se determinaron los niveles de citoquinas y para esto se colectaron muestras de plasma 90minutos después de cada dosis de LPS tolerizante.

4.25.3 Tratamiento con mifepristone (RU486) en el mantenimiento de la tolerancia

Seis grupos de ratones fueron tolerizados con LPS (0,2mg/Kg; i.p.) por un período de 4 días. Veinticuatro horas después de la última dosis de LPS, fueron inoculados con mifepristone (RU486) (12 mg/kg; s.c.) y a diferentes tiempos los grupos fueron desafiados a una dosis letal de LPS (8 mg/kg i.p.). Se evaluó la mortalidad hasta 72hs después de la exposición a la dosis letal. Un grupo control de ratones tolerantes fue inoculado con una dosis de propilenglicol (vehículo de RU486) y todos los animales sobrevivieron a una dosis letal de LPS. Un grupo de ratones vírgenes fue inoculado con solución fisiológica en lugar de las dosis tolerizantes de LPS y fueron desafiados a una dosis letal de LPS. En todos los grupos experimentales se determinaron los niveles de citoquinas y para esto se colectaron muestras de plasma 90 minutos después del desafío letal de LPS.

4.25.4 Tratamiento con RU486 e inmunización en ratones tolerantes/inmunosuprimidos con LPS: Respuesta primaria

Los ratones fueron tolerizados/inmunosuprimidos con LPS (0,2mg/kg i.p. por los primeros 3 días, siguiendo con 4 mg/kg i.p. de LPS por 9 días). Luego, 24hs después de la última dosis de LPS fueron inoculados, o no, con RU486 (30 mg/kg i.p.) y 30 minutos más tarde fueron inmunizados con glóbulos rojos de carnero (GRc) ($5x10^8$ células /ratón; i.p.).Veinticuatro y 30 hs. después de la inmunización, los ratones fueron tratados nuevamente con RU486. Un grupo control de ratones vírgenes fue tratado, o no, con RU486 e inmunizados utilizando el mismo esquema. Finalmente, 7 días después de la inmunización los animales fueron sangrados y se determinaron anticuerpos en plasma mediante un ensayo de hemoaglutinación y por citometría de flujo.

4.25.5 Tratamiento con RU486 e inmunización en ratones tolerantes/inmunosuprimidos con LPS: Respuesta secundaria

Los animales fueron primero inmunizados con una suspensión celular de glóbulos rojos de carnero en PBS (GRc; $5x10^8$células/ratón; i.p.). El esquema de inmunosupresión con LPS comenzó 15 días después de la inmunización. Luego, 24hs después de la última dosis de LPS los ratones fueron tratados, o no, con RU486 (30mg/Kg; i.p.) y 30 minutos más tarde fueron inmunizados con una segunda dosis de GRc ($5x10^8$células/ratón; i.p.). Veinticuatro y 30 hs. después de la segunda inmunización, los ratones fueron tratados, o no, nuevamente con RU486.Un grupo control de ratones no inmunosuprimidos fueron inoculados con GRc utilizando el mismo esquema. Luego, 7 días después de la segunda inmunización los animales fueron sangrados y se colectaron muestras de plasma para evaluar la respuesta humoral secundaria mediante un ensayo de hemoaglutinación y por citometría de flujo.

4.25.6 Respuesta inmune celular y tratamiento con RU486 en ratones tolerantes/inmunosuprimidos con LPS

Tumor MC-C: fibrosarcoma inducido por metilcolantreno obtenido en un ratón BALB/c con 5 meses de edad. Los tumores fueron usados entre los pasajes 5-25 (pasajes subcutáneos). Secciones de tumor no necróticas fueron pasadas y picadas a través de una malla estéril en flujo laminar para la obtención de una única suspensión celular. Luego, para la inmunización las células tumorales fueron irradiadas como se describió previamente[289].

Animales tolerantes/inmunosuprimidos con LPS fueron tratados, o no, con RU486 (30mg/Kg; i.p.) y 30 minutos más tarde fueron inoculados con células tumorales MC-C irradiadas (inmunización; $6x10^6$ células/ratón; s.c.). Veinticuatro y 30 hs. después de la

inmunización, los ratones fueron tratados, o no, nuevamente con RU486. Siete días después de la inmunización, los ratones fueron desafiados con células tumorales MC-C viables ($2x10^5$ células/ratón; s.c.) y tratados, o no, con RU486 utilizando el mismo esquema definido para el paso de inmunización. Ratones vírgenes fueron inmunizados y desafiados usando el mismo protocolo. Un grupo control fue desafiado con células tumorales MC-C viables. Luego, 10 días después del desafío evaluamos el crecimiento tumoral considerando presencia o ausencia de tumor.

4.25.7 Tratamiento con drogas citostáticas en ratones tolerantes

Ratones tolerantes/inmunosuprimidos con LPS fueron tratados con ciclofosfamida (150mg/Kg, i.p.), gemcitabina (120mg/Kg, i.p.) o solución fisiológica 24hs después de la última dosis de LPS. Ratones vírgenes fueron tratados, o no, con el mismo esquema. Luego de 48hs, dependiendo del experimento, los animales fueron sacrificados para la obtención de esplenocitos, o fueron desafiados con una dosis letal de LPS

4.25.8 Tratamiento con drogas citostáticas durante el establecimiento de la tolerancia

Los ratones fueron inoculados con ciclofosfamida (100mg/Kg, i.p.), gemcitabina (120mg/Kg, i.p.) o solución fisiológica y 48hs después los animales fueron inoculados con una dosis tolerizante de LPS (0,2mg/Kg; i.p.) concomitantemente con una dosis adicional de la misma droga. Ratones vírgenes fueron tratados, o no, con el mismo esquema de drogas. El protocolo incluyó 2 dosis adicionales de LPS y 48hs más tarde los animales fueron sacrificados para la obtención de esplenocitos, o desafiados con una dosis letal de LPS

4.26 Análisis estadísticos

Los valores son expresados como la media ± error estándar de la media (s.e.m.) de *n* observaciones. La significancia estadística entre muestras de TNF-α medidas por ensayo de L929 fue determinada usando un Test Friedman no paramétrico seguido por un test de Wilcoxon.

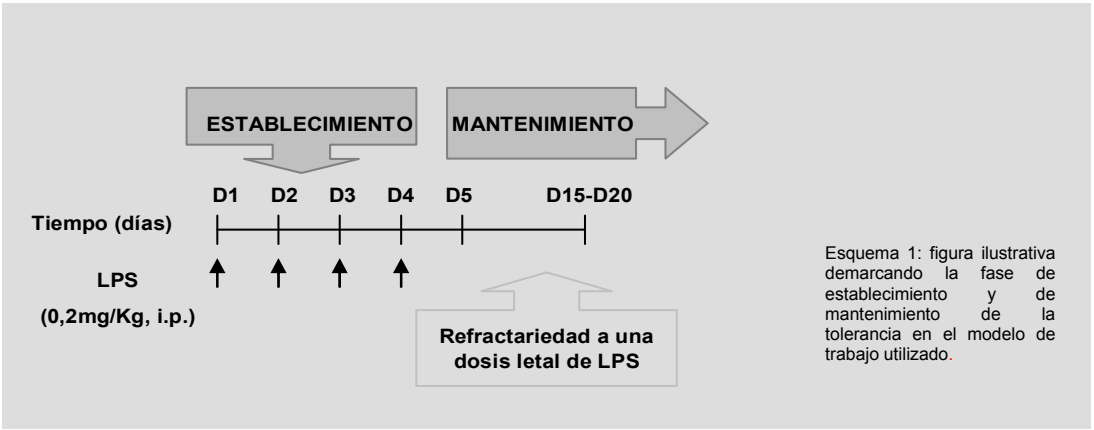
Los ensayos de ELISA y hemaglutinación fueron analizados utilizando un test Mann-Whitney no pareado. Las diferencias entre grupos de los análisis de citometría y ensayos de proliferación fueron evaluadas mediante t Test de Student no pareado o bien un análisis de varianza seguido por un test de comparación múltiple de Tukey. Las diferencias en la frecuencia del tumor se determinaron mediante la prueba de Chi cuadrado. Todas las pruebas estadísticas fueron interpretados de forma de dos colas y $P < 0.05$ fue considerado significativo.

RESULTADOS

5.- Resultados

Con el fin de permitir una mejor comprensión de los procesos a los cuales nos referiremos, definiremos algunos términos que serán utilizados a lo largo del trabajo. Así, hablaremos de **Establecimiento** y de **Mantenimiento** de la tolerancia.

La etapa de **establecimiento** la definimos como la fase en la cual se genera o induce el estado de tolerancia. En nuestro esquema de trabajo esta fase transcurre desde el momento en el cual el animal se empieza a inocular de manera diaria con dosis subletales de LPS hasta que se establece una robusta tolerancia (3-4 días). Por otra parte, la etapa de **mantenimiento** la definimos como la fase en donde la tolerancia ya está establecida y en donde, eventualmente, puede inocularse LPS para su sostenimiento (Esquema 1).



Esquema 1: figura ilustrativa demarcando la fase de establecimiento y de mantenimiento de la tolerancia en el modelo de trabajo utilizado.

5.1 Dexametasona induce refractariedad a los efectos inducidos por LPS

5.1.1 Perfil de secreción de TNF-α y corticosterona en el fenómeno de tolerancia a endotoxina

La administración diaria de LPS en ratones durante 4 días consecutivos induce el establecimiento de la tolerancia a endotoxina o tolerancia a LPS, un fenómeno que se expresa como una refractariedad a un nuevo desafío por LPS y que se caracteriza, esencialmente, por una disminución marcada en la secreción de TNF-α y por altos niveles de corticosterona -el GC predominante en ratones- en plasma, entre otras cosas.

En base a esto evaluamos, en primer lugar, el perfil de TNF-α durante el establecimiento de la tolerancia. Para ello, ratones BALB/c fueron inoculados con una dosis diaria de LPS durante 4 días, y 90 minutos después de cada inoculación los animales fueron sangrados para la obtención de plasma y evaluar los niveles de TNF-α mediante un ensayo de ELISA.

Por otro lado, en un esquema similar, los ratones fueron sangrados 3hs después de cada inoculación de LPS para la determinación en plasma de los niveles de corticosterona. Esta evaluación se llevó a cabo mediante un inmunoensayo competitivo (EIA).

Los resultados que se muestran en las Figuras 1 y 2 indican claramente una disminución de los niveles de TNF-α durante el establecimiento de la tolerancia a partir del día 2, concomitantemente con un incremento en los niveles de corticosterona, que se observa a las 3hs luego de las distintas inoculaciones de LPS.

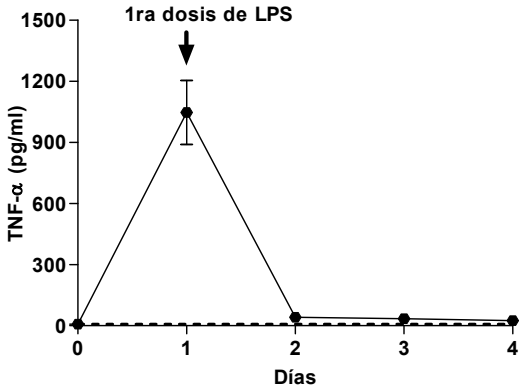


Figura 1: Niveles de TNF-α durante el establecimiento de la tolerancia. Ratones BALB/c fueron inoculados con LPS (0,2mg/Kg, i.p.) o solución fisiológica durante 4 días. Noventa minutos después de cada inoculación, los ratones fueron sangrados y se evaluó en plasma los niveles de TNF-α en plasma mediante un ensayo de ELISA. Los resultados son expresados como la media ± el error estándar de la media (S.E.M.) de 4-5 ratones por grupo. La línea de puntos corresponde a los niveles observados en animales tratados durante todo el esquema con solución fisiológica (10± 0,01)

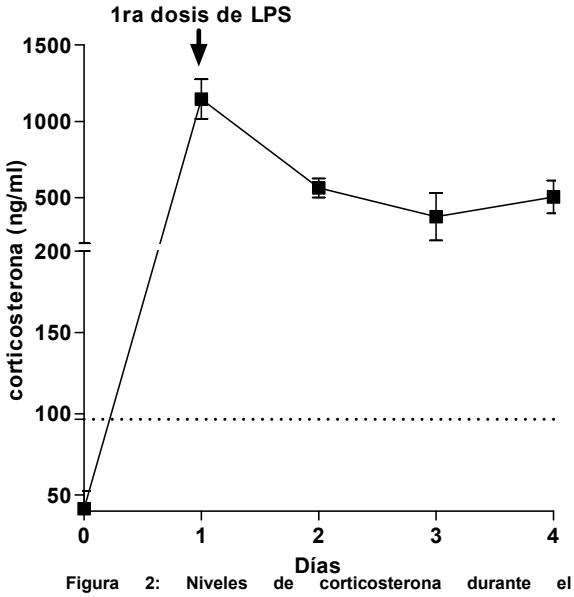


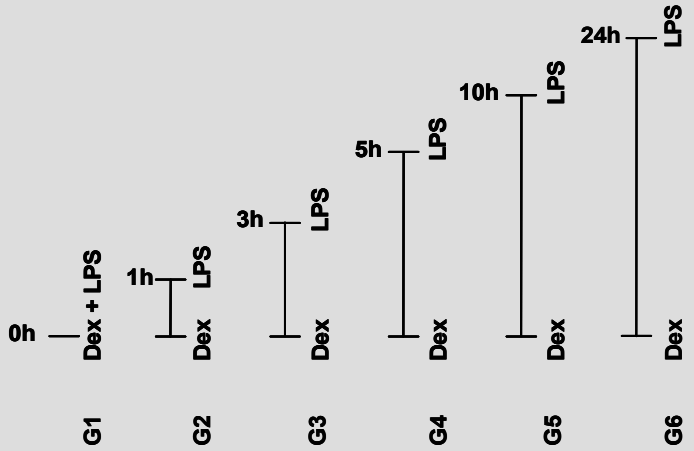
Figura 2: Niveles de corticosterona durante el establecimiento de la tolerancia. Ratones BALB/c fueron inoculados con LPS (0,2mg/Kg, i.p..) o solución fisiológica durante 4 días. Tres horas después de cada inoculación, los ratones fueron sangrados y se evaluó en plasma los niveles de corticosterona en plasma mediante un ensayo de EIA. Los resultados son expresados como la media ± el error estándar de la media (S.E.M.) de 4-5 ratones por grupo. Los niveles detectados a tiempo cero corresponden a los niveles basales (41,06±11,04) y la línea de puntos corresponde a los niveles observados en animales tratados durante todo el esquema con solución fisiológica (96,6 ± 20,95**).**

5.1.2 Efecto de la dexametasona frente a una dosis letal de LPS *in vivo*

El aumento de corticosterona en ratones tolerantes podría ser la causa de la refractariedad al LPS que se observa en estos animales en estado de tolerancia. En base

a esto evaluamos el efecto de un glucocorticoide sintético -la dexametasona- frente a una dosis letal de LPS utilizando diferentes esquemas temporales.

Con este propósito, los ratones fueron inoculados con una dosis de dexametasona (Dex; 2,5mg/Kg, i.p.) y un grupo control con solución fisiológica. Luego, a diferentes tiempos, los grupos fueron inoculados con una dosis letal de LPS (8mg/Kg.; i.p.) y se evaluó la mortalidad hasta 72hs después del desafío (Esquema 2). Un grupo control fue inoculado solo con dexametasona (Dex).



Esquema 2: Esquema ilustrativo del protocolo de inoculación con una dosis de dexametasona y una dosis letal de LPS en los diferentes grupos experimentales. Dex (2,5mg/Kg. i.p.) LPS (8mg/Kg, i.p.)

Como se indica en la Tabla 1, el tratamiento con Dex protege totalmente del efecto letal del LPS en animales tratados simultáneamente con Dex o hasta con una diferencia de 3 horas entre tratamientos. Sin embargo, cuando el LPS es inoculado entre 5 y 10hs después del tratamiento con Dex, la mortalidad llega a valores alrededor del 60% (62,5 y 57,2%), alcanzando un valor del 92,3% a las 24hs.

Tabla 1: La dexametasona induce refractariedad frente a una dosis letal de LPS

	tratamiento Dex - LPS						LPS	Dex
	0h	1h	3h	5h	10h	24h		
mortalidad (frecuencia)	0/17	0/6	0/6	5/8	4/7	12/13	8/8	0/6
mortalidad (%)	0	0	0	62.5	57.2	92.3	100	0

Tabla 1: Ratones BALB/c fueron inoculados con una dosis de dexametasona (Dex; 2.5mg/Kg, i.p.) y a diferentes tiempos como se indica en la tabla, los ratones fueron desafiados con una dosis letal de LPS (8mg/Kg, i.p.). Un grupo control (LPS) recibió solamente la dosis letal y un segundo grupo (Dex) recibió solo la dosis de dexametasona. Se evaluó la mortalidad hasta 72hs luego del desafío con la dosis letal.

Estos resultados indican que la acción de la Dex *in vivo* genera un estado de refractariedad transitoria frente a una dosis letal de LPS y que, transcurridas 24hs de la inoculación de Dex, los animales se muestran nuevamente susceptibles a los efectos letales de la endotoxina.

Por otro lado, mediante un ensayo de ELISA, se evaluó la producción de TNF-α en plasma de los animales tratados con Dex y LPS de manera simultánea (tiempo 0h ver Tabla 1), a fin de determinar si el efecto de refractariedad observado se correlacionaba con una disminución en la producción de TNF-α. También fue evaluada la producción de IL-10 en plasma. Los animales fueron sangrados 90 minutos después del desafío con una dosis letal de LPS.

Se observó una disminución significativa de la producción de TNF-α en aquellos animales tratados con Dex, dato que correlaciona con el efecto protector del glucocorticoide observado *in vivo*. Por otro lado, la producción de IL-10 muestra una disminución significativa comparado con los niveles observados en animales tratados con una dosis letal de LPS, aunque no tan pronunciada como la observada para el TNF-α.

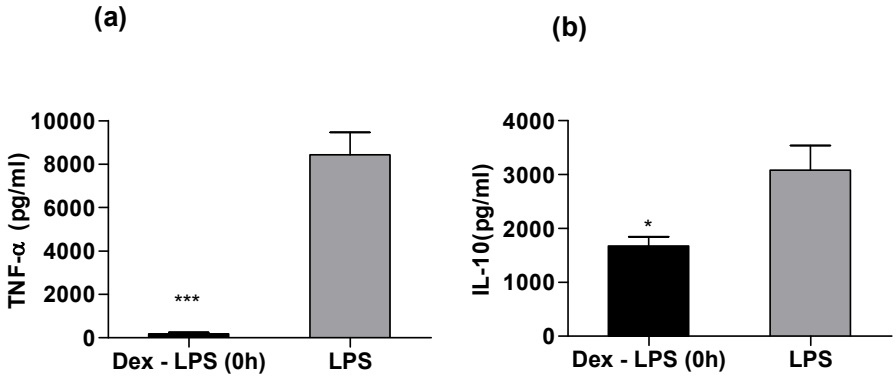


Figura 3: Niveles de TNF-α e IL-10 de ratones tratados simultáneamente con Dex y una dosis letal de LPS. Ratones BALB/c tratados como se describe en tabla 1 tiempo 0h y un grupo control (LPS) desafiado solamente con la dosis letal fueron sangrados 90 minutos después del desafío con la endotoxina y se evaluó en plasma los niveles de TNF-α (a) y de IL-10 (b) mediante un ensayo de ELISA. Los resultados son expresados como la media ± S.E.M. (pg/ml) de n=7-9 por grupo. ***p<0.0001; ns, no significativo.

5.1.3 Efecto de la dexametasona *in vitro*

Resultados similares fueron obtenidos cuando evaluamos el efecto de la Dex *in vitro* utilizando macrófagos peritoneales de ratón. Para esto, las células fueron pretratadas con Dex (40μg/ml) por 30 minutos, luego los cultivos fueron lavados, o no, y se incubaron con LPS (20ηg/ml) por 6hs. Los sobrenadantes fueron colectados y se determinó la actividad biológica del TNF-α mediante un ensayo de citotoxicidad utilizando la línea celular L-929.

Se observó una disminución significativa en la producción de TNF-α inducida por LPS en macrófagos peritoneales tratados con Dex confirmando los resultados obtenidos *in vivo* (Figura 4).

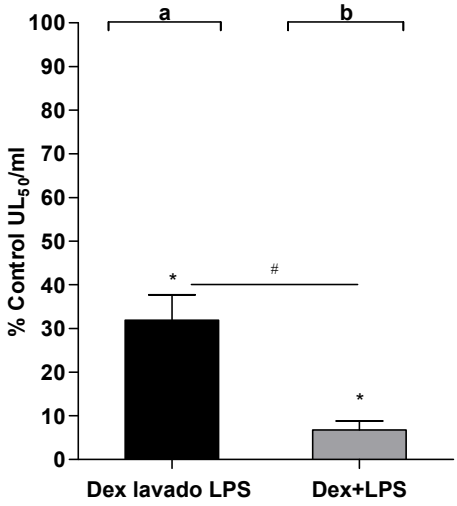


Figura 4: Producción de TNF-α de macrófagos peritoneales tratados con dexametasona in vitro. Macrófagos peritoneales de ratón fueron tratados con 40µg/ml de dexametasona (Dex) durante 30 minutos. Luego fueron lavados (a) o no (b) con solución fisiológica y fueron incubados con 20ηg/ml de LPS durante 6 hs. Los sobrenadantes fueron colectados y la actividad biológica del TNF-α fue determinada mediante un ensayo de citotoxicidad utilizando las células L-929. Los resultados son expresados como la media (% UL/ml) ± S.E.M., de 6 experimentos independientes referidos al control (solución fisiológica + LPS; 100%). **p*< 0,05 vs. el control; # *p*< 0,05 Dex lavado LPS vs. Dex+LPS.

Estos resultados demuestran claramente un efecto refractario inducido por la Dex tanto *in vivo* como *in vitro* frente a un estimulo de LPS.

5.1.4 Efecto específico de la dexametasona

La refractariedad inducida por el tratamiento con Dex podría deberse a dos causas. Una de ellas es que la Dex ejerza su efecto a través de su acción anti-inflamatoria, inhibiendo la producción de citoquinas proinflamatorias, en particularTNF-α. La segunda posibilidad podría deberse a una mera interacción física o química entre el LPS y la Dex que bloquee la acción de la endotoxina impidiendo que ésta ejerza su efecto.

Para analizar esta última posibilidad utilizamos dos procedimientos experimentales diferentes. Por un lado, recurrimos a una cromatografía de filtración molecular como método de separación teniendo en cuenta la diferencia de tamaños moleculares entre la dexametasona y el LPS; y por el otro, a un simple ensayo de diálisis.

Para ello, utilizamos una columna de cromatografía con Sephadex G-10 que fracciona tamaños moleculares < 700 Da. Entonces, la mezcla constituida por Dex (PM= 393,46 Da), ^{3}H-Dex y LPS (PM estimado = 60.000 Da) fue incubada durante 30 min a 37ºC y

luego pasada por la columna, analizándose la radioactividad en las diferentes fracciones, con el fin de determinar una posible interacción entre la Dex y el LPS.

Como se observa en la figura 5a la elución de la Dex sola (Dex fría + ^{3}H-Dex) muestra un perfil muy similar a la misma muestra que, además, contenía LPS, indicando claramente que la Dex no está ligada al LPS. (figura 5b). De haber habido alguna interacción entre LPS y Dex, la radioactividad debería haber aparecido en el volumen de exclusión de la columna (900-1000 µl).

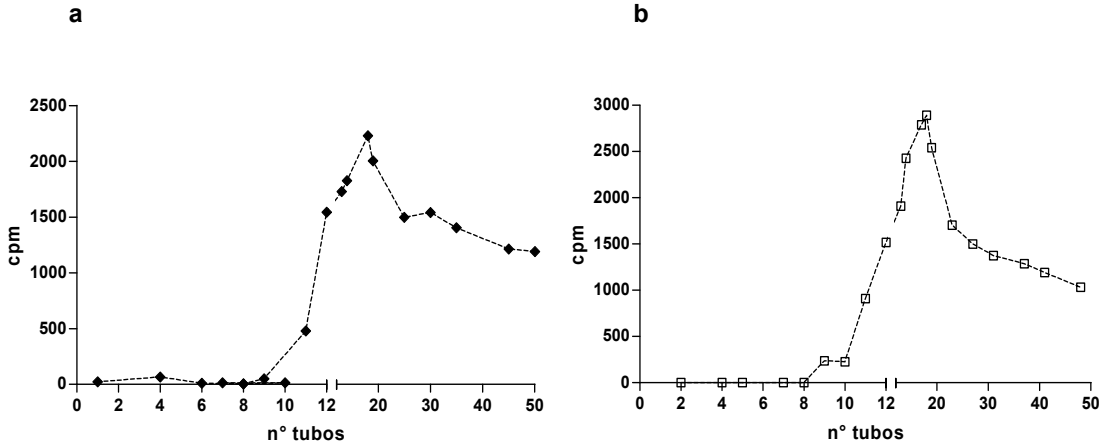


Figura 5: Perfil de elusión en cromatografía de filtración molecular. (a) Una solución mezcla de dexametasona (100µl solución salina + 100 µl Dex fría, 4,2x10^{-4}M + 1 µl ^{3}H-Dex, Actividad específica: 35·00 Ci/mM) fue sometida al pasaje por la columna determinando la aparición de la Dex mediante la medición de la radioactividad en cada tubo colectado. (b) Perfil de elusión de una mezcla de LPS y dexametasona (LPS, 8,5 x10^{-8}M + Dex fría, 4,2x10^{-4}M + 1 µl ^{3}H-Dex) incubada previamente a 37°C durante 30 minutos, y luego sometida al ensayo de cromatografía determinando la aparición de la marca radioactiva en cada tubo colectado. Volúmen colectado por tubo: 100µl

Por otro lado, como prueba adicional de confirmación, analizamos si había LPS en las primeras fracciones colectadas. Como se puede observar (Figura 6) las fracciones colectadas correspondientes al pico/ volumen de exclusión del LPS mostraron un aumento significativo en la producción de TNF-α por células L-929, indicando la presencia de la endotoxina en dichas fracciones, mientras que, por otro lado, las fracciones colectadas en el volumen de exclusión de la Dex no muestran actividad en cuanto a la producción de dicha citoquina.

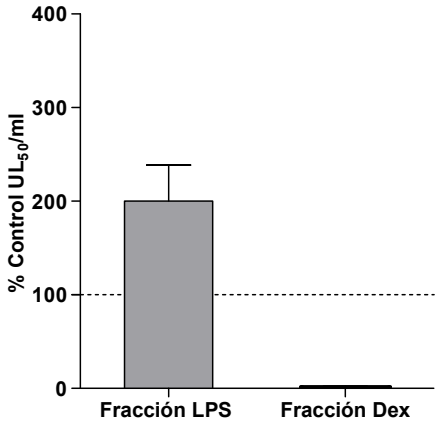
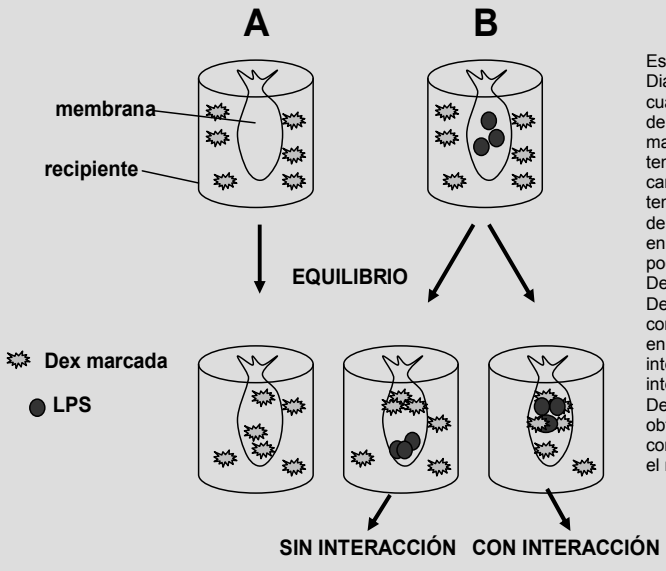


Figura 6: Actividad biológica de diferentes fracciones de elusión. Las fracciones correspondientes a los tubos 6 a 9 (elusión de LPS) y a los tubos 12 a 14 (elusión de Dex) fueron pooleadas y 40µl por well fueron adicionados sobre monocapas de macrófagos peritoneales ($2,5x10^5$/well) incubando durante 5hs. Los sobrenadantes fueron colectados y se determinó la actividad biológica del TNF-α mediante un ensayo sobre L-929. Los resultados son expresados como la media ± S.E.M. (% control). Las células control fueron tratadas solamente con 20ηg/ml de LPS durante 5hs y la actividad biológica del TNF-α fue considerada como el 100% que se encuentra representada por la línea de puntos

Como mencionamos anteriormente, quisimos ratificar este dato realizando otro tipo de procedimiento experimental utilizando un ensayo de diálisis. Para esto, utilizamos una membrana de diálisis de poro pequeño dentro de la cual colocamos 1 ml de solución fisiológica o de una solución de LPS de concentración conocida ($1,7x10^{-5}$M). Luego la membrana se colocó en un recipiente que contenía 2,5ml de una solución de concentración conocida conformada por Dex fría más ^{3}H-Dex ($3,4x10^{-7}$M + 1ul ^{3}H-Dex). La relación molar usada fue 20:1 LPS:Dex. Al alcanzar el equilibrio, de existir interacción entre ambas moléculas, debería observarse menor marca en la solución del recipiente externo y mayor en el interior de la membrana. Por otra parte, si no hubiera interacción, deberíamos encontrar la misma cantidad de radioactividad en ambos compartimientos (ver Esquema 3).



Esquema 3: Figura ilustrativa del proceso de Diálisis. En el caso A tenemos el control en el cual se encuentra solución fisiológica dentro de la membrana y Dexametasona (Dex) fría y marcada en el recipiente. Al llegar al equilibrio tendremos en ambos compartimentos igual cantidad de marca radioactiva. En el caso B tenemos una solución de LPS (1mg/ml) dentro de la membrana y Dex fría y marcada en el recipiente. Al llegar al equilibrio podremos encontrarnos con dos situaciones: De no existir interacción entre el LPS y la Dex, llegaremos al mismo estado que en el control, tendremos igual cantidad de marca en ambos compartimentos. De haber interacción la Dex se pegaría al LPS en el interior de la membrana quedando menos Dex disponible para alcanzar el equilibrio obteniendo finalmente una mayor marca en el compartimiento membrana y menor marca en el recipiente.

Los resultados mostrados en la figura 7 confirman los datos de cromatografía, indicando que no existe interacción entre la Dex y el LPS. Si bien observamos diferencias en los valores de c.p.m. entre el recipiente control y el recipiente con LPS, estas diferencias no son significativas y pueden deberse simplemente al error del método.

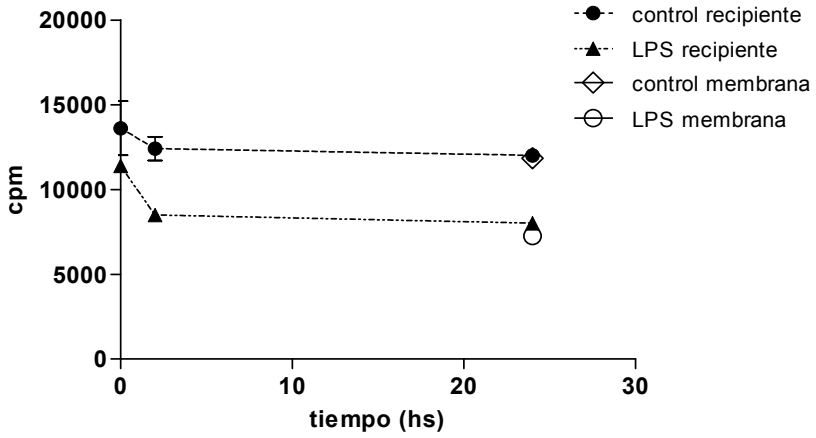


Figura 7: Ensayo de diálisis. Durante el proceso de diálisis se tomaron alícuotas (100µl) a diferentes tiempos (0, 2 y 24hs) desde el recipiente como también del interior de la membrana y se determinaron las cuentas por minuto (c.p.m.) hasta alcanzar el estado de equilibrio.

En base a estos resultados podemos concluir que los GC generan refractariedad a la acción del LPS a través de la inhibición de la producción de citoquinas proinflamatorias, evitando de este modo el efecto letal del mismo. En base a esto y en vista de los altos niveles de GC que se observan en plasma de animales tolerantes podríamos adjudicarles a éstos una participación en el fenómeno de tolerancia a endotoxina.

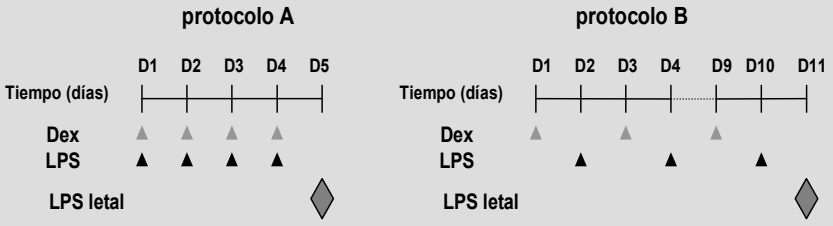
5.2 La dexametasona inhibe el establecimiento de la tolerancia

5.2.1 Administración exógena de glucocorticoides y establecimiento de la tolerancia

Teniendo en cuenta los niveles elevados de GC que se observan en animales tolerantes y considerando los resultados previos donde demostramos que la Dex protege a los animales expuestos a una dosis letal de LPS, consideramos la posibilidad de evaluar si la Dex, por sí misma, es capaz de inducir el fenómeno de tolerancia.

Para esto, ratones BALB/c fueron inoculados con dosis diarias de Dex (2,5mg/Kg, i.p.) durante 4 días y luego fueron desafiados con una dosis letal de LPS (Tabla 2; columna: Dex+ letal) evaluando la mortalidad hasta 72hs posterior al desafío letal. Los resultados obtenidos muestran que, si bien el tratamiento con Dex protege frente al desafío con una dosis letal de LPS, no es capaz de generar un estado de tolerancia a endotoxina.

Siguiendo esta misma línea de pensamiento, y con el objetivo de evaluar la participación de los GC en las diferentes etapas del fenómeno de tolerancia, nos propusimos evaluar el efecto del tratamiento con Dex durante el establecimiento de la tolerancia.
Para ello, realizamos dos protocolos diferentes de inoculación. En el primero los ratones fueron inoculados simultáneamente con un dosis de dexametasona (Dex; 2,5mg/Kg, i.p.) y una dosis de LPS tolerizante (0,2mg/Kg; i.p) cada 24hs durante 4 días *(protocolo A)*.
En el segundo protocolo, los ratones fueron inoculados con dexametasona 24hs antes de cada dosis tolerizante de LPS continuando este esquema durante 10 días *(protocolo B)*. Finalmente, 24hs después de la última dosis tolerizante todos los animales recibieron una dosis letal de LPS (8mg/Kg.; i.p.) y evaluamos la mortalidad hasta 72hs después del desafío (ver Esquema 4).



Esquema 4: Esquema ilustrativo del protocolo de inoculación en los 2 esquemas utilizados. En el esquema B la línea de puntos entre D4-D9 indica la continuidad del esquema entre esos días finalizando en el día 10.

Los resultados obtenidos muestran que en los animales tratados con Dex y LPS de manera simultánea, no logra establecerse el fenómeno de tolerancia y por ende los animales se muestran susceptibles a una dosis letal de LPS, indicando que la Dex inhibe el establecimiento del fenómeno. Sin embargo, cuando dichos tratamientos se encuentran espaciados por al menos 24hs, la tolerancia puede establecerse normalmente, lo cual indica que el efecto inhibitorio de la Dex ha desaparecido (Tabla 2).

Tabla 2 La dexametasona inhibe el establecimiento de la tolerancia a endotoxina

	A		B			
	LPS	Dex + LPS	LPS	Dex + LPS	LPS letal	Dex + letal
mortalidad (frecuencia)	0/6	9/9	0/6	0/7	6/6	6/6
mortalidad (%)	0	100	0	0	100	100

Tabla 2: Ratones BALB/c fueron inoculados con LPS (0,2mg/Kg, i.p.). En el esquema A la endotoxina fue inoculada sola (LPS) o simultáneamente con una dosis de dexametasona (Dex; 2,5mg/Kg, i.p.) (Dex+LPS) durante 4 días. En el esquema B la endotoxina y la Dex fueron espaciadas por 24hs siguiendo el protocolo durante 10 días. Luego, 24hs después de la última dosis de LPS tolerizante, los ratones fueron desafiados con una dosis letal de LPS (8mg/Kg, i.p.). Para cada esquema se llevaron en paralelo dos grupos control. Un grupo fue inoculado solo con solución fisiológica y desafiado con la dosis letal (LPS letal), y un segundo grupo fue inoculado solo con Dex durante los mismos días para cada esquema y luego desafiados con una dosis letal de LPS (Dex+ letal). La mortalidad fue evaluada hasta 72hs después del desafío con LPS letal.

Por otro lado, mediante la técnica de ELISA, se evaluó la producción de TNF-α e IL-10 en plasma de los animales tratados con el esquema de inoculación simultáneo (*protocolo A*) a fin de determinar si la inhibición de la tolerancia observada puede ser correlacionada con un aumento en los niveles de dichas citoquinas. Para esto, los animales tratados simultáneamente con Dex y LPS fueron sangrados 90 minutos después de la dosis letal de LPS y muestras de plasma fueron colectadas. Los resultados presentados en la figuras 8a y 8b muestran un aumento significativo para ambas citoquinas, tanto TNF-α como IL-10, en los grupos tratados con Dex, dato que se encuentra acorde con la ausencia de tolerancia a LPS observada en estos animales.

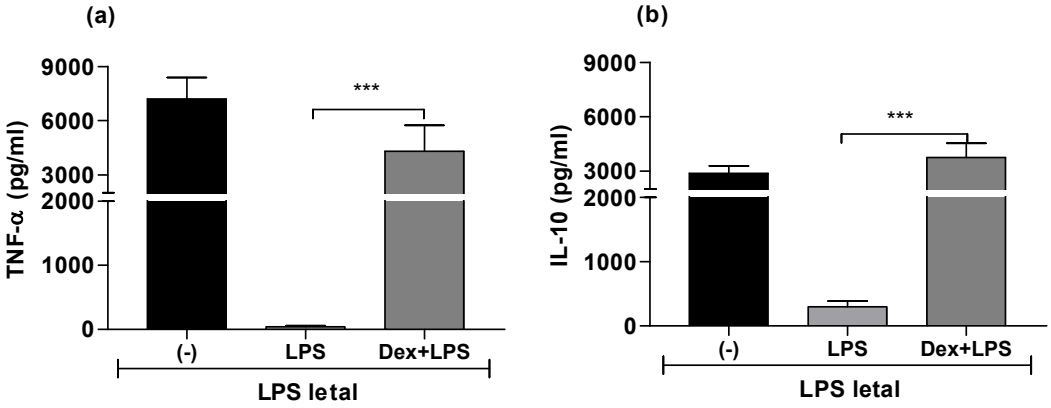


Figura 8: Niveles de TNF-α e IL-10 de ratones tratados simultáneamente con Dex+LPS durante el proceso de tolerización. Ratones BALB/c tratados como se describe en tabla 2 esquema A y un grupo control (-) que recibió solamente la dosis letal fueron sangrados 90 minutos después del desafío con la endotoxina y se evaluó en plasma los niveles de TNF-α (a) y de IL-10 (b) mediante un ensayo de ELISA. Los resultados son expresados como la media ± S.E.M. (pg/ml) de n=7-9 por grupo. ****p*<0.0001.

Sin embrago, un resultado llamativo es el comportamiento de la citoquina anti-inflamatoria IL-10 en nuestro modelo, observando bajos niveles en plasma de ratones tolerantes. Si bien varios trabajos le han adjudicado un rol central a dicha citoquina en el fenómeno de la tolerancia reportando niveles elevados en diferentes modelos[19,21], su producción y participación sigue siendo bastante controversial. Así, otros autores demostraron una disminución en los niveles de IL10 en plasma de ratones tolerantes como también en modelos de tolerancia *in vivo* en humanos[215,290]. Estos trabajos consideran que el fenómeno de tolerancia a endotoxina refleja una disminución tanto de ciertos mediadores proinflamatorios como anti-inflamatorios. En línea con esto, los bajos niveles de IL10 detectados en ratones tolerantes se encuentran en consonancia con estos trabajos y el aumento observado frente al desafío con una dosis letal en ratones tratados con Dex+LPS durante el establecimiento de la tolerancia condice con el bloqueo del montaje del fenómeno.

En breve, estos resultados sugieren que la administración de glucocorticoides exógenos durante la generación de la tolerancia ejerce un efecto inhibitorio resultando finalmente en el bloqueo del establecimiento del fenómeno.

5.2.2 Relevancia de la secreción temprana de TNF-α en el establecimiento de la tolerancia

Considerando entonces que el efecto inhibitorio de la Dex en el establecimiento de la tolerancia puede estar mediando la inhibición de ciertas citoquinas proinflamatorias relevantes para el proceso, y teniendo en cuenta que el TNF-α es la citoquina de secreción más temprana luego de la inoculación de LPS, evaluamos la producción de dicha citoquina en el tratamiento de tolerización simultánea con LPS y Dex con el objetivo de determinar su eventual participación en el establecimiento del fenómeno.

Para ello, los animales fueron sometidos al mismo esquema descrito anteriormente pero en este experimento fueron sangrados de manera diaria 90 minutos después del tratamiento con la dosis tolerizante de LPS durante 4 días y evaluamos la producción de TNF-α en plasma mediante un ensayo de ELISA.

Los resultados muestran claramente una disminución total de los niveles de TNF-α en el tratamiento simultáneo con LPS y Dex, pudiendo entonces concluir que el efecto inhibitorio de la dexametasona en el establecimiento de la tolerancia podría estar relacionado con la inhibición de la secreción inicial de TNF-α que ocurre como evento temprano durante el montaje de la tolerancia (figura 9).

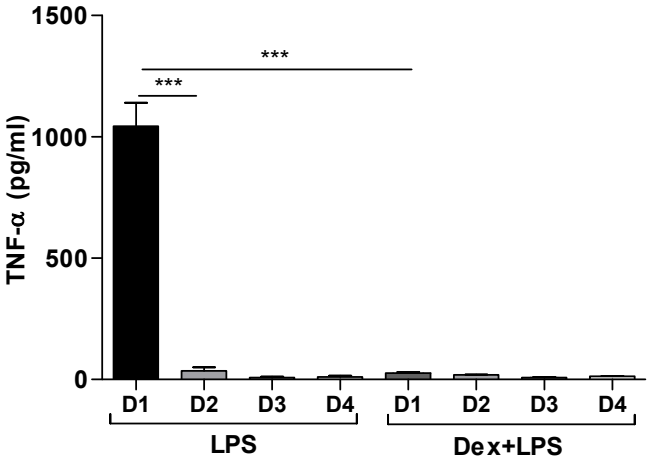


Figura 9: Niveles de TNF-α durante el proceso de tolerización en presencia o ausencia de dexametasona. Los ratones fueron inoculados de manera diaria con una dosis de LPS tolerizante (0,2mg/Kg, i.p.) en presencia (Dex+LPS) o ausencia (LPS) de una dosis de dexametasona (2,5mg/Kg, i.p.). Noventa minutos después de cada dosis de LPS los animales fueron sangrados y se evaluó en plasma la producción de TNF-α. Los resultados son expresados como la media ± S.E.M.(pg/ml) de n=3-5 por grupo. ***p< 0,001 LPSD1 vs. LPSD2, LPSD3, LPSD4; *** p <0,001 LPSD1 vs. Dex+LPS D1.

Sin embargo, existen opiniones encontradas respecto a la participación e importancia de dicha citoquina durante el establecimiento de la tolerancia. Varios trabajos han reportado la inducción de la tolerancia mediante el tratamiento con TNF-α en diferentes modelos[199,201], mientras que otros sostienen que dicha citoquina no es relevante para el establecimiento del fenómeno[291].

Así, si bien observamos una asociación entre el efecto de la Dex durante el establecimiento de la tolerancia y la inhibición de la secreción de TNF-α, quisimos evaluar la relevancia directa de esta citoquina en el establecimiento del fenómeno.

Para ello, utilizamos un modelo de tolerancia *in vitro* con macrófagos peritoneales de ratón los cuales fueron pretratados con anticuerpos policlonales anti-TNF-α (14μg/ml), Etanercept -receptor soluble de TNF-α (12.5μg/ml)- o solución fisiológica por 15 minutos y estimulados con LPS (20ηg/ml) durante 20hs. Luego las células fueron lavadas y reestimuladas con LPS (100ηg/ml) por un período de 6hs. Los sobrenadantes fueron colectados y se determinó la actividad biológica del TNF-α mediante un ensayo de citotoxicidad.

Los resultados obtenidos muestran que la tolerancia *in vitro* puede establecerse aún en ausencia de TNF-α (Figura10). Por otro lado, en un ensayo *in vivo* 3 grupos de ratones (n=6) fueron inoculados con 25, 50 o 100 ng de TNF-α durante 4 días consecutivos y desafiados con una dosis letal de LPS. Todos los animales murieron entre las 48hs y 72hs, mientras que los animales tratados con LPS en lugar de TNF-α sobrevivieron demarcando el montaje de la tolerancia.

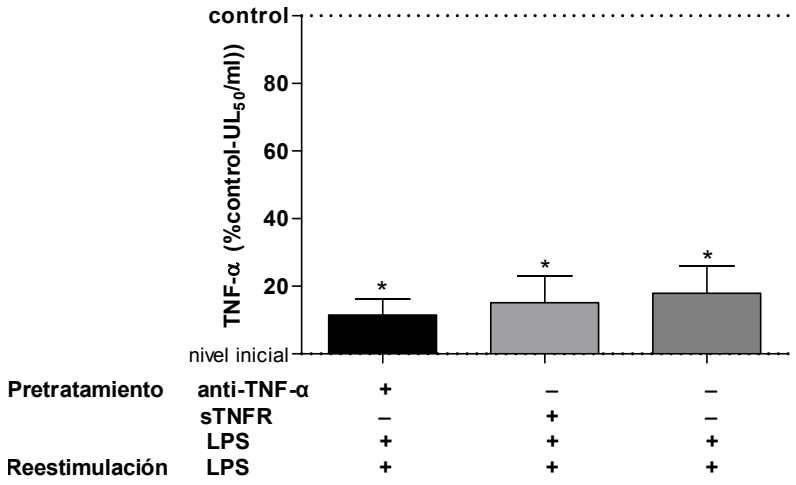


Figura 10: Tolerización in vitro en ausencia de TNF-α. Macrófagos peritoneales de ratón fueron pretratados con anticuerpo anti-TNF-α (14μg/ml), receptor soluble para TNF-α (12.5μg/ml.) o solución fisiológica por 15 minutos e incubados con LPS (20ηg/ml) durante 20 hs. Las células fueron lavadas y reestimuladas con 100ηg/ml de LPS por 6hs. Los sobrenadantes fueron colectados y se determinó la actividad biológica del TNF-α mediante un ensayo con L-929. Los resultados son expresados como la media ± S.E.M. (%control) de 6 experimentos independientes. *p< 0,05 significativamente diferente del control. Las células control fueron tratadas solamente con 100ηg/ml de LPS durante 6 hs y la actividad biológica del TNF-α fue considerada como el 100% y se encuentra representado por una línea de puntos.

Estos resultados sugieren que, al menos en nuestro modelo de trabajo, el TNF-α no es una citoquina relevante para el establecimiento del fenómeno de tolerancia a endotoxina. Por otro lado, considerando el bloqueo que ejerce el tratamiento diario con Dex en el proceso de tolerización, es posible sugerir que dicho efecto puede ser debido a la inhibición de otras citoquinas proinflamatorias relevantes en el establecimiento del fenómeno.

5.3 Mifepristone (RU486), un antagonista para receptores de glucocorticoides, desarticula el mantenimiento de la tolerancia pero no altera el establecimiento del fenómeno

5.3.1 Participación de los glucocorticoides endógenos durante el establecimiento de la tolerancia

En base a los resultados previos, observamos que la administración exógena de un glucocorticoide sintético (Dex) impide el establecimiento de la tolerancia, mientras que paradójicamente, por otro lado, los niveles endógenos de glucocorticoides se encuentran elevados durante este proceso y, eventualmente, podrian ser los responsables del manteimiento de la tolerancia y la causa de la refractariedad a dosis letales de LPS.

Teniendo en cuenta esos resultados, evaluamos la relevancia de los glucocorticoides endógenos durante el establecimiento de la tolerancia. Para ello, hicimos un diseño experimental en el cual utilizamos un antagonista de glucocorticoides (Mifepristone; RU486) durante el montaje de la tolerancia con el objetivo de inhibir la acción de los glucocorticoides endógenos y, de esta manera, poder conocer su relevancia en dicha fase del fenómeno.

Si bien es conocido el efecto inhibitorio que ejerce el RU486 sobre la acción de los glucocorticoides, también es conocida su acción como un antiprogestágeno actuando sobre receptores de progesterona.

Para poder dilucidar en nuestro modelo que la acción del RU486 fuera mediante la inhibición de receptores para glucocorticoides realizamos el siguiente ensayo. Se pretrató un grupo de ratones con una dosis de RU486 (12 mg/kg s.c.) 5 minutos antes de un tratamiento simultáneo con Dex y LPS letal (n=7). Un grupo control fue tratado solamente con el esquema simultáneo de Dex y LPS letal en el cual se observó un 100% de refractariedad frente al efecto del LPS (n=7).
Sin embargo, en el grupo tratado con RU486 observamos una mortalidad del 100% indicando que el efecto del RU486 fue ejercido a nivel de receptores para glucocorticoides. Por otro lado, hemos utilizado para los diferentes experimentos tanto ratones machos como hembras donde obtuvimos los mismos resultados, lo cual nos sugiere que no habría una participación relevante de los receptores de progesterona en los resultados obtenidos.

En base a esto, realizamos un experimento en el cual los ratones fueron tratados de manera simultánea con RU486 (12 mg/kg s.c.) y una dosis tolerizante de LPS de manera diaria durante 4 días. Luego, 72 hs después de la última inoculación de LPS, los animales recibieron una dosis letal de LPS (8mg/Kg.; i.p.) y se evaluó la mortalidad. Un grupo control recibió solamente dosis de RU486 durante los 4 días.

Los resultados mostrados en la tabla 3 indican que, el bloqueo de los receptores para glucocorticoides, y por ende de la acción de los glucocorticoides endógenos, no afecta la generación del mecanismo de tolerancia *in vivo*. Esto sugiere que la participación de los glucocorticoides endógenos no sería relevante durante el establecimiento de dicho fenómeno.

Tabla 3: Mifepristone (RU486) no afecta el establecimiento de la tolerancia

	LPS	RU86-LPS	RU486
mortalidad (frecuencia)	0/17	2/20	6/6
mortalidad (%)	0	10	100

Tabla 3: Ratones BLAB/c fueron inoculados con una dosis tolerizante de LPS (0,2mg/Kg, i.p.) en presencia (RU486LPS) o en ausencia (LPS) de una dosis de RU486 (12 mg/kg s.c.) de manera diaria durante 4 días. Un grupo control recibió solamente la dosis diaria de RU486. Luego, 72 hs después de la última dosis tolerizante, los ratones fueron desafiados con una dosis letal de LPS. Se evaluó la mortalidad hasta 72 h. después del tratamiento con la dosis letal de LPS.

Por otro lado, evaluando la producción de TNF-α diaria luego del tratamiento simultáneo con RU486 y LPS, observamos un perfil similar para el día 1 (D1) mientras que, para los días subsiguientes encontramos un aumento significativo en el grupo tratado con RU486. Este resultado refleja que el bloqueo de la acción de los glucocorticoides permite un incremento de los niveles de TNF-α en plasma inducido por LPS. Sin embargo, el fenómeno de tolerancia puede establecerse en los animales tratados con RU486 lo cual sugiere que los glucocorticoides no tendrían un rol relevante durante el establecimiento del fenómeno.

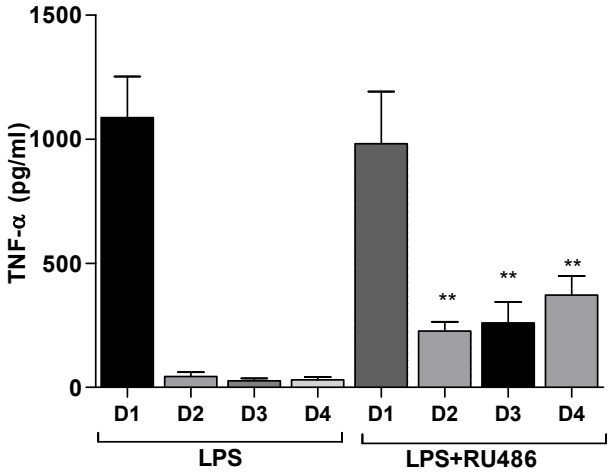
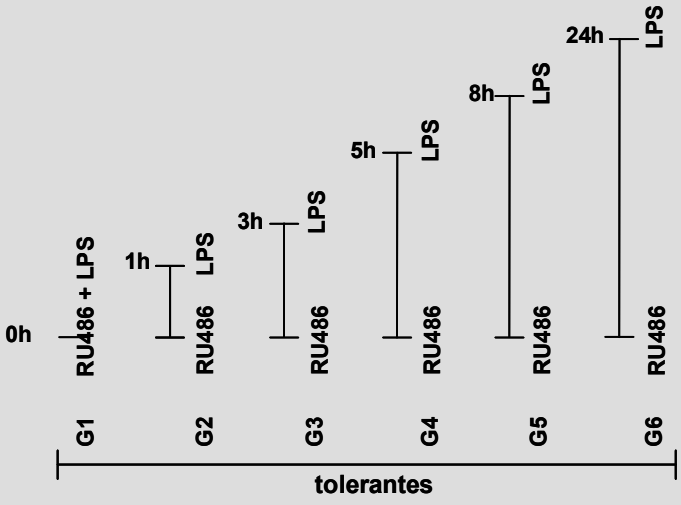


Figura11: Niveles de TNF-α en ratones tolerizados en presencia o ausencia de RU486. Animales tratados como se describe en tabla 3 fueron sangrados 90 minutos después de cada dosis tolerizante de LPS durante 4 días y se evaluó en plasma los niveles de TNF-α mediante un ensayo de ELISA. Los resultados son expresados como la media ± S.E.M. (pg/ml) de n = 4-6 por grupo**.** ** *p*< 0,01 entre D2 LPS vs. D2 LPS+RU486; D3 LPS vs. D3 LPS+RU486; D4 LPS vs. D4 LPS+RU486.

5.3.2 Participación de los glucocorticoides endógenos en el mantenimiento de la tolerancia

Si bien la participación de los glucocorticoides en el establecimiento de la tolerancia no parece tener una relevancia sustancial, quisimos analizar entonces su rol en el mantenimiento del fenómeno.

Para ello, 6 grupos de ratones fueron tolerizados y 24hs después de la última dosis de LPS tolerizante fueron tratados con una dosis de RU486 (12 mg/kg s.c.). Luego, a diferentes tiempos como se indica en el esquema 5, fueron inoculados con una dosis letal de LPS, evaluándose la mortalidad de todos los grupos hasta 72h después del desafío.



Esquema 5: Esquema ilustrativo del protocolo de inoculación con una dosis de RU486 y una dosis letal de LPS en los diferentes grupos experimentales. Ru486 (12 mg/kg s.c), LPS (8mg/Kg, i.p.)

Los resultados mostrados en la tabla 4 indican que el tratamiento con RU486 desarticula completamente el fenómeno de tolerancia y dicho efecto se expresa en igual magnitud hasta 3 horas después de inoculado el RU486. Sin embargo, cuando la dosis letal de LPS es inoculada 5hs después del tratamiento con RU486 la mortalidad se reduce a un valor del 30%, observando que a tiempos mayores el sistema retorna completamente al estado inicial de tolerancia, volviendo a ser refractario a una dosis letal de LPS.

Tabla 4*:* Efecto del RU486 en el mantenimiento de la tolerancia

	tolerante + RU486						tol	N
	0h	1h	3h	5h	8h	24h		
mortalidad (frecuencia)	20/20	11/11	11/11	3/10	0/10	0/10	0/11	10/10
mortalidad (%)	100	100	100	30	0	0	0	100

Tabla 4: Ratones BALB/c fueron tolerizados con LPS (0,2mg/Kg, i.p.) durante 4 días. Luego de 24hs de la última dosis de LPS, los animales fueron inoculados con RU486 (12mg/Kg; subcutáneamente) y a diferentes tiempos como se indica en la tabla, fueron desafiados frente a una dosis letal de LPS (8mg/Kg; i.p.). La mortalidad fue evaluada hasta 72hs después de la inoculación de la dosis letal. Un grupo control de ratones tolerantes (tol) fue inoculado con propilenglicol (vehículo de RU486) y todos los animales sobrevivieron a una dosis letal de LPS. Ratones naive (N) fueron inoculados con solución salina en lugar de LPS tolerizante y desafiados con una dosis letal de LPS.

Esto indica que la acción del RU486 desacopla el fenómeno de tolerancia *in vivo* de manera transitoria, permitiendo establecer una ventana temporal en la cual es posible observar nuevamente la sensibilidad al LPS. Transcurrido dicho efecto el sistema retorna al estado refractario indicando la reversibilidad de la acción ejercida por RU486

En línea con la desarticulación del mecanismo de tolerancia ejercida por RU486, se observó una correlación con un aumento en los niveles de TNF-α en el plasma, 90 minutos después del desafío letal, aportando un dato adicional de la desarticulación del fenómeno. Por otro lado, los altos niveles de IL-10 observados en ratones tolerantes tratados con RU486 denota la importancia limitada de dicha citoquina en el mantenimiento del fenómeno (Fig. 12 y tabla 4).

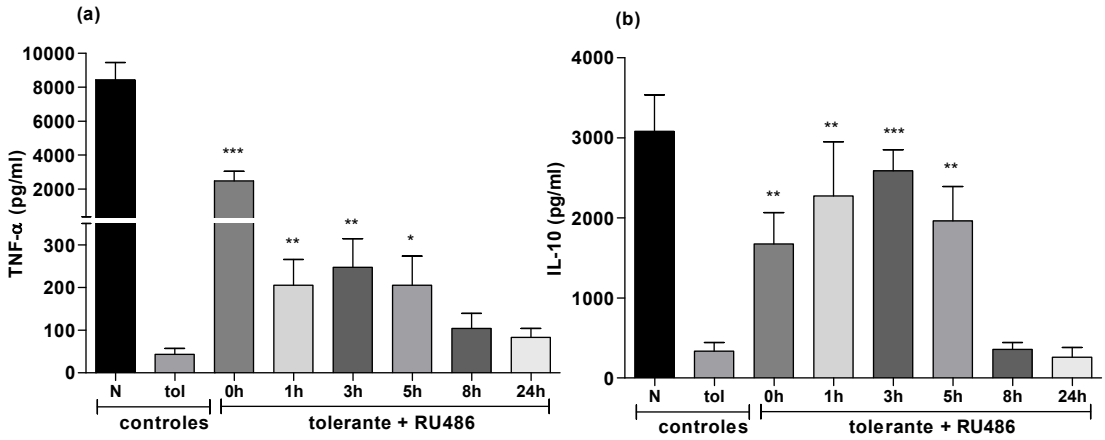


Figura12: Niveles de TNF-α e IL-10 en la desarticulación de la tolerancia ejercida por RU486. Grupos de ratones tratados bajo el mismo protocolo de la tabla 4 fueron sangrados 90 minutos después de la dosis letal de LPS y los niveles de TNF-α e IL-10 fueron determinados en plasma mediante un ensayo de ELISA. Los resultados son expresados como la media ± S.E.M. (pg/ml) de n=7-9 por grupo. *p<0,001, **p<0,01, ***p<0,05 significativamente diferente del grupo tolerante (tol); n.s.: no significativo.

Analizando el perfil de otras citoquinas proinflamatorias que se encuentran disminuidas tanto en el fenómeno de tolerancia a endotoxina como en los procesos de sepsis, evaluamos el efecto del RU486 sobre la producción de IL-12 e IFN-γ en ratones tolerantes. Para esto, los ratones fueron tolerizados durante 4 días como en el experimento anterior y 24hs después de la última dosis de LPS tolerizante, los animales fueron tratados con una dosis de RU486 y una dosis letal de LPS de manera simultánea. Para evaluar los niveles de citoquinas, diferentes grupos de animales fueron sangrados a las 3hs y 6hs después del desafío letal y se midieron en plasma la producción de IL-12 e IFN-γ respectivamente.

Si bien no observamos un efecto del RU486 sobre los niveles de IL-12 obtuvimos un incremento significativo en la producción de IFN-γ comparado con los niveles observados en ratones tolerantes Figura 13a y b). Este dato concuerda con varios trabajos en los cuales se ha reportado un efecto inhibitorio de los GC sobre la producción de IFN-γ en diferentes modelos de estudio[292], aportando así a nuestro trabajo un dato adicional respecto a la participación de los GC y sus efectos en el fenómeno de la tolerancia.

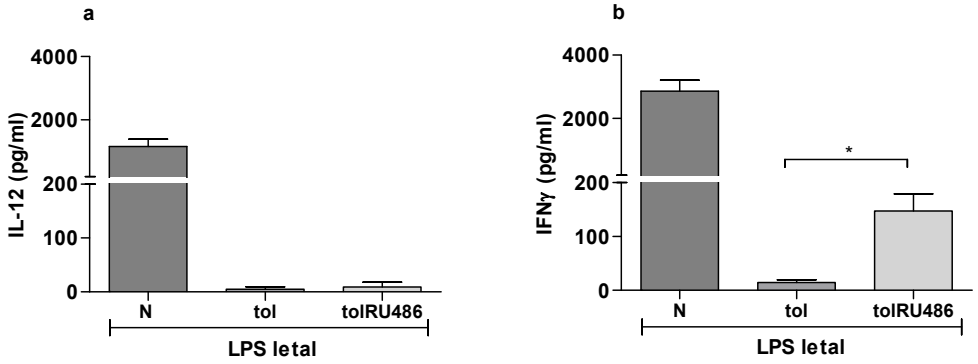


Figura 13: Niveles de IL-12 e IFN-γ en la desarticulación de la tolerancia ejercida por RU486. Los ratones fueron tolerizados con LPS (0,2mg/Kg, i.p.) durante 4 días. Veinticuatro horas después de la última inoculación los animales fueron tratados con una dosis de RU486 (XXX) (tolRU846) o vehículo (tol) y una dosis de LPS letal (xx) de manera simultánea. Un grupo control recibió solamente el desafío letal (N). Luego, 3hs y 6hs después del a dosis letal los animales fueron sangrados y se determinó en plasma los niveles de IL-12 e IFN-γ respectivamente mediante un ensayo de ELISA. Los resultados son expresados como la media ± S.E.M. (pg/ml) de n=4 por grupo. *p<0,05

Así, en base a estos resultados podemos concluir que los glucocorticoides participan en el mantenimiento de la tolerancia ya que bloqueando su acción se promueve la desarticulación del fenómeno.

5.3.3 Acción del IFN-γ en la desarticulación del fenómeno de tolerancia *in vitro*

Una de las estrategias focalizadas en la reversión del fenómeno de tolerancia ha sido la utilización del IFN-γ en modelos tanto *in vitro* como *in vivo* permitiendo una restauración de la respuesta de TNF-α frente a un estímulo de LPS[20].

En base a estas consideraciones y teniendo en cuenta el efecto de desarticulación transitoria inducido por RU486, quisimos evaluar si la acción de dicha citoquina comparte con el RU486 su efecto transitorio o promueve en cambio, una desarticulación irreversible del fenómeno de tolerancia.

Como diseño experimental utilizamos macrófagos peritoneales de ratón tolerizados en cultivo mediante la incubación con LPS (20 ng/ml) por 20h. Luego, fueron lavados e incubados con IFN-γ (500U/ml) por 18h y finalmente reestimulados, a diferentes tiempos, con LPS (100ng/ml) por 6hs. La actividad de TNF-α fue determinada en los sobrenadantes de los cultivos mediante un ensayo de citotoxicidad.

Los resultados mostraron un incremento en la producción de TNF-α en los tratamientos de 0h y de 24h, es decir cuando la reestimulación con LPS ocurre luego del tratamiento con IFN-γ ó 24h después de dicho tratamiento, observando que dicha citoquina promueve una desarticulación del fenómeno de tolerancia (figuras 14a y 14b).
Sin embargo, cuando la reestimulación ocurre 48h o 72h después del tratamiento con IFN-γ el efecto desacoplante desaparece y el sistema retorna nuevamente al estado tolerante (figura 14c). Así, el IFN-γ muestra un efecto de desarticulación reversible y transitorio similar al observado en los estudios con RU486, aunque debe tenerse en cuenta que los estudios con citoquinas fueron realizados *in vitro* mientras que los análisis con RU486 fueron evaluados *in vivo.*

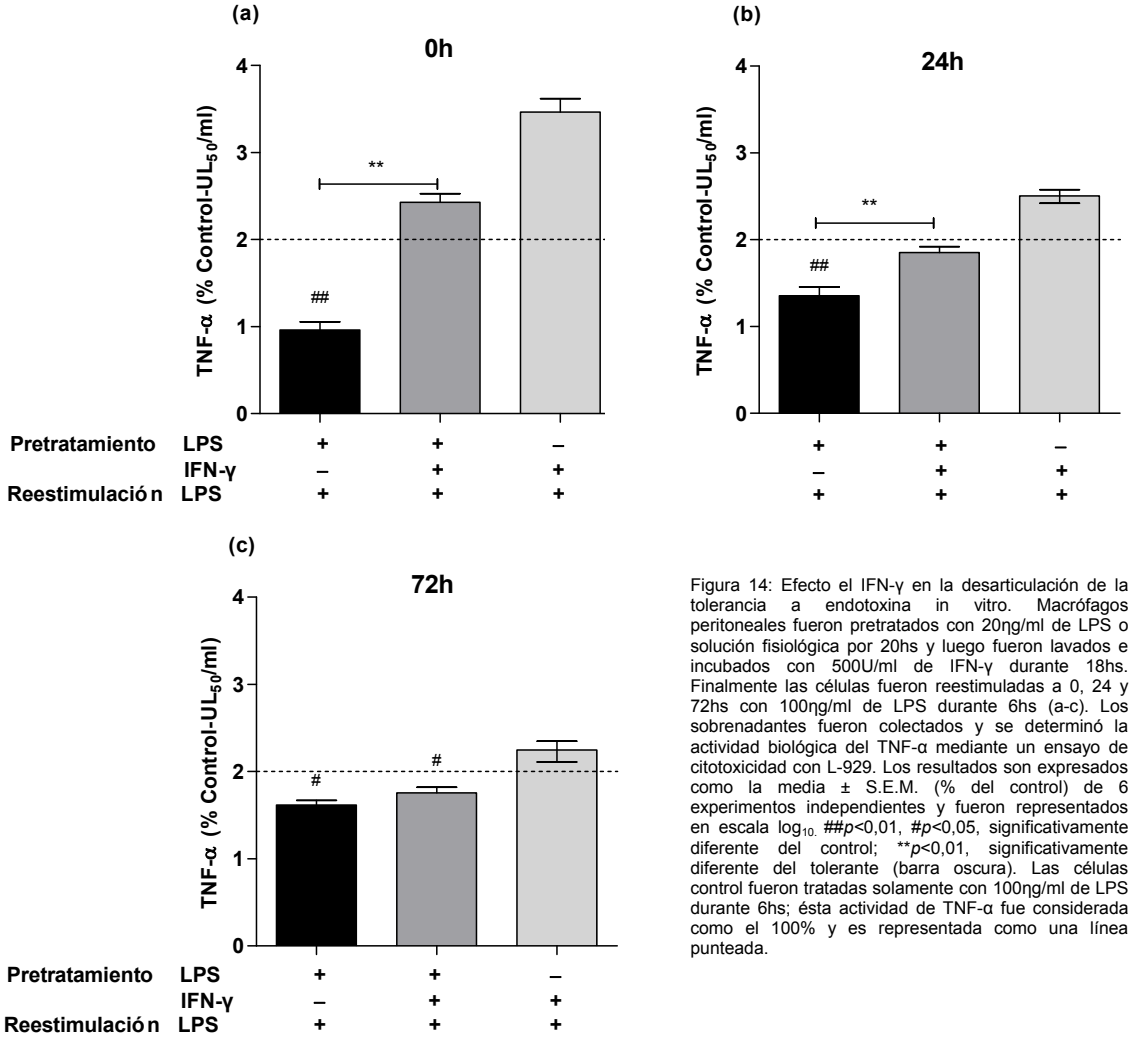


Figura 14: Efecto el IFN-γ en la desarticulación de la tolerancia a endotoxina in vitro. Macrófagos peritoneales fueron pretratados con 20ηg/ml de LPS o solución fisiológica por 20hs y luego fueron lavados e incubados con 500U/ml de IFN-γ durante 18hs. Finalmente las células fueron reestimuladas a 0, 24 y 72hs con 100ηg/ml de LPS durante 6hs (a-c). Los sobrenadantes fueron colectados y se determinó la actividad biológica del TNF-α mediante un ensayo de citotoxicidad con L-929. Los resultados son expresados como la media ± S.E.M. (% del control) de 6 experimentos independientes y fueron representados en escala $\log_{10}$. ##p<0,01, #p<0,05, significativamente diferente del control; **p<0,01, significativamente diferente del tolerante (barra oscura). Las células control fueron tratadas solamente con 100ηg/ml de LPS durante 6hs; ésta actividad de TNF-α fue considerada como el 100% y es representada como una línea punteada.

5.4 Mifepristone (RU486) induce una restauración parcial de la respuesta inmune humoral y celular en ratones tolerantes/inmunosuprimidos por LPS

5.4.1 Efecto del tratamiento con RU486 sobre la respuesta inmune humoral primaria

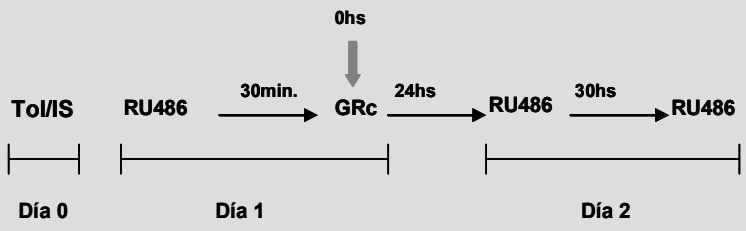
Uno de los eventos claves en las sepsis ocurre en etapas tardías, luego de 24 - 48 horas, en donde lo predominante es un estadio anti-inflamatorio que, habitualmente, concluye en

una inmunosupresión severa con la muerte del paciente por infecciones oportunistas. El fenómeno de tolerancia a endotoxinas es considerado la fase inicial de esta inmunosupresión.

Sobre esta base y considerando que el tratamiento con RU486 desarticula la tolerancia, nos avocamos a estudiar si el efecto ejercido por RU486 puede modificar o modular la respuesta inmune humoral en un modelo de tolerancia/inmunosupresión inducido por LPS.

Para ello, utilizamos un esquema de tolerancia más extendido en el tiempo y con dosis de LPS en concentraciones crecientes, dado que, si bien la tolerancia en sí misma conduce a un estado de inmunosupresión, los esquemas más extendidos nos permitieron alcanzar mayores grados de depresión inmune obteniendo así un modelo más adecuado para el análisis de la restauración de una respuesta inmune.

Así, ratones tolerantes/ inmunosuprimidos fueron tratados, o no, con RU486 (30 mg/kg i.p.) en un esquema de 3 dosis, e inmunizados con glóbulos rojos de carnero (GRc; 5 x10^8/ratón i.p.), un antígeno particulado que induce una respuesta humoral T-dependiente (Esquema 6). Un grupo control (no inmunosuprimido) se sometió al mismo esquema de inmunización en presencia o ausencia de RU486. Siete días después de la exposición al antígeno (Ag), los animales fueron sangrados y la respuesta inmune humoral primaria fue evaluada en muestras de suero mediante un ensayo de hemoaglutinación.



Esquema 6: Ilustración del protocolo de inoculación de RU486 (30mg/Kg, i.p.) y antígeno (GRc; 5 x10^8/ratón i.p.) en ratones tolerantes/inmunosuprimidos inducido por LPS (Tol/IS) para la evaluación de la respuesta humoral primaria.

Los resultados presentados en la figura 15 muestran una clara disminución en la respuesta de anticuerpos en ratones tratados con LPS denotando el estado de

inmunosupresión (IS). Sin embrago, el tratamiento con RU486 conduce a una restauración parcial, aunque significativa, de la respuesta inmune humoral primaria en ratones tolerantes/inmunosuprimidos por LPS.

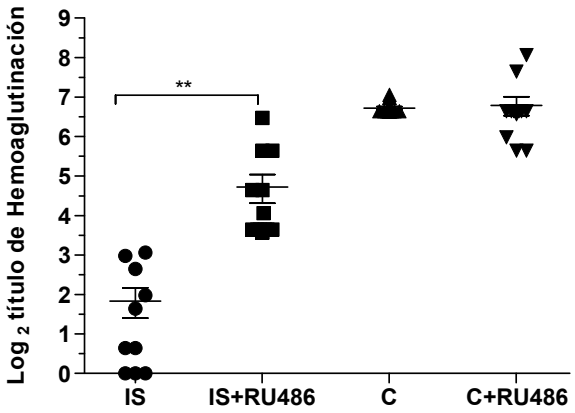


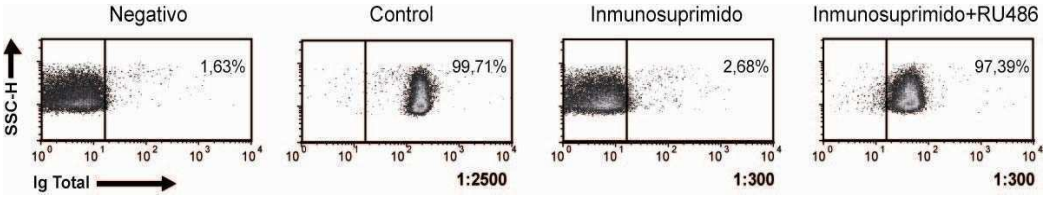
Figura 15: Producción de anticuerpos en el curso de una respuesta primaria. Ratones BALB/c fueron tolerizados/inmunosuprimidos con LPS (0,2mg/Kg; i.p. por 3 días seguido por 4mg/Kg i.p. durante 9 días). Veinticuatro horas después, los ratones fueron tratados con RU486 (30m g/kg, i.p.) o vehículo (propilenglicol) y 30 minutos más tarde fueron inmunizados con glóbulos rojos de carnero (GRc; $5x10^8$/ratón, i.p.). Luego, 24 y 30 h. después de la inmunización los ratones fueron otra vez tratados con RU486 o su vehículo. Un grupo control (naive) fueron tratados o no con RU486 e inmunizados utilizando el mismo esquema. Siete días después del a inmunización todos los animales fueron sangrados y se evaluaron los niveles de anticuerpos anti-GRc en suero mediante un ensayo de hemaglutinación. Los resultados son expresados como la media ± S.E.M.(% del control promedio) representando cada punto un animal. Los datos representan 3 experimentos independientes con 3-5 animales por grupo. IS = ratones tolerantes/ inmunosuprimidos inducido por LPS; IS + RU486 = ratones tolerantes/inmunosuprimidos inducido por LPS tratados con RU486; C = ratones control (naive) inmunizados; C + RU486 = ratones control (naive) inmunizados + RU486. $^{**}p<0,01$.

Con el fin de corroborar los resultados obtenidos y determinar el perfil de inmunoglobulinas comprometidas en la modulación de la respuesta inmune, se realizó un ensayo por citometría de flujo en donde pudimos determinar la producción de anticuerpos, así como identificar los diferentes isotipos de anticuerpos involucrados.

Para esto, GRc fueron opsonizados con anticuerpos provenientes del suero de los ratones tratados, luego se realizaron varios lavados y finalmente se incubaron con anticuerpos anti-IgM (PE), anti-IgG (FITC) o anti-Ig total (FITC) por 30 minutos a 4°C.

Los análisis por citometría de flujo confirmaron los estudios por hemaglutinación mostrando un claro aumento en la producción de anticuerpos en los animales inmunosuprimidos tratados con RU486 (Figura 16a). Por otro lado, el restablecimiento parcial de la respuesta humoral se vio reflejado tanto en los isotipos IgM como IgG inducidos en una respuesta primaria (Figura 16b).

a



b

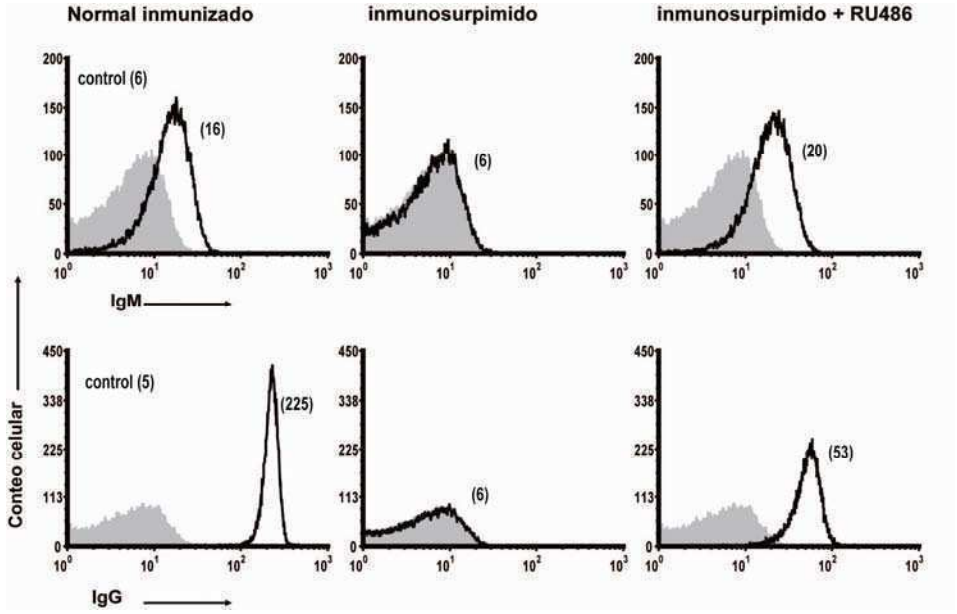


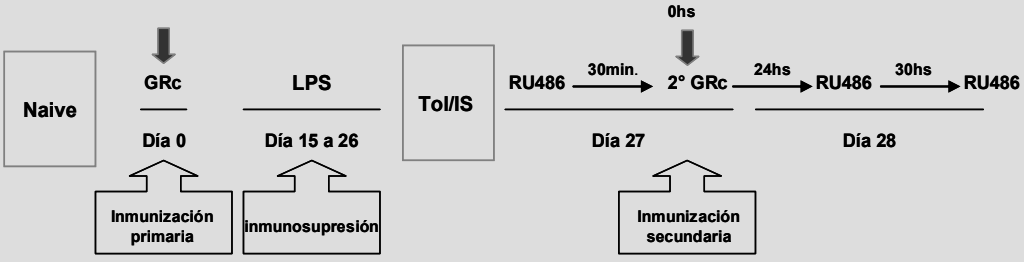
Figura 16: Inmunoglobulinas totales e isotipos en el curso de una respuesta primaria. (a) Dot plot representativos de inmunoglobulinas (Ig) totales (Ig total) anti-glóbulos rojos de carnero (GRc) para los distintos grupos experimentales. (b) Los niveles de inmunoglobulinas IgM e IgG anti-GRc fueron comparados entre los diferentes grupos utilizando una dilución 1:300. Los datos muestran un experimento representativo de 3. El número entre paréntesis representa la intensidad de fluorescencia media (IFM). Control: ratones naive inmunizados. **A la dilución 1:300 los niveles de IgM entre grupo control y el grupo inmunosuprimido+RU486 parecieran ser similares. Sin embrago a diluciones 1:5000 los niveles de IgM en el grupo control fueron aún detectados mientras que fue negativo para el grupo inmunosuprimido +RU486 (dato no mostrado).**

5.4.2 Efecto del tratamiento con RU486 sobre la respuesta inmune humoral secundaria

En los procesos de sepsis tardías los pacientes que cursan con un cuadro de inmunosupresión, habitualmente sucumben por infecciones oportunistas frente a las cuales en condiciones de inmunocompetencia la respuesta frente a estos patógenos se hubiera desencadenado de manera eficiente. En base a estas consideraciones y teniendo en cuenta que el tratamiento con RU486 permite una restauración parcial de la respuesta humoral primaria, decidimos evaluar el efecto del tratamiento sobre la respuesta humoral secundaria.

Para esto, ratones normales fueron previamente inmunizados con GRc (5 x10^8/ratón i.p.) antes de ser sometidos a un esquema de inmunosupresión, que comenzó 15 días

después de la inmunización. Luego, fueron tratados, o no, con un esquema de 3 dosis de RU486 (30 mg/kg i.p.) y sometidos a una segunda inmunización (ver esquema 7). Un grupo control de ratones no inmunosuprimidos fue inmunizado utilizando el mismo esquema. Siete días después de la 2° inmunización, todos los ratones fueron sangrados y la respuesta humoral secundaria fue evaluada mediante un ensayo de hemaglutinación. Debemos tener en cuenta que en este esquema experimental los animales fueron inmunosuprimidos después de haberse iniciado una respuesta primaria. Por lo tanto, la inmunosupresión fue estrictamente a nivel de la respuesta secundaria.



Esquema 7: Ilustración del protocolo de inoculación de RU486 (30mg/Kg, i.p.) y antígeno (GRc; 5 x10^8/ratón i.p.) en ratones tolerantes/inmunosuprimidos inducido por LPS (Tol/IS) para la evaluación de la respuesta humoral secundaria.

Nuevamente en este caso, al igual que en la respuesta primaria, observamos una fuerte depresión de la respuesta humoral secundaria en ratones inmunosuprimidos. Sin embargo, el tratamiento con RU486 promueve el reestablecimiento o la restauración parcial de la respuesta secundaria frente a glóbulos rojos de carnero. (Figura 17).

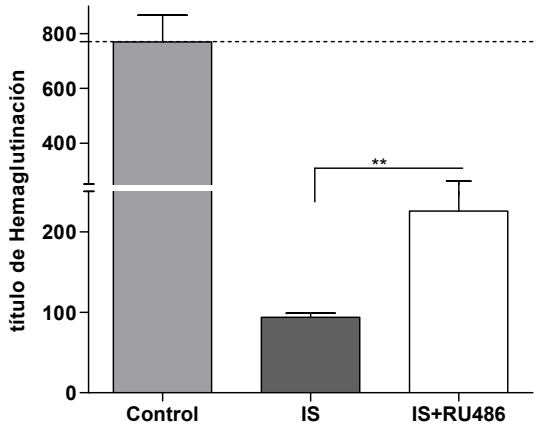


Figura 17: **Producción de anticuerpos en el curso de una respuesta secundaria.**Ratones BALB/c fueron inmunizados con glóbulos rojos de carnero (GRc; 5x1o^8/ratón, i.p.) y 15 días más tarde fueron tolerizados/inmunosuprimidos con LPS (0,2mg/Kg; i.p. por 3 días seguido por 4mg/Kg i.p. durante 9 días). Luego de 24hs de la última inoculación los ratones fueron tratados con RU486 (30mg/Kg, i.p.) o su vehículo e inmunizados nuevamente con GRc. Un grupo control (naive) fueron inoculados con GRc utilizando el mismo esquema. Siete días después de la inmunización los animales fueron sangrados y se evaluaron los niveles de anticuerpos anti-GRc en suero mediante un ensayo de hemaglutinación. Los resultados son expresados como la media ± S.E.M. (título de hemaglutinación) de 9-10 animales por grupo. IS = ratones tolerantes/ inmunosuprimidos inducido por LPS; IS + RU486 = ratones tolerantes/inmunosuprimidos inducido por LPS tratados con RU486; C = ratones control (naive) inmunizados. ** p< 0,01.

Por otro lado, corroboramos los resultados mediante la determinación de anticuerpos IgG anti-GRc por técnicas de citometría de flujo. En la figura 18 se puede observar la recuperación de la producción de inmunoglobulinas en ratones inmunosuprimidos tratados con RU486.

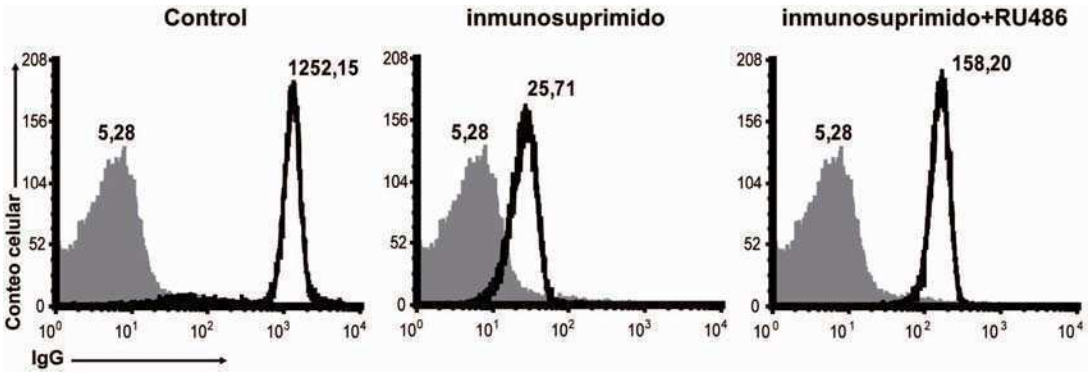


Figura 18: Inmunoglobulinas G (IgG) en el curso de una respuesta secundaria. Los niveles de inmunoglobulinas IgG anti-GRc fueron comparados entre los diferentes grupos utilizando una dilución 1:1500. Los datos muestran un experimento representativo de 3. El número entre paréntesis representa la intensidad de fluorescencia media (IFM). Control: ratones naive inmunizados.

Estos resultados sugieren un rol central de los GC endógenos en el fenómeno de inmunosupresión de la respuesta humoral frente a un antígeno T-dependiente. Por otra parte, la restauración parcial observada por el tratamiento con RU486 plantea la posibilidad de considerar a este tratamiento como una estrategia de recuperación de la inmunidad humoral.

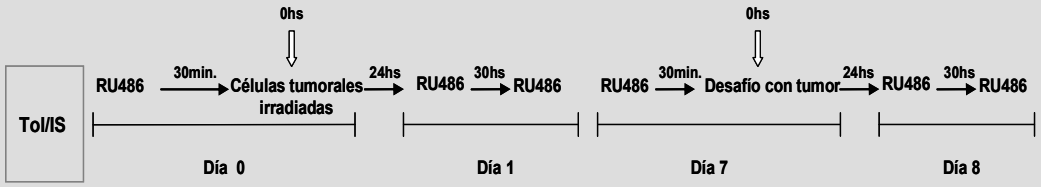
5.4.3 Efecto del tratamiento con RU486 sobre la respuesta inmune celular

En términos generales los procesos de inmunosupresión que se dan en sepsis demuestran no solo un deterioro en la respuesta inmune humoral sino que además, y principalmente, se observa una clara depresión a nivel de la respuesta inmune celular.

Por ello, decidimos evaluar en nuestro modelo la inmunosupresión celular y analizar si el tratamiento con RU486 permite modular dicha respuesta.

Para esto utilizamos un modelo tumoral murino en el cual la respuesta inmune mediada por células T es crucial para evitar el crecimiento del tumor. Así, ratones inmunosuprimidos con LPS fueron tratados, o no, con un esquema de 3 dosis de RU486 (30 mg/kg i.p.) y todos los grupos fueron inmunizados con células tumorales irradiadas provenientes de un tumor denominado MC-C, altamente inmunogénico ($6x10^6$

células/ratón; s.c). Siete días después de la inmunización, los ratones fueron desafiados con células tumorales MC-C vivas y tratados nuevamente con RU486 utilizando el mismo esquema definido en el paso de inmunización. Por otra parte, como control de inmunización se utilizó un grupo de ratones normales inmunizados y desafiados con células tumorales utilizando el mismo esquema. Asimismo, como control de crecimiento tumoral se llevó un grupo de ratones normales desafiados con células tumorales vivas. Finalmente, 10 días después del desafío con células tumorales evaluamos el crecimiento tumoral considerando presencia o ausencia de tumor (ver Esquema 8).



Esquema 8: Ilustración del protocolo de inoculación de RU486 (30mg/Kg, i.p.) inmunización con células tumorales irradiadas ($6x10^6$ células/ratón; s.c.) y desafío tumoral en ratones tolerantes/inmunosuprimidos inducido por LPS (Tol/IS) para la evaluación de la respuesta celular.

Como se observa en la tabla 5 el crecimiento del tumor fue 100% efectivo en el grupo de ratones desafiados, mientras que, la previa inmunización evita por completo que el tumor se implante. Esto nos indica que la inmunización fue la adecuada, permitiendo desencadenar una respuesta inmune celular que conduce al rechazo del implante tumoral.

Por otro lado, en ratones inmunosuprimidos, en donde la inmunización fue prácticamente ineficiente, se observó un crecimiento tumoral en el 90% de los casos. Sin embargo, en ratones inmunosuprimidos que fueron tratados con RU486 se vio una recuperación de la respuesta inmune celular, que se expresó a través del rechazo significativo al implante tumoral.

Tabla 5: RU486 restaura parcialmente la respuesta inmune celular en ratones inmunosuprimidos inducido por LPS

	Control	Inmunizado	IS	IS+ RU486
crecimiento de tumor (incidencia)	12/12	0/12#	10/11†	3/12*#
% de crecimiento de tumor	100	0	91	25

Tabla 5: Ratones tolerantes/inmunosuprimidos fueron tratados con RU486 (30mg/Kg, i.p.)o vehículo e inmunizados con células tumorales irradiadas provenientes de un fibrosarcoma murino inducido por metilcolantreno (MC-C). Veinticuatro y 30 hs. luego de la inmunización fueron nuevamente inoculados, o no, con RU486. Ratones naive fueron inmunizados usando el mismo esquema (In). Siete días más tarde, los ratones fueron desafiados con células tumorales vivas y tratados, o no, nuevamente con RU486 usando el mismo protocolo definido para el paso de inmunización. Un grupo de ratones naive fueron desafiados solamente con células tumorales vivas (control). Diez días después del desafío evaluamos la incidencia tumoral mediante presencia o ausencia de tumor. IS: grupo tolerante/inmunosuprimido; IS+RU486: grupo tolerante/inmunosuprimido tratado con RU486. *p<0,01 vs. IS; ** p<0,001 vs. control; *** p<0,001 vs. In.

Esto indica que los GC juegan un rol clave en la inmunosupresión celular inducida por LPS y que el RU486 permite restablecer o restaurar parcialmente esa respuesta, que concluye finalmente en el rechazo tumoral.

5.5 Características fenotípicas y funcionales asociadas a un estado de inmunosupresión en poblaciones celulares de ratones tolerantes/inmunosuprimidos por LPS

Una de las características fenotípicas a nivel de poblaciones celulares que se asocian con un estado de tolerancia y/o inmunosupresión es la marcada disminución en la expresión del receptor para LPS (TLR4), como así también antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (MHC II), hecho también observado en pacientes de sepsis tardías a nivel de los HLA-DR. Esto se traduce en alteraciones a nivel del reconocimiento y presentación antigénica, a los cuales se suman las alteraciones en el número de poblaciones linfocitarias y la activación de mecanismos de apoptosis asociados a los fenómenos de sepsis. Estos cuadros se acompañan, además, por una reducida respuesta proliferativa de células T y están estrechamente relacionados a la morbilidad asociada a fenómenos sépticos.

Utilizando nuestro modelo de inmunosupresión nos propusimos evaluar las características de estos marcadores celulares y algunos aspectos funcionales en

poblaciones de bazo de ratones inmunosuprimidos. Por otro lado evaluamos si el tratamiento con RU486 modifica algunos de los parámetros estudiados.

Para esto, ratones naive y tolerantes/inmunosuprimidos fueron inmunizados con glóbulos rojos de carnero ($5x10^8$/ratón, i.p) y tratados con 3 dosis de RU486 (30mg/Kg, i.p) como se ilustra en el *Esquema 6*. Siete días después de la inmunización colectamos células de bazo de los distintos grupos experimentales y realizamos los siguientes análisis: Evaluación de poblaciones esplénicas (células B, células T, CD11b de linaje mieloide) y de marcadores de superficie: TLR4, MHC-II; ensayo de fagocitosis con Zymosán-FITC, y ensayos de proliferación Ag específica e inespecífica.

5.5.1 Características generales de las poblaciones celulares esplénicas

Una de las observaciones más llamativas en ratones inmunosuprimidos fue un considerable aumento en el tamaño de los bazos alcanzando valores que duplican el tamaño de un bazo normal (Figura 19).

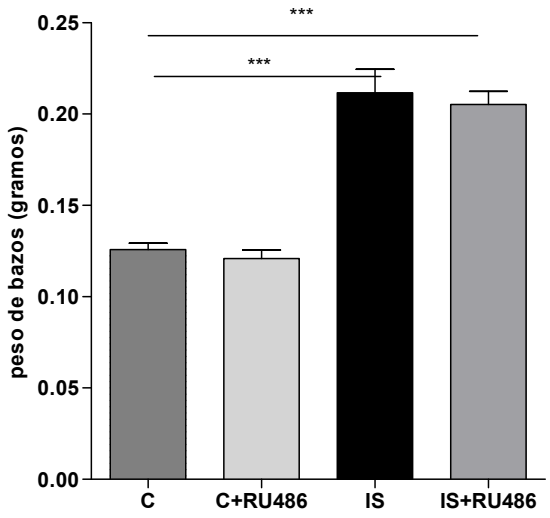


Figura 19: Ratones naive y tolerantes/ fueron tratados con RU486 e inmunizados con GRc como se describe en texto. Siete días después los animales fueron sacrificados y los bazos fueron removidos y pesados en balanza de alta precisión. Los resultados son expresados como la media ± S.E.M. (gramos) de 6 experimentos diferentes (n=2-3 por tratamiento). C: ratones naive inmunizados; C+RU486: ratones naive inmunizados tratados con RU486; IS: ratones tolerante/inmunosuprimidos; IS+RU486: ratones tolerantes/inmunosuprimidos tratados con RU486. ***P< 0,01 C vs. IS; C vs. IS+RU486.

Este dramático aumento en la masa del bazo nos sugiere una posible expansión de uno o más poblaciones esplénicas. Para evaluar este aumento analizamos diferentes poblaciones de linaje linfoide y no linfoide, como linfocitos B mediante la expresión de B220, linfocitos T mediante la expresión de CD3 y CD4 y linajes mieloides mediante el marcador CD11b. En las diferentes poblaciones de linfocitos evaluadas no se observaron aumentos considerables tanto en los porcentajes como en el número de células, por el contrario, hemos observado una disminución significativa en las poblaciones de linfocitos T $CD4^+$, hecho que se encuentra asociado con los mecanismos de depleción inducida por

apoptosis que se han descrito en procesos de inmunosupresión por sepsis. Por otro lado, se observó un dramático aumento de poblaciones celulares expresando el marcador CD11b (Figura 20).

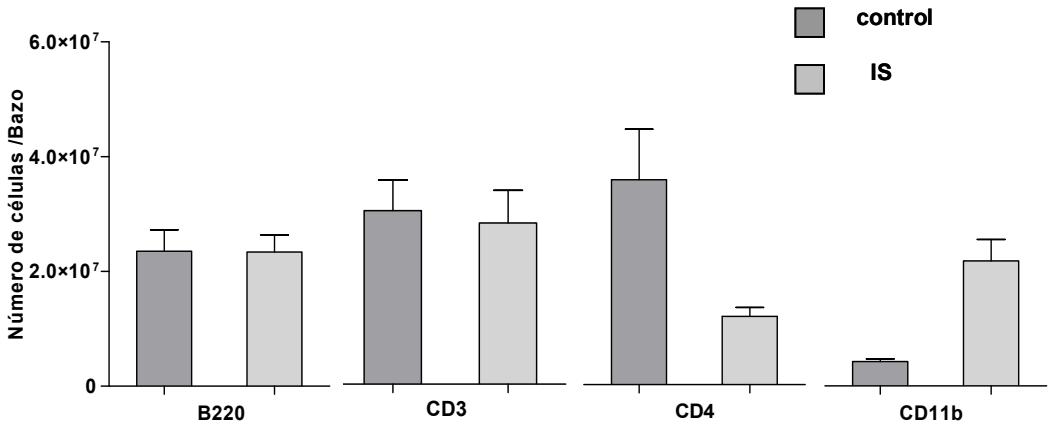


Figura 20: Ratones naive y tolerantes/inmunosuprimidos fueron tratados con RU486 e inmunizados con GRc como se describe en texto. Siete días después de la inmunización los bazos fueron procesados y se evaluaron diferentes poblaciones esplénicas mediante citometría de flujo. Los resultados son expresados como la media ± S.E.M. (n° de células por bazo) de 6 experimentos independientes (n= 5-6 por grupo). Control: ratones naive inmunizados; IS: ratones tolerantes/ inmunosuprimidos.

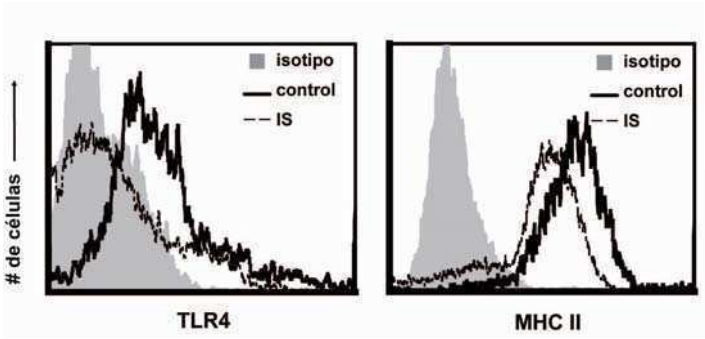
Evaluando las características de esta población aumentada encontramos una significativa disminución en la expresión del receptor TLR4 como así también de los niveles de MHC II (Tabla 6), datos que concuerdan con un estado de tolerancia y/o inmunosupresión. Sin embargo, cuando evaluamos la expresión de estos marcadores en presencia del tratamiento con RU486, no se observaron modificaciones en ninguno de los parámetros estudiados. Es posible considerar que los efectos modulatorios sobre la respuesta inmune que ejerce el RU486, no se reflejen sustancialmente en los niveles de expresión de los marcadores evaluados.

Tabla 6: Células esplénicas CD11b$^+$ de ratones inmunosuprimidos muestran una disminución en la expresión de TLR4 y MHCII

.

			Tratamiento con RU486	
	control	inmunosuprimido	inmunosuprimido	control
MHCII				
%	83.87±2.3	67.32±1.5*	65.08±2.4*	83.08±3
MFI	312.4±20	188.5±19*	182.3±21*	319±41
TLR4				
%	14.16±1.3	6.7±0.5#	5.6±0.7#	12.89±0.7
MFI	2.6±0.1	1.5±0.08#	1.4±0.09#	2.2±0.1

Tabla 6: Esplenocitos obtenidos de los diferentes grupos experimentales fueron evaluados para la expresión de moléculas de superficie TLR4 y MHCII sobre células CD11b$^+$ mediante citometría de flujo. Los resultados son expresados como la media ± S.E.M. de tanto el % de células positivas como la intensidad de fluorescencia media (IFM) de 3 experimentos independientes (n=3-4 por tratamiento) *p<0,001 vs. Control (ratones naive inmunizados); #p<0,01 vs Control. Histograma representativo para la expresión de TLR4 y MHCII en grupo control e inmunosuprimido.



5.5.2 Capacidad fagocítica de población esplénica CD11b$^+$

Si bien existen evidencias de un *clearance* aumentado y una elevada capacidad fagocítica asociados al fenómeno de tolerancia[222], existen opiniones encontradas que difieren en las observaciones planteadas[293]. En nuestro caso en particular, para evaluar la capacidad fagocítica de células esplénicas CD11b$^+$ utilizamos un ensayo de fagocitosis con Zimosán-FITC. Como se muestra en la figura 21 observamos una clara disminución en la capacidad fagocítica de células esplénicas CD11b$^+$ provenientes de ratones inmunosuprimidos. Al igual que en los parámetros evaluados anteriormente, el tratamiento con RU486 no modificó la capacidad fagocítica.

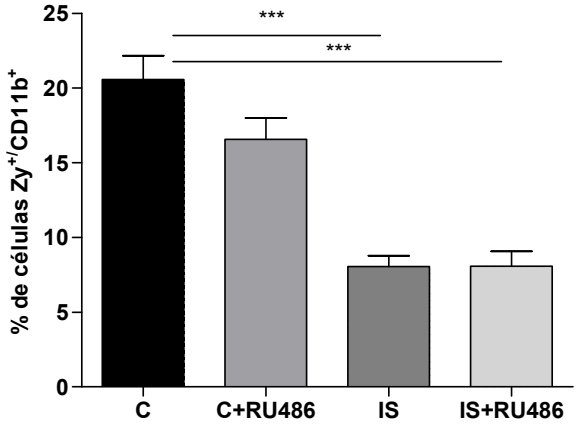


Figura 21: Esplenocitos (5x10^5/ tubo) provenientes de los diferentes grupos experimentales fueron marcados con anticuerpos monoclonales anti-CD11b-PE durante 40 minutos a 4°C. Luego las células fueron lavadas e incubadas por 30 minutos a 37°C con Zimosán-FITC (Zy) como se describe en materiales y métodos. Los resultados son expresados como la media ± S.E.M. (% de células positivas) de 5 experimentos independientes (n=3-4 por tratamiento). C: ratones naive inmunizados; C+RU486: ratones naive inmunizados tratados con RU486; IS: ratones tolerante/inmunosuprimidos; IS+RU486: ratones tolerantes/inmunosuprimidos tratados con RU486. ***P< 0,01 C vs. IS; C vs. IS+RU486.

5.5.3 Proliferación inespecífica y específica de antígeno de células esplénicas

Para evaluar la capacidad proliferativa antígeno específica incubamos los esplenocitos en una proporción 1:1 con GRc por un período de 72hs adicionando 1uCi de [^{3}H] timidina 18hs antes del tiempo de finalización del ensayo.

Los resultados que se muestran en la Figura 22 indican una fuerte supresión en la capacidad proliferativa de esplenocitos provenientes de animales inmunosuprimidos. Sin embargo, el tratamiento con RU486 no permitió restablecer o aumentar la capacidad proliferativa.

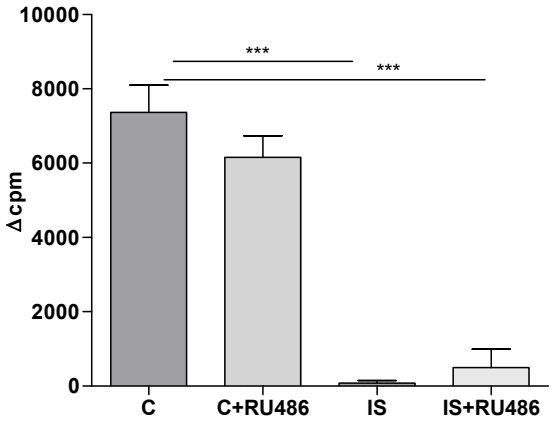


Figura 22: Células esplénicas (2x10^{5}células/well) fueron incubadas en proporción 1:1 con GRc por 72hs a 37°C adicionando 1µCi de timidina tritiada [3H] 18 hs. del cosechamiento de las células. La actividad proliferativa fue estimada midiendo la incorporación de timidina y los datos son expresados como la media ± S.E.M. (Δ c.p.m.) en el cual el promedio de los wells que no recibieron estímulo fueron sustraídos de los valores experimentales. C: ratones naive inmunizados; C+RU486: ratones naive inmunizados tratados con RU486; IS: ratones tolerante/inmunosuprimidos; IS+RU486: ratones tolerantes/inmunosuprimidos tratados con RU486. ***p< 0,001, C vs. IS; C vs. IS+RU486.

Previamente demostramos que el tratamiento con RU486 induce una recuperación de la respuesta celular en los grupos inmunosuprimidos utilizando un modelo tumoral, sin embargo, en este ensayo no observamos modificaciones en la proliferación en presencia del tratamiento.

Ahora bien, cuando evaluamos la capacidad proliferativa en un esquema similar pero adicionando una dosis de RU486 2hs antes de la remoción del bazo observamos una restauración significativa en la respuesta proliferativa frente al tratamiento (figura 23).

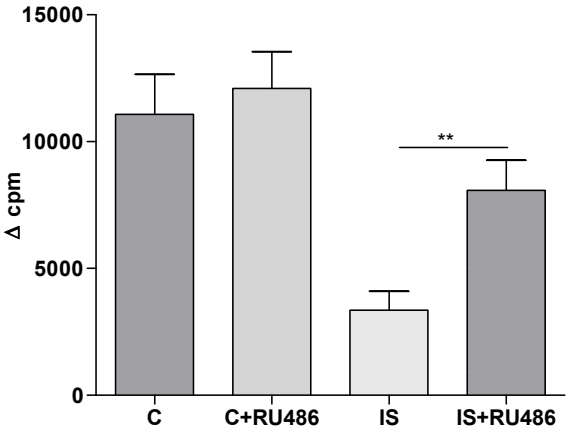


Figura 23: Células esplénicas ($2x10^5$células/well) fueron incubadas con 1µg/ml de CoA por 72hs a 37°C adicionando 1µCi de timidina tritiada [3H] 18 hs. del cosechamiento de las células. La actividad proliferativa fue estimada midiendo la incorporación de timidina y los datos son expresados como la media ± S.E.M. (Δ c.p.m.) en el cual el promedio de los wells que no recibieron estímulo fueron sustraídos de los valores experimentales. C: ratones naive inmunizados; C+RU486: ratones naive inmunizados tratados con RU486; IS: ratones tolerante/inmunosuprimidos; IS+RU486: ratones tolerantes/inmunosuprimidos tratados con RU486. ** p< 0,01, IS vs. IS+RU486.

En breve, estos resultados nos muestran un conjunto de características funcionales y fenotípicas que demarcan un estado de depresión inmune en nuestro modelo de trabajo, denotando nuevamente la participación de los GC en la inhibición de la proliferación de células esplénicas en ratones inmunosuprimidos.

5.6 Inducción de poblaciones celulares inmunosupresoras (GR-1$^+$CD11b$^+$) y T regulatorias (CD24$^+$CD25$^+$Fopx3$^+$) en ratones tolerantes/inmunosuprimidos por LPS: relevancia en el fenómeno de tolerancia

En diferentes modelos de sepsis polimicrobiana como así en modelos tumorales se ha descrito la gran expansión y participación de poblaciones celulares involucradas en los fenómenos de inmunosupresión, principalmente, mediante la inhibición de la proliferación de células T. Una de estas poblaciones, perteneciente al linaje mieloide, lo constituyen

las células inmaduras supresoras (MSDC), las cuales han sido definidas como una población altamente heterogénea compuesta por progenitores y precursores de células mieloides con un estado fenotípico de inmadurez y una gran capacidad para suprimir la respuesta de células T[167].

En modelos de ratón dicha población se ha caracterizado por la co-expresión del antígeno de diferenciación de linaje de mieloides (GR-1), también llamado Ly6G y el CD11b, también conocido como αM-integrina.

Por otro lado, otra de las poblaciones celulares a las que le han adjudicado un rol clave en la supresión de la respuesta inmune en pacientes con tumores o en modelos de sepsis, son las células T regulatorias definidas por la expresión del los antígenos CD4, CD25 y el factor de transcripción Foxp3, las cuales están incrementadas en pacientes con tumores y sepsis[170].

5.6.1 Efecto del tratamiento con dexametasona *in vivo* sobre la inducción de poblaciones supresoras / regulatorias

Si bien en este trabajo se muestra una participación sustancial de los GC en la regulación de la inmunosupresión inducida por LPS tanto a nivel humoral como celular, dada las consideraciones previas nos propusimos evaluar en primer lugar la posible relación o participación de los GC en la regulación de poblaciones mieloides supresoras ($GR\text{-}1^+/CD11b^+$) y células T regulatorias ($CD4^+CD25^+Foxp3^+$).

Se ha reportado que el tratamiento con GC *in vitro* promueve la inducción de un subset de monocitos que se asemejan a las células supresoras derivadas de mieloides[294]. Por otro lado, varios autores han demostrado una regulación positiva sobre poblaciones T regulatorias frente al tratamiento con GC sintéticos[295].

Así, decidimos evaluar el efecto del tratamiento con dexametasona (Dex) *in vivo* sobre la inducción de ambas poblaciones celulares. Con este propósito, ratones naive fueron inoculados con 2.5mg/Kg/día de Dex durante 5 días consecutivos. Luego, al 6^{to} día, los bazos fueron removidos y se evaluaron ambas poblaciones mediante citometría de flujo. En concordancia con observaciones previas observamos una dramática disminución de las células de bazo, probablemente asociado al efecto apoptótico que inducen los GC sobre diferentes poblaciones esplénicas[296,297].

Sin embargo, considerando que los niveles de glucocorticoides en plasma de ratones tolerantes alcanzan valores aproximadamente 4-5 veces más altos que los encontrados en ratones normales, decidimos utilizar un protocolo de inoculación de dexametasona

que permita alcanzar una concentración similar en plasma. Para esto, los ratones fueron inoculados con 0.2mg/Kg/día de Dex durante dos días consecutivos y 24hs después evaluamos en bazo las poblaciones celulares de interés. Por otro lado, un grupo control fue inoculado con solución fisiológica.

Los resultados mostrados en la figura 24 indican que el tratamiento con dos dosis de dexametasona promueve un incremento significativo en el número de células GR-1^+/$CD11b^+$ como también a nivel de las células T regulatorias. (figura 24a y b). En efecto estos resultados nos permiten pensar que los GC ejercen un efecto inductor sobre dichas poblaciones, sugiriendo que la aparición de dichas células puede ser, en parte, una consecuencia de la acción de los GC.

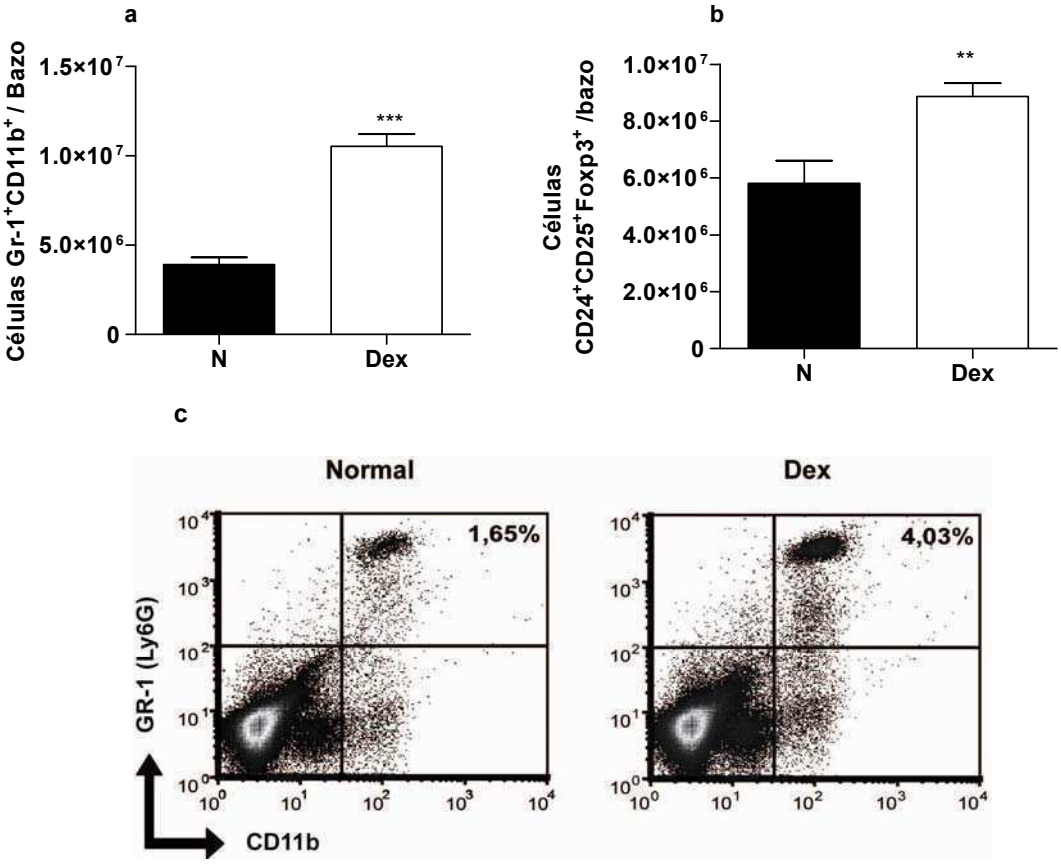


Figura 24: (a) Número total de células GR-1^+/$CD11b^+$ y (b) células $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ provenientes de bazo de ratones tratados con 2 dosis de dexametasona (Dex; 0,2mg/Kg, i.p.) o solución fisiológica (N). Veinticuatro horas más tarde los esplenocitos fueron cosechados y evaluados por citometría de flujo. Los resultados son expresados como la media ± S.E.M. (número de células /bazo) de un experimento representativo con 4-5 animales por grupo. Este experimento fue repetido 2 veces. N: ratones naive; Dex: ratones tratados con dexametasona. **p<0,01; ***p<0,001 significativamente diferente del grupo N. (c) Dot plot representativo de esplenocitos GR-1^+/$CD11b^+$ en los diferentes grupos.

5.6.2 Inducción de poblaciones supresoras / regulatorias en el fenómeno de tolerancia/ inmunosupresión

Teniendo en cuenta que la inmunosupresión / tolerancia inducida por endotoxina es promovida por los GC endógenos (revertido por RU486), que la Dex induce un aumento de las células GR-1$^+$CD11b$^+$ y CD4$^+$CD25$^+$Foxp3$^+$, y que la inmunosupresión en modelos de tumor y sepsis se asocia a la expansión de estas células supresoras/ regulatorias, decidimos evaluar la relevancia de estas poblaciones celulares tanto en el establecimiento como en el mantenimiento de la tolerancia.

En base a esto, en primer lugar determinamos la aparición de estas células durante el fenómeno de tolerancia. Así, ratones BALB/c fueron inoculados diariamente con LPS siguiendo un esquema de tolerancia/inmunosupresión durante 10 días. Luego, 48hs después de la última dosis de LPS se evaluaron, en bazo, las poblaciones celulares de interés. Como se muestra en la figuras 25a y 25b un incremento significativo tanto de células GR-1$^+$CD11b$^+$ como de células T regulatorias se observa en ratones tolerantes/inmunosuprimidos inducido por LPS.

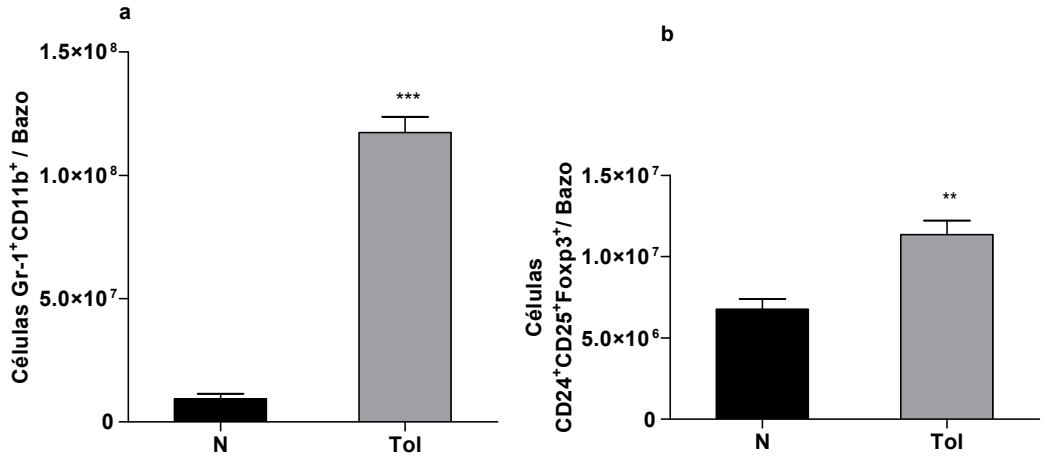


Figura 25: (a) Número total de células GR-1$^+$/CD11b$^+$ y (b) células CD4$^+$CD25$^+$Foxp3 $^+$ provenientes de bazo de ratones tratados con LPS (5 dosis de 0,2mg/Kg, seguido por 5 dosis de 4mg/Kg, i.p.) durante 10 días. Dos días más tarde de la última inoculación, los bazos fueron removidos y se evaluaron las diferentes poblaciones celulares mediante citometría de Flujo. Los resultados son expresados como la media ± S.E.M. (número de células /bazo) de un experimento representativo con 4-5 animales por grupo. Este experimento fue repetido 4 veces. N: ratones naive; Tol: ratones tratados con LPS. *p<0,01; ***p<0,001 significativamente diferente del grupo N.

5.6.3 Relevancia de las células supresoras/regulatorias durante el establecimiento de la tolerancia

Con el objetivo de determinar si este incremento en las poblaciones supresoras/ regulatorias participan de manera sustancial en las diferentes fases del fenómeno de tolerancia, utilizamos un tratamiento con citostáticos para eliminar y/o disminuir las poblaciones de interés. Así, la ciclofosfamida ha sido descripta a inducir una marcada

depleción de células T regulatorias en diferentes modelos estudiados, mientras que la gemcitabina se ha utilizado para la depleción de células supresoras GR-1^{+} CD11b^{+}[298,299].

Para analizar si dichas poblaciones participan en la inducción o en el establecimiento de la tolerancia, diseñamos un protocolo de tratamiento con las diferentes drogas a fin de eliminar la mayor proporción de estas células durante el período de tolerización.

Para el estudio de las poblaciones mieloides supresoras, ratones naive fueron inoculados con gemcitabina (120 mg/Kg; i.p) observando a las 48hs del tratamiento una clara reducción en el número de células GR-1^{+}CD11b^{+} en bazo. Luego, fueron tratados con una nueva dosis concomitantemente a una primera inoculación con LPS (5 µg/ratón; i.p) con el objetivo de iniciar el establecimiento de la tolerancia en ausencia de la población celular. El protocolo de tolerancia incluyó dos dosis adicionales de LPS de administración diaria. Finalmente, 24hs después de la última inoculación todos los ratones fueron desafiados con una dosis letal de LPS, o fueron sacrificados y evaluadas las poblaciones celulares en bazo por citometría de flujo. Por otro lado, un protocolo adicional utilizando ciclofosfamida, en lugar de gemcitabina, fue desarrollado en paralelo.

Los resultados en la figura 26a muestran un marcado aumento en el número de células GR-1^{+} CD11b^{+} en bazo de ratones tolerantes, como se mencionó previamente. Por otro lado, el tratamiento con gemcitabina durante el proceso de tolerización, induce una significativa reducción de esta población alcanzando valores similares a los normales. Sin embargo, a pesar de esta marcada disminución, el fenómeno de tolerancia pudo establecerse en todos los animales, dato observado frente al desafío de una dosis letal. Con el propósito de descartar que los niveles residuales de células GR-1^{+} CD11b^{+} que se observan frente al tratamiento con gemcitabina, tengan algún efecto sobre el establecimiento de la tolerancia, la utilización del protocolo con ciclofosfamida (100 mg/Kg; i.p.) prácticamente eliminó todas las células GR-1^{+}CD11b^{+}. Sin embargo, en ausencia de esta población, los animales resisten a una dosis letal de LPS confirmando los resultados obtenidos con gemcitabina.

En el caso de las células T regulatorias, durante el proceso de tolerización, se observa un aumento en el número de esta población aunque no alcanzó a ser significativamente diferente al control a nivel estadístico. Sin embargo, para descartar cualquier efecto de estas células sobre la inducción de la tolerancia, los animales fueron tratados utilizando un esquema similar al anterior, pero usando ciclofosfamida como droga de depleción

celular (100 mg/Kg; i.p.). También se llevaron en paralelo esquemas con gemcitabina para el estudio de esta población.

Los resultados muestran que el tratamiento con ambas drogas inducen una disminución en el número de células T regulatorias muy por debajo de los niveles normales, alcanzando un efecto de mayor potencia el tratamiento con ciclofosfamida (Figura 26 b). Sin embargo, a pesar de la marcada reducción de esta población, los animales resisten una dosis letal de LPS demarcando el establecimiento de la tolerancia.

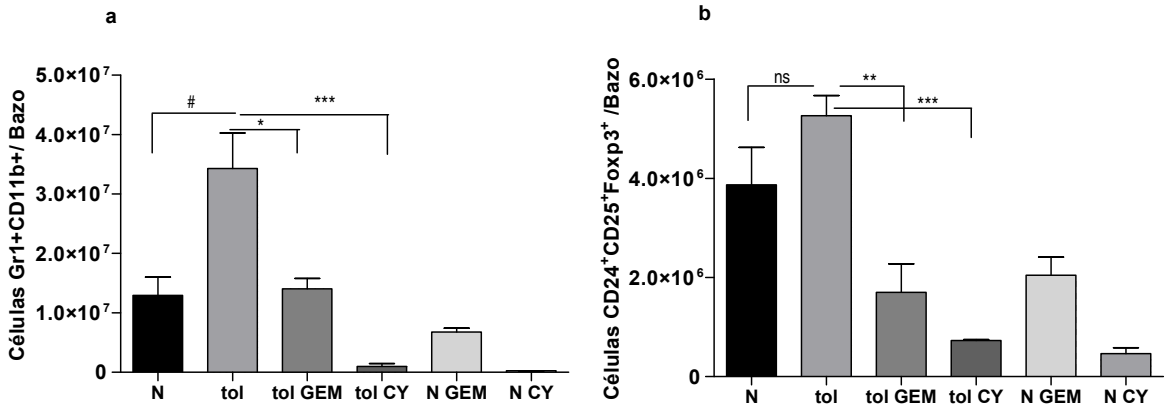


Figura 26: (a) Número total de células GR-1$^+$/CD11b$^+$ y (b) células CD4$^+$CD25$^+$Foxp3 $^+$ provenientes de bazo de ratones tratados, o no, con gemcitabina (GEM) o ciclofosfamida (CY) durante el establecimiento del fenómeno de tolerancia. Cuarenta y ocho horas después de la última inoculación de LPS, los esplenocitos fueron cosechados y evaluadas las poblaciones celulares mediante citometría de flujo. Ratones naive también fueron tratados, o no, con las drogas utilizando el mismo esquema. Los resultados son expresados como la media ± S.E.M. (número de células /bazo) de un experimento representativo con 3-4 animales por grupo. Este experimento fue repetido dos veces. El mismo diseño experimental fue conducido para evaluar la mortalidad frente al desafío con una dosis letal de LPS (Mortalidad: N: 7/7; NGEM: 6/6; NCY: 6/6; tol: 0/7; tolGEM: 0/6; tolCY: 0/6). N: ratones naive; tol: ratones tolerantes a LPS; tolGEM: ratones tratados con LPS y GEM; tolCY: ratones tratados con LPS y CY; NGEM: ratones naive tratados con GEM; NCY: ratones naive tratados con CY. #p< 0,01 significativamente diferente del grupo N; *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 significativamente diferente del grupo tol; n.s. no difiere significativamente del grupo N.

Así, los resultados mostrados en la figura 26 indican que tanto las células mieloides GR-1$^+$CD11b$^+$ como así también las células T regulatorias, no parecen tener una influencia directa en el proceso de establecimiento de la tolerancia.

5.6.4 Relevancia de las células supresoras/regulatorias en el mantenimiento de la tolerancia

Por otro lado, si bien la participación de estas células no parece ser sustancial para el establecimiento de la tolerancia, quisimos evaluar su importancia en el mantenimiento de la misma.

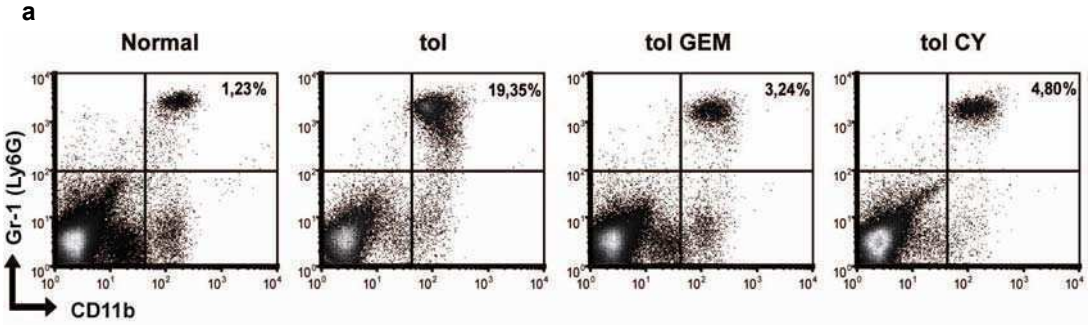
Así, ratones tolerantes/inmunosuprimidos a LPS fueron tratados con una dosis de gemcitabina (120mg/Kg, i.p) y 48hs después de la inoculación de la droga, en un grupo

de animales se determinó el nivel de células GR-1^{+}CD11b^{+} en el bazo y, en otro grupo los ratones fueron desafiados con una dosis letal de LPS para evaluar mortalidad. Un esquema similar con ciclofosfamida fue llevado en paralelo.

En la figura 27a y b se muestra una gran expansión de la población GR-1^{+}CD11b^{+} aumentando tanto en porcentaje como en número en los bazos de ratones tolerantes sugiriendo cierta relevancia para esta población en el mantenimiento del fenómeno. Sin embargo, una reducción significativa de esta población por el tratamiento con gemcitabina, no modifica el mantenimiento de la tolerancia dado que todos los animales resisten a una dosis letal de LPS. Resultados similares fueron obtenidos usando ciclofosfamida (150mg/Kg, i.p.), otra droga citostática la cual indujo una robusta eliminación de la población mieloide por debajo de los niveles normales (figura. 27a y b).

Para determinar la participación de las células T regulatorias desarrollamos un protocolo similar pero esta vez los animales tolerantes fueron tratados con ciclofosfamida (150mg/Kg, i.p.) y 48hs después del tratamiento se evaluó la mortalidad frente una dosis letal de LPS como así también los niveles de la población en bazo.

Los resultados muestran una inducción significativa de esta población en bazo de ratones tolerantes. Si bien el tratamiento con ciclofosfamida induce una marcada disminución en los niveles de esta población en bazo de ratones tolerantes, los animales resisten al desafío frente a una dosis letal de LPS denotando el mantenimiento de la tolerancia. Similares resultados fueron obtenidos utilizando gemcitabina (120mg/Kg, i.p), si bien el efecto sobre las células T regulatorias no fue tan pronunciado (figura. 27c).



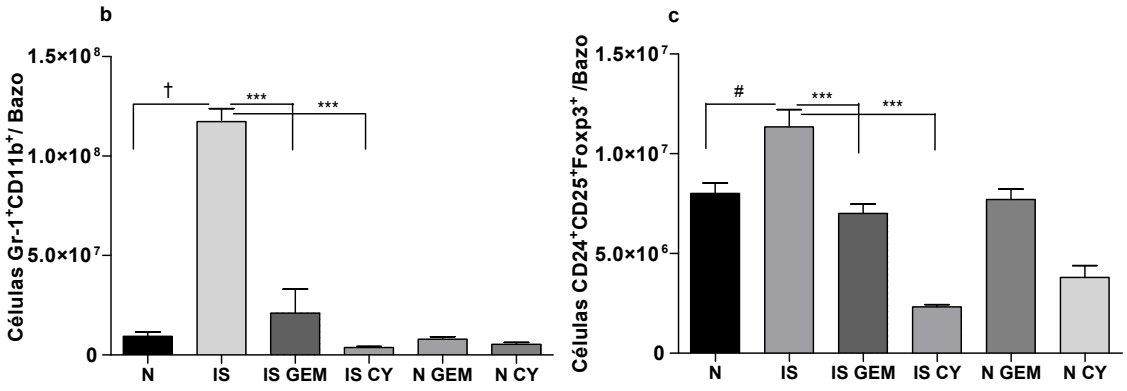


Figura 27: (a) Dot plot representativo de esplenocitos GR-1$^+$/CD11b$^+$ en diferentes grupos experimentales. (b) Número total de células GR-1$^+$/CD11b$^+$ y (c) células CD4$^+$CD25$^+$Foxp3 $^+$ provenientes de bazo de ratones tolerantes tratados, o no, con gemcitabina (GEM) o ciclofosfamida (CY) 24hs después de la última dosis de LPS. Cuarenta y ocho horas después del tratamiento con las drogas, los esplenocitos fueron cosechados y se evaluaron las poblaciones por citometría de flujo.Un grupo de ratones naive también fueron tratados, o no, con las drogas. Los resultados son expresados como la media ± S.E.M. (número de células/ bazo) de un experimetno representativo con 4-5 animales por grupo. Todos los experimentos fueron repetidos 3 veces. El mismo diseño experimental fue realizado para evaluar la mortalidad frente a una dosis letal de LPS (Mortalidad: N: 8/8; NGEM: 8/8; NCY: 6/6; tol: 0/8; tolGEM: 0/9; tolCY: 0/7). N: ratones naive; tol: ratones tolerantes a LPS; tolGEM: ratones tolerantes tratados con GEM; tolCY: ratones tolerantes tratados con CY; NGEM: ratones naive tratados con GEM; NCY: ratones naive tratados con CY. #p<0,01 y †p< 0,001 significativamente diferente del grupo N; ***p<0,001 significativamente diferente del grupo tol.

Así, todos estos resultados indican que tanto las células supresoras derivadas de mieloides GR-1$^+$CD11b$^+$, como así las células T regulatorias CD4+CD25+Foxp3, no tienen una influencia directa tanto en el establecimiento como en el mantenimiento del fenómeno de la tolerancia, dado que la ausencia o disminución de estas poblaciones no promueve una desarticulación del fenómeno.

DISCUSIÓN

6.- Discusión

En los últimos años diferentes grupos de investigación abocados tanto a estudios básicos como clínicos, han demostrado y enfatizado que la pérdida de la competencia inmune constituye uno de los principales problemas en los procesos de sepsis tardías[60]. En el caso de las sepsis inducidas por bacterias Gram-negativas, estos pacientes muestran signos claros de tolerancia a endotoxina[27,28], un fenómeno considerado como la fase inicial de la inmunosupresión[20,300]. Sin embargo, la tolerancia también se ha demostrado en procesos de sepsis inducidos por bacterias Gram-positivas, aunque presentando diferencias a nivel de ciertos mecanismos, como así también frente a otros cuadros patológicos como se ha mencionado en la introducción de este trabajo[23]. Si bien se ha considerado al fenómeno de tolerancia como un mecanismo protector contra el shock séptico, su incidencia se encuentra asociado con un riesgo aumentado de infecciones secundarias[17,211].

Varios trabajos han considerado que el fenómeno de tolerancia y las sepsis inducidas por bacterias por Gram-negativas comparten vías de mecanismos asociados a la inmunosupresión. De hecho, algunas de las similitudes encontradas entre tolerancia e inmunosupresión inducida por sepsis son: disfunciones de macrófagos inducidas por sepsis y macrófagos tolerizados con endotoxina[17], la prevalencia de mecanismos moleculares comunes observados en la respuesta disminuida a LPS tanto en monocitos de pacientes con sepsis como en células tolerantes a endotoxina[102,220], y la asociación entre la tolerancia a endotoxina y la susceptibilidad a la reinfección[25].

Estas son algunas de las razones por las cuales los estudios de la regulación de la tolerancia a LPS han merecido la atención de muchos grupos de investigación en todo el mundo.

Sin embargo, a pesar de estos esfuerzos, el complejo fenómeno de la tolerancia a endotoxinas aún no se ha dilucidado por completo. Parte de esta complejidad puede deberse a los diferentes agentes, factores o mecanismos implicados en la tolerancia / inmunosupresión inducida por LPS, tales como: la downregulación de las vías de señalización asociadas a los TLR, la inhibición de factores de transcripción como el NF-κB[214], la disminución de quimioquinas y sus receptores como la fractalquina[301], la participación de citoquinas como IL-10 y TGF-β[31], de GC[19,32,160], catecolaminas[302,303], mecanismos de depleción de células dendríticas[304],etc. Además, se ha demostrado que el LPS tiene la capacidad de regular más de 1500 genes[305].

Si bien la relevancia de los GC en la tolerancia/inmunosupresión inducida por LPS ha sido reconocida, algunos de sus efectos siguen siendo controvertidos y aún no completamente comprendidos[30,32,33].
Esto puede deberse a las acciones pleiotrópicas de los GC[33,306], a las diferencias entre los modelos utilizados, o más probablemente, a las conclusiones derivadas de estudios dirigidos para investigar una etapa particular de la tolerancia a endotoxina (por ejemplo el mantenimiento), siendo luego generalizadas de manera inapropiada.

En este estudio evaluamos en primer lugar la participación de los GC endógenos y exógenos (Dex) en dos fases diferentes y relevantes de la tolerancia a endotoxina: el establecimiento, un corto período con prevalencia de citoquinas proinflamatorias; y el mantenimiento, un período más largo con una predominancia de agentes anti-inflamatorios. Por otro lado, estudiamos la relevancia de ciertas poblaciones celulares asociadas a los estados de inmunosupresión analizando su participación en las diferentes fases del fenómeno. Y finalmente, evaluamos la relevancia de los GC endogénos en la inmunosupresión humoral y celular inducida por LPS.

6.1 Etapa de Establecimiento del fenómeno de tolerancia a endotoxina

Uno de los efectos conocidos de los LPS es la inducción de altos niveles de GC en plasma mediante la activación del eje hipotálamo-pituitaria-adrenal. Considerando un contexto de tolerancia se ha reportado y hemos observado niveles elevados de GC en plasma de ratones tolerantes. Estas cuestiones nos permitieron especular que los GC podrían ser los responsables de la inducción de la tolerancia a LPS. Sin embargo, la administración exógena de Dex no posibilitó la inducción del fenómeno.

Por otro lado, evaluando la relevancia de los GC durante la fase de establecimiento observamos que inhibiendo su acción endógena por RU486, el fenómeno se establece normalmente. Por otra parte, la administración exógena de un GC síntético como la Dex durante dicha fase inhibe la inducción del fenómeno.

Estas observaciones indican que si bien la presencia del GC promueve una protección frente a una dosis letal de LPS, paradójicamente, la presencia de Dex inhibe el establecimiento de la tolerancia a endotoxina. Esto indica que los GC durante el montaje del fenómeno no tienen una participación sustancial, por el contrario, la administración exógena durante la inducción de la tolerancia impide que se establezca.

Una explicación para dicha observación es considerar el efecto anti-inflamatorio de los GC que promueven la inhibición de la secreción de mediadores inflamatorios, los cuales pueden ser relevantes para el establecimiento del fenómeno. El rol central de ciertas citoquinas proinflamatorias, como el TNF-α, actuando como mediadores en el fenómeno de tolerancia y en los procesos sépticos, ha sido ampliamente demostrado en diferentes modelos animales. Además, muchas de las alteraciones fisiológicas que se desarrollan durante las sepsis han podido ser parcialmente mimetizadas mediante la administración de TNF-α. Dicha citoquina es una de las primeras inducidas por la estimulación con LPS y es capaz de inducir un shock letal similar al que ocurre con dosis letales de LPS[27]. Sin embargo, si bien la Dex inhibe la producción de dicha citoquina durante el establecimiento del fenómeno, observamos tanto en estudios *in vivo* como *in vitro* que el TNF-α no parece ser una citoquina relevante para que el fenómeno se establezca, dado que su adminitración *in vivo* no permite inducir la tolerancia y, en consonancia, en ausencia de dicha citoquina el fenómeno puede establecerse normalmente.

Por tanto, en nuestro modelo, el TNF-α no parece ser una citoquina responsable del establecimiento de la tolerancia. Estos resultados están en concordancia con los propuestos por Medvedev *et. al.*[291], pero son contrarios a los reportes de otros autores donde sugieren que el TNF-α promueve el establecimiento de la tolerancia[199,201]. Estas discrepancias pueden deberse a que en ciertos trabajos donde se postula un rol esencial para el TNF-α los experimentos se llevaron a cabo utilizando dosis de TNF-α no fisiológicas (200 µg/kg/día por 5 días consecutivos)[199] como también por los diferentes modelos utilizados o diferentes especies[201].

Sin embargo, dado que los GC como la Dex inhiben la producción de un conjunto de citoquinas proinflamatorias tales como TNF-α, IL-1α, IL-1β, IL-12, IFN-γ, IL-6, IL-8[33,235], esto nos sugiere pensar que otros agentes proinflamatorios, y no el TNF-α, puedan ser requeridos para el establecimiento de la tolerancia.

En línea con esto, en trabajos desarrollados en nuestro grupo, hemos observado previamente que la IL-1β fue capaz de inducir el establecimiento de la tolerancia a endotoxina *in vivo*, determinado mediante la protección frente a una dosis letal, donde observamos un aumento en los niveles de GC y una disminución en la expresión del TLR4, parámetros asociados a un contexto tolerante[141].

En los últimos años se le han adjudicado un rol relevante a ciertas poblaciones celulares siendo consideradas responsables de la inmunosupresión en diferentes modelos. Así las células supresoras derivadas de mieloides ($GR\text{-}1^+/CD11b^+$) y las células T regulatorias ($CD4^+CD25^+Foxp3^+$) han sido involucradas en la alteración inmune vista en modelos tumorales[165,168], en modelos de estrés traumático[110], como también en modelos de sepsis polimicrobiana[10,169].

Considerando al fenómeno de tolerancia como un evento inicial de la inmunosupresión que se observa en procesos de sepsis, en este trabajo evaluamos la relevancia de las poblaciones celulares supresoras/regulatorias en dicho fenómeno. En primer lugar, y consistente con los reportes anteriores, observamos un incremento significativo de estas poblaciones en ratones tolerantes/inmunosuprimidos inducido por LPS.
Analizando su importancia durante el establecimiento del fenómeno, observamos que la disminución de dichas poblaciones, mediante el uso de drogas citostáticas, no imposibilita que el fenómeno se establezca normalmente. Estos resultados nos permiten considerar que, si bien estas células pueden encontrarse involucradas en mecanismos específicos que promuevan la alteración del *status* inmune, no parecen ser relevantes para el establecimiento de la tolerancia, dado que aún en su ausencia el fenómeno logra establecerse.

6.2 Etapa de Mantenimiento del fenómeno de tolerancia a endotoxina

Evaluando la participación de los GC durante el mantenimiento de la tolerancia, observamos que bloqueando su acción mediante el uso de un inhibidor competitivo de receptores para GC (RU486) se logra la desarticulación del fenómeno.

Dicho efecto ocurre de manera transitoria permitiendo la apertura de ventanas temporales en las cuales los animales vuelven a ser susceptibles a una dosis letal de LPS. Los períodos de desarticulación concuerdan con el aumento en los niveles de ciertas citoquinas estudiadas como TNF-α IFN-γ e IL-10. Luego de ese tiempo, el sistema retorna al estado refractario inicial, hecho que denota el efecto reversible del tratamiento con RU486. Así, estos resultados sugieren un rol central de los GC durante el mantenimiento de la tolerancia.

En línea con esto, varios trabajos han propuesto a la IL-10 como una citoquina relevante en el fenómeno de tolerancia, adjudicandole un rol central en vista de los niveles elevados en diferentes modelos[19,21]. Sin embargo, su modo de acción sigue siendo

bastante controversial. De hecho, algunos autores consideran que la IL-10 es una citoquina central para el establecimiento de la tolerancia[31], mientras que otros consideran que es crítica para el mantenimiento pero no así para el establecimiento de la tolerancia[139,161].

Los resultados en este trabajo donde observamos bajos niveles de IL-10 en animales tolerantes y altos valores en tolerantes tratados con RU486 nos sugieren que dicha citoquina no parece ser crucial para el mantenimiento de la tolerancia. Estos datos están en línea con resultados de Baykal *et al*. [290] y otros autores quienes han reportado una disminución en los niveles de IL-10 en plasma en modelos de tolerancia[215,290]. Por otro lado, Berg *et.al.* han demostrado que ratones knock-out para IL-10 pueden ser tolerizados con LPS[139].

Sin embargo, no podemos descartar un posible rol para la IL-10, debido a que es posible la existencia de mecanismos redundantes en la regulación de la tolerancia a endotoxina.

Es importante tener en cuenta la existencia de mecanismos de regulación muy controvertidos entre los GC y la IL-10. Si bien se considera la existencia de una regulación transcripcional de los GC a nivel de elementos respondedores en el promotor del gen para IL-10[307], algunos trabajos han reportado una regulación bifásica sobre la secreción de dicha citoquina. A bajas concentraciones de dexametasona se estimula la secreción de IL-10 en cultivos celulares de sangre entera en humanos, mientras que, a altas concentraciones se inhibe la secreción. Además han observado que el pretratamiento con IL-10 en una línea celular de monocitos promueve un aumento en el número de receptores para glucocorticoides (GR)[308]. Por otro lado, otros autores han demostrado que dicha citoquina anti-inflamatoria regula la síntesis de GC de manera negativa mediante la inhibición de los efectos de la hormona adrenocorticotrópica (ACTH)[70,309]. Estas consideraciones dejan entrever una compleja regulación bidireccional entre los GC y la IL-10 siendo un punto de gran interés para desarrollar estudios futuros.

Como se mencionó anteriormente, el fenómeno de tolerancia ha sido asociado con los cuadros de inmunosupresión que se observa en procesos de sepsis avanzadas. En este contexto, muchos pacientes mueren en etapas más tardías con signos de infecciones oportunistas acompañados por una disminución en la expresión del HLA-DR y una capacidad reducida para producir TNF-α *in vitro*[28]. Estas consideraciones fueron de gran relevancia a fin de poder definir estrategias de tratamientos, teniendo en cuenta que la

mayoría de los tratamientos desarrollados basados en el control de la fase inflamatoria no han tenido aún resultados exitosos[7,70].

Así, muchos investigadores han demostrado la reversión de la tolerancia/inmunosupresión en sepsis utilizando IFN-γ, factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF) o factor estimulador de colonias de macrófagos-granulocitos (GM-CSF)[28,310,311]. De hecho, el IFN-γ administrado en pacientes sépticos restauró la expresión disminuida de la molécula HLA-DR, la producción de TNF-α inducida por LPS *in vitro* y el *clearance* bacteriano[20], aunque el efecto sobre la respuesta inmune no es conocido.

En este trabajo demostramos que el efecto de desarticulación del RU486 sobre el fenómeno de tolerancia, si bien es un modelo murino, se asemeja al obtenido por el tratamiento con IFN-γ. La desarticulación evaluada con el tratamiento con IFN-γ mostró ser transitoria y reversible similar al efecto del RU486.

En cuanto a la participación de poblaciones celulares supresoras/regulatorias en los procesos de inmunosupresión y la dramática expansión observada en bazo de ratones tolerantes/inmunosuprimidos inducido por LPS, consideramos relevante estudiar la participación de dichas células durante el mantenimiento del fenómeno de tolerancia. Así, al igual que en la fase de establecimiento, utilizamos drogas citostáticas para disminuir o eliminar parcialmente las poblaciones de interés en ratones tolerantes. Los resultados indican que si bien existe una fuerte expansión de células supresoras derivadas de mieloides ($GR\text{-}1^+/CD11b^+$) y un incremento significativo en el número de células T regulatorias, no parecen tener una relevancia sustancial en el mantenimiento de la tolerancia, dado que, en ausencia de las mismas los ratones sobreviven frente al desafío de una dosis letal, demarcando el estado tolerante.

Considerando la relevancia de los GC en el fenómeno de tolerancia/inmunosupresión, teniendo en cuenta la inducción de dichas poblaciones en ratones tolerantes y considerando el aporte de ciertos autores quienes han demostrado la inducción de estás poblaciones mediante el tratamiento con GC *in vitro*[294,312], evaluamos en este trabajo la posible relación entre estás poblaciones celulares y los GC de manera *in vivo*, demostrando que el tratamiento con dexametasona fue capaz de inducir un incremento en las poblaciones GR-1+CD11b+ y células T regulatorias CD4+CD25+Foxp3+ en bazo de ratones normales.

Así, en base a estos resultados y teniendo en cuenta los niveles elevados de GC en plasma de animales tolerantes/inmunosuprimidos y su participación en el mantenimiento del fenómeno, todos estos datos nos permiten sugerir que la presencia de estas poblaciones celulares podría estar asociada más a un epifenómeno, inducido parcialmente por los GC, que a la causa del estado de tolerancia dado que la depleción o disminución de las mismas no modifica el fenómeno.

Sin embargo, es necesario aclarar que estos resultados no descartan que estas poblaciones celulares puedan ser parte de mecanismos redundantes de inmunosupresión o bien mecanismos específicos de inmunosupresión pero que no se asocian con la sobrevida del animal. En línea con esto, Delano *et al.*[10] ha demostrado en modelos de sepsis polimicrobiana que la expansión de las células GR-1+CD11b+ contribuye a la inmunosupresión de células T inducida por sepsis, mientras que Scumpia *et al*. si bien demuestra un aumento relativo en número de células T regulatorias como así también en su capacidad supresora, no contribuyen a la sobrevida del animal en un modelo de sepsis polimicrobiana[169].

Por otro lado, y en términos aclaratorios, es conocido que los efectos de las drogas utilizadas en este estudio, ciclofosfamida y gemcitabina, pueden producir efectos sobre otros tipos celulares[313-315]. Por ende, si bien la ausencia o disminución de estas células no modifica el fenómeno de tolerancia, la evaluación directa de la respuesta inmune no fue posible desarrollar en este modelo, debido a que estas drogas, en si mismas, podrían tener efectos de inhibición o estimulación de la respuesta inmune[299,316,317].

6.3 Respuesta inmune humoral y celular

Si bien durante años se han desarrollado estrategias terapéuticas dirigidas a frenar la exacerbada respuesta inflamatoria que ocurre en las primeras fases de la sepsis, utilizando anti-inflamatorios como GC naturales o sintéticos, en su mayoría los intentos por resolver dichas patologías han fracasado[30,33]. Esto está en asociación con las ideas planteadas en este trabajo y por otros autores, quienes consideramos de gran importancia los eventos más tardíos que ocurren en estos síndromes, con un predominante estado anti-inflamatorio, que finalmente, pueden concluir en una inmunosupresión severa acompañada con signos claros de un estado tolerante[23,60]. En base a esto, es que consideramos de gran relevancia el desarrollo de estrategias que permitan recuperar o preservar la función inmune del paciente, considerando este enfoque de gran importancia en el manejo de la sepsis[17,60].

La asociación entre GC y sepsis siempre estuvo más bien acompañada por una idea colectiva de la utilización de éstos en el desarrollo de terapias asociados a la disminución de la fase inflamatoria (SIRS) más que darles una importancia fisiológica en el propio sindrome en sí mismos. Desde el punto de vista de un abordaje terapéutico para disminuir el SIRS, una cuestión interesante que sigue siendo un punto controversial en la mayoría de los trials desarrollados, es el uso de bajas dosis de hidrocortisona durante aproximadamente 5-7 días en cuadros de shock sépticos. Si bien es una estrategia bastante aceptada, aunque sigue en discusión, lo interesante es la observación de que dicha terapia encuentra beneficio solo en aquellos pacientes con shock que se encuentran cursando cuadros de insuficiencia adrenal[285,318]. Mi intención en este punto es rescatar la importancia que denota dicha observación en cuanto al rol que juegan los GC endógenos siendo necesario reestablecer los niveles fisiológicos, permitiendo así una mayor sobrevida en los pacientes. Si bien la participación de los GC en la inmunosupresión observada en pacientes con sepsis aún sigue siendo una pregunta abierta, lo notable es observar que tanto una producción reducida de GC en cuadros de insuficiencia adrenal así como altos niveles de GC en plasma de pacientes, ambos parámetros se encuentran asociados a un peor pronóstico[20,35].

Ahora bien, más interesante es considerar la importancia que se le ha adjudicado a los GC como actores activos de los fenómenos de sepsis cumpliendo un rol en la patofisiología de la enfermedad. Así, algunos trabajos han reportado y demostrado una fuerte correlación entre niveles elevados en plasma de pacientes con sepsis y un peor pronóstico y evolución de la enfermedad[270,280]. Más aún, se ha reportado que los altos niveles de GC en plasma se correlacionan con la disminución de la expresión de moléculas HLA-DR en superficie de monocitos circulantes, evento que es considerado como un marcador principal de inmunosupresión en sepsis. Estos mismos autores evidenciaron *in vitro* que los GC disminuyen la expresión de HLA-DR a nivel transcripcional mediante la *down*-modulación de ciertos factores de transcripción implicados en la expresión de dichas moléculas[270].

Estas observaciones revalorizan la importancia de los GC como actores fundamentales en los procesos de sepsis asociados a un peor pronóstico de la enfermedad y a cuadros de depresión inmune.

En base a estas consideraciones, y teniendo en cuenta el rol fundamental de la tolerancia en este contexto, decidimos evaluar el efecto que conlleva bloquear la acción de los GC

endógenos mediante el uso del RU486, a nivel de la respuesta inmune humoral como celular en modelos de tolerancia /inmunosupresión.

En primer lugar evaluamos ciertos parámetros asociados a un estado de depresión inmune. Así, observamos una disminución en la expresión del receptor TLR4 y de moléculas MCHII en poblaciones esplénicas CD11b+ de ratones inmunosuprimidos, marcadores claves para el reconocimiento y presentación antigénica. Este dato concuerda con varios autores demarcando un *status* inmune alterado[23].

Existen varias controversias respecto a considerar si la inducción de la tolerancia conduce a una sensibilidad aumentada a procesos infecciosos. Varios autores demostraron una diminuida capacidad de *clearance* de ciertos patógenos bacterianos[208,319], una habilidad reducida para controlar infecciones virales[206] y una reducida capacidad fagocítica[208,293] en modelos de tolerancia *in vivo* asociando dichas observaciones a un estado de inmunosupresión/inmunoparalisis[58]. En estudios *in vitro* se observó que macrófagos expuestos previamente a LPS presentan una actividad leishmanicida reducida[207] y se muestran menos respondedores a variados estímulos incluyendo *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, o zymosan[138].

Por otro lado, varios autores consideran que la tolerancia a endotoxina aumenta la resistencia a infecciones bacterianas, fúngicas y a peritonitis experimental mediante un *clearance* acelerado[320,321]. En modelos de tolerancia *in vitro* con monocitos humanos del Fresno *et al*. reportaron una potente actividad fagocítica asociada a un aumento en la expresión del receptor Fc-γRI de alta afinidad (CD64), un marcador de superficie altamente asociado a los mecanismos de fagocitosis[222].
Estas discrepancias se encuentran asociadas a variadas consideraciones como por ejemplo la utilización de diferentes modelos experimentales (ratón vs. humano; dosis de LPS; vías de inoculación), observaciones hechas sobre diferentes tipos celulares provenientes de diferentes órganos (monocitos circulantes, macrófagos peritoneales; neutrófilos, esplenocitos; hepatocitos), como también la utilización de diferentes antígenos en los ensayos de fagocitosis como ser partículas, productos bacterianos, bacterias muertas, bacterias viables, patógenos fúngicos etc, mecanismos que involucran diferentes vías de entradas que pueden diferir unas de otras en un contexto tolerante.

En base a estas consideraciones, en nuestro modelo, observamos una disminuida capacidad fagocítica en células esplénicas $CD11b^+$ utilizando como antígeno un producto proveniente de patógenos fúngicos como es el zymosán. Estos resultados se encuentran

en línea con los primeros reportes planteados los cuales sugieren una asociación entre el fenotipo tolerante y un estado de inmunosupresión caracterizado por una disfunción a nivel de monocitos, estado que algunos autores han definido como “inmunoparálisis”.

Teniendo en cuenta la participación sustancial de los GC en el fenómeno de tolerancia/inmunosupresión evaluamos si el tratamiento con RU486 permitía modular o revertir las observaciones enmarcadas en un cuadro de depresión inmune. Sin embargo, no observamos ninguna modificación frente al tratamiento a nivel de los parámetros evaluados.

Es importante aclarar que tanto la evaluación de marcadores de superficie como así aspectos funcionales como la capacidad fagocítica fueron evaluadas utilizando un esquema de tratamiento con RU486 donde se realizan las determinaciones 6 días post tratamiento. Teniendo en cuenta el efecto transitorio que ejerce el RU486, observado en la desarticulación de la tolerancia, esto nos permite dejar abierta la posibilidad para considerar nuevos esquemas de tratamiento en los cuales sea posible ver un efecto más claro de la participación de los GC en la regulación de los parámetros estudiados.

Por el contrario, cuando evaluamos el efecto del tratamiento con RU486 a nivel de la respuesta humoral, observamos una parcial pero significativa restauración de la respuesta frente a un antígeno T dependiente en ratones tolerantes/inmunosuprimidos. Esta restauración parcial de la competencia inmunológica nos sugiere un rol central para los GC en este fenómeno. Por otro lado, considerando que el RU486 ejerce una desarticulación transitoria y reversible de la regulación de la tolerancia/inmunosupresión, y no un efecto irreversible, esto implica que el RU486 permite la apertura de ventanas que, si bien son transitorias, son centrales para el inicio de una respuesta inmune humoral primaria.

En los estudios evaluando la respuesta humoral secundaria, al igual que en la primaria, el tratamiento con RU486 indujo un restauración parcial de la respuesta en ratones tolerantes/inmunosuprimidos inducido por LPS. El reestablecimiento de la competencia inmune nos permite analizar dos consideraciones. Por un lado, la parcialidad en la recuperación de la respuesta, tanto 1^{ria} como 2^{ria}, podría entenderse considerando las implicancias que tienen los altos niveles de GC en plasma los cuales han sido involucrados en mecanismos de inducción de la apoptosis sobre linfocitos T $CD4^{+}$ [322], efecto que podría de manera indirecta alterar la eficiencia de una respuesta inmune humoral frente a antígenos T dependiente. Además algunos autores han reportado una debilitación en la formación de centros germinales frente a una inmunización en modelos

de administración crónica de GC[323]. Por otro lado, aunque parcial, la restauración en la respuesta humoral secundaria nos estaría indicando que al menos algunos clones celulares que se encuentran comprometidos en la respuesta secundaria pueden haber sido funcionalmente afectados, pero no totalmente eliminados por el tratamiento con LPS, pues de lo contrario no se hubiera observado una restauración inmune.

Así, estos resultados en conjunto nos conducen a considerar que una estrategia mediante el tratamiento con RU486 posibilitaría modular la respuesta humoral durante el curso de una inmunosupresión.

.

La capacidad del RU486 en la reversión de la inmunosupresión fue extendida a la respuesta inmune mediada por células T. En este caso, el RU486 restauró la capacidad de rechazo tumoral frente a tumores MC-C altamente inmunogénicos, una propiedad estrictamente dependiente de una respuesta inmune específica mediada por células T[289]. Por otro lado la razón de la recuperación parcial a nivel de la respuesta celular podría ser debido, al igual que en la respuesta humoral, a la inducción de apoptosis en células T mediado por la acción de los GC[322]. Así, la inoculación de LPS durante un período de 12 días podría inducir un estado de tolerancia/inmunosupresión acompañada con una disminución en el número de células T, probablemente siendo esto una causa adicional de inmunosupresión.

Resultados similares fueron observados en ensayos de proliferación inespecífica *in vitro*, en esquemas donde el tratamiento con RU486 se realizó *in vivo* 2 horas antes del ensayo de proliferación. Así, estos resultados sugieren que los GC también participan como agentes inmunosupresores a nivel del compartimiento de células T en ratones inmunosuprimidos inducido por LPS.

Sin embargo cuando evaluamos la capacidad proliferativa antígeno específica utilizando un esquema de tratamiento con RU486 más distanciado en el tiempo no observamos un efecto del tratamiento. Estas discrepancias pueden deberse, por un lado, a la disponibilidad de clones específicos para el antígeno utilizado entre las poblaciones esplénicas en el momento del ensayo; por otro lado y principalmente, pueden deberse a los tiempos en los cuales evaluamos el efecto del RU486, siendo tiempos demasiado extensos para poder observar una acción clara del tratamiento teniendo en cuenta el efecto transitorio que ejerce dicho antagonista.

En conjunto nuestros resultados jerarquizan el efecto de los GC en diferentes instancias de los procesos de inmunosupresión, instalándolos en el centro de la escena de su regulación fisiopatológica e indicando que la modulación de su acción podría ser una

herramienta importante para, eventualmente, desarrollar estrategias que permitan reinstalar o recuperar un respuesta inmune activa en pacientes con sepsis, a fin de evitar, por ejemplo, eventos de reinfecciones o reactivación viral que muchas veces son cuadros asociados a una gran incidencia de mortalidad[60].

Considerando todo lo dicho anteriormente, sucintamente y en términos generales en este trabajo demostramos que:

- En el fenómeno de tolerancia a endotoxina los GC juegan un rol dual, inhibiendo el establecimiento del fenómeno pero siendo esenciales en el mantenimiento del mismo.
- El fenómeno de tolerancia puede ser desarticulado de manera transitoria y reversible inhibiendo la acción de los GC.
- Las poblaciones celulares supresoras/regulatorias no constituyen un eje central en el establecimiento como en el mantenimiento del fenómeno de tolerancia. Su inducción en dicho fenómeno parece estar asociado más a un epifenómeno inducido en parte por la acción de los GC, que ser la causa de un estado tolerante.
- En un modelo de tolerancia /inmunosupresión la inhibición de la acción de los GC permite una restauración parcial tanto de la respuesta humoral como de la respuesta celular en ratones tolerantes/inmunosuprimidos inducidos por LPS.

7.- Conclusión General

El objetivo de este trabajo fue abordar desde un marco general un proceso de gran complejidad como es el fenómeno de tolerancia/ inmunosupresión en sepsis, utilizando para ello un modelo ratón y endotoxinas como agente inmunosupresor. El estudio de estos fenómenos constituye, frecuentemente, un entramado compuesto por gran cantidad de variables y son abordados desde puntos de vistas más específicos, considerando la gran relevancia que presentan los diferentes procesos que componen el fenómeno, como ser el perfil de ciertas citoquinas, determinados mecanismos celulares como la apoptosis, o bien la participación de ciertas poblaciones celulares. En ocasiones estas visiones aplicadas a fenómenos de gran envergadura pueden conducirnos a conclusiones particulares que permiten explicar ciertos aspectos del fenómeno, pero nos limitan en la comprensión de la totalidad. Por otra parte, estas observaciones señalan eventos relevantes en un proceso, que constituyen más un conjunto de mecanismos efectores que son la consecuencia y no la causa del fenómeno.

Desde una perspectiva más general en el estudio de dichos fenómenos consideramos, *a priori*, y a modo de hipótesis después, que los ejes centrales de la regulación de estos complejos procesos multisitémicos tienen, seguramente, muchos mecanismos reguladores redundantes, aunque pensamos que deberían expresar ciertas jerarquías en sus mecanismos de regulación sobre los que eventualmente pudieran plantearse, entre otras cosas, alternativas terapéuticas racionales.

Así, como hemos visto, la participación sustancial de los GC en la tolerancia ha sido considerado como un mecanismo central que, aunque si bien no es el único, constituye uno de los grandes pilares del fenómeno. Considerando a la tolerancia como un evento que ocurre en los procesos de sepsis, punto en el cual toma relevancia el estudio de dicho fenómeno, en estos síndromes la idea de considerarlos actores activos en la patofisiología de la enfermedad no ha sido muy tenido en cuenta. En efecto, la aparición de los GC en los procesos de sepsis surge, en principio, como un concepto empírico de terapia utilizando, en sus inicios, dosis altas de GC con el fin de contrarrestar los efectos inflamatorios iniciales en las sepsis. Sin embargo, si bien posibilitaban el freno del shock agudo en la fase SIRS, habitualmente cuando concurren al médico estos pacientes ya se encuentran en la fase anti-inflamatoria o CARS, en donde las terapias no sólo no eran beneficiosas sino por el contrario aumentaban la incidencia de muerte. Frente a estas observaciones la importancia y la utilización de los GC en la sepsis fue abandonada al principio de la década del ´80.

Comenzó entonces la época de muchos estudios abocados a los perfiles de citoquinas y otros mediadores y mecanismos celulares considerandolos centrales en los procesos y visualizándolos como posibles *targets* para el desarrollo de terapias, aunque sin éxito. En los años recientes comenzaron a resurgir nuevamente los GC como posibles terapias para los síndromes, aunque esta vez utilizando bajas dosis y con estrictas definiciones en lo que respecta a su adminitración. De hecho, el éxito de dicho tratamiento se obtuvo en cuadros de shock principalmente en aquellos acompañados con insuficiencia adrenal.

Estas consideraciones demarcan la relevancia de los GC endógenos en estos síndromes, denotando la importancia de reestablecer los niveles fisiológicos a fin de alcanzar una mayor sobrevida en dichos pacientes. Un salto cualitativo se dio al considerar la relevancia de los altos niveles observados en pacientes con peor pronóstico o bien no sobrevivientes demarcando su participación en los cuadros de inmunosupresión.

Bajo estas observaciones es que consideramos relevantes los resultados obtenidos en este trabajo, en donde nos planteamos primero y demostramos después, la participación central y predominante de los GC en fenómenos regulatorios y efectores en la tolerancia / inmunosupresión inducido por LPS. Estas observaciones nos permiten proyectarnos hacia futuros trabajos teniendo como interés el desarrollo de modelos de sepsis experimental desarrollando posibles esquemas de tratamiento experimental, con el objetivo de reestablecer o mejorar la competencia inmunológica permitiendo restaurar la homeostasis del organismo y evitando finalmente los eventos de reinfección secundaria los cuales son, predominantemente, los causantes finales de la muerte del invididuo.

Referencias

1. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, et al. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. Chest. 1992;101:1644-1655.
2. Matsuda N, Hattori Y. Systemic inflammatory response syndrome (SIRS): molecular pathophysiology and gene therapy. J Pharmacol Sci. 2006;101:189-198.
3. Nystrom PO. The systemic inflammatory response syndrome: definitions and aetiology. J Antimicrob Chemother. 1998;41 Suppl A:1-7.
4. Adib-Conquy M, Cavaillon JM. Compensatory anti-inflammatory response syndrome. Thromb Haemost. 2009;101:36-47.
5. Oberholzer A, Oberholzer C, Moldawer LL. Sepsis syndromes: understanding the role of innate and acquired immunity. Shock. 2001;16:83-96.
6. Riedemann NC, Guo RF, Ward PA. The enigma of sepsis. J Clin Invest. 2003;112:460-467.
7. Deans KJ, Haley M, Natanson C, Eichacker PQ, Minneci PC. Novel therapies for sepsis: a review. J Trauma. 2005;58:867-874.
8. Efron P, Moldawer LL. Sepsis and the dendritic cell. Shock. 2003;20:386-401.
9. Osuchowski MF, Welch K, Siddiqui J, Remick DG. Circulating cytokine/inhibitor profiles reshape the understanding of the SIRS/CARS continuum in sepsis and predict mortality. J Immunol. 2006;177:1967-1974.
10. Delano MJ, Scumpia PO, Weinstein JS, et al. MyD88-dependent expansion of an immature GR-1(+)CD11b(+) population induces T cell suppression and Th2 polarization in sepsis. J Exp Med. 2007;204:1463-1474.
11. Kessel A, Bamberger E, Masalha M, Toubi E. The role of T regulatory cells in human sepsis. J Autoimmun. 2009;32:211-215.
12. Liu C, Li A, Weng YB, Duan ML, Wang BE, Zhang SW. Changes in intestinal mucosal immune barrier in rats with endotoxemia. World J Gastroenterol. 2009;15:5843-5850.
13. Limaye AP, Kirby KA, Rubenfeld GD, et al. Cytomegalovirus reactivation in critically ill immunocompetent patients. JAMA. 2008;300:413-422.
14. Luyt CE, Combes A, Deback C, et al. Herpes simplex virus lung infection in patients undergoing prolonged mechanical ventilation. Am J Respir Crit Care Med. 2007;175:935-942.
15. Cavaillon JM, Adib-Conquy M. Determining the degree of immunodysregulation in sepsis. Contrib Nephrol. 2007;156:101-111.
16. Wisnoski N, Chung CS, Chen Y, Huang X, Ayala A. The contribution of CD4+ CD25+ T-regulatory-cells to immune suppression in sepsis. Shock. 2007;27:251-257.
17. Wang TS, Deng JC. Molecular and cellular aspects of sepsis-induced immunosuppression. J Mol Med. 2008;86:495-506.
18. Cavaillon JM. The nonspecific nature of endotoxin tolerance. Trends Microbiol. 1995;3:320-324.
19. Cavaillon JM, Adib-Conquy M. Bench-to-bedside review: endotoxin tolerance as a model of leukocyte reprogramming in sepsis. Crit Care. 2006;10:233.
20. Cavaillon JM, Adrie C, Fitting C, Adib-Conquy M. Endotoxin tolerance: is there a clinical relevance? J Endotoxin Res. 2003;9:101-107.
21. West MA, Heagy W. Endotoxin tolerance: A review. Crit Care Med. 2002;30:S64-S73.
22. Fan H, Cook JA. Molecular mechanisms of endotoxin tolerance. J Endotoxin Res. 2004;10:71-84.
23. Biswas SK, Lopez-Collazo E. Endotoxin tolerance: new mechanisms, molecules and clinical significance. Trends Immunol. 2009;30:475-487.
24. Appoloni O, Vincent JL, Duchateau J. Response of tumour necrosis factor-alpha to delayed in vitro monocyte stimulation in patients with septic shock is related to outcome. Clin Sci (Lond). 2002;102:315-320.
25. Broad A, Jones DE, Kirby JA. Toll-like receptor (TLR) response tolerance: a key physiological "damage limitation" effect and an important potential opportunity for therapy. Curr Med Chem. 2006;13:2487-2502.
26. Heagy W, Nieman K, Hansen C, Cohen M, Danielson D, West MA. Lower levels of whole blood LPS-stimulated cytokine release are associated with poorer clinical outcomes in surgical ICU patients. Surg Infect (Larchmt). 2003;4:171-180.
27. Beutler B, Rietschel ET. Innate immune sensing and its roots: the story of endotoxin. Nat Rev Immunol. 2003;3:169-176.

28. Docke WD, Randow F, Syrbe U, et al. Monocyte deactivation in septic patients: restoration by IFN-gamma treatment. Nat Med. 1997;3:678-681.
29. 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. 2006;59:56-60.
30. Parrillo JE. Pathogenetic mechanisms of septic shock. N Engl J Med. 1993;328:1471-1477.
31. Randow F, Syrbe U, Meisel C, et al. Mechanism of endotoxin desensitization: involvement of interleukin 10 and transforming growth factor beta. J Exp Med. 1995;181:1887-1892.
32. Evans GF, Zuckerman SH. Glucocorticoid-dependent and -independent mechanisms involved in lipopolysaccharide tolerance. Eur J Immunol. 1991;21:1973-1979.
33. Allary J, Annane D. Glucocorticoids and sepsis. Minerva Anestesiol. 2005;71:759-768.
34. Beishuizen A, Thijs LG. Endotoxin and the hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) axis. J Endotoxin Res. 2003;9:3-24.
35. Annane D, Sebille V, Troche G, Raphael JC, Gajdos P, Bellissant E. A 3-level prognostic classification in septic shock based on cortisol levels and cortisol response to corticotropin. JAMA. 2000;283:1038-1045.
36. Marik PE. Mechanisms and clinical consequences of critical illness associated adrenal insufficiency. Curr Opin Crit Care. 2007;13:363-369.
37. Bundschuh DS, Barsig J, Hartung T, et al. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and IFN-gamma restore the systemic TNF-alpha response to endotoxin in lipopolysaccharide-desensitized mice. J Immunol. 1997;158:2862-2871.
38. Randow F, Docke WD, Bundschuh DS, Hartung T, Wendel A, Volk HD. In vitro prevention and reversal of lipopolysaccharide desensitization by IFN-gamma, IL-12, and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. J Immunol. 1997;158:2911-2918.
39. Bone RC. Why new definitions of sepsis and organ failure are needed. Am J Med. 1993;95:348-350.
40. Brun-Buisson C. The epidemiology of the systemic inflammatory response. Intensive Care Med. 2000;26 Suppl 1:S64-74.
41. Cohen J. The immunopathogenesis of sepsis. Nature. 2002;420:885-891.
42. Ulloa L, Tracey KJ. The "cytokine profile": a code for sepsis. Trends Mol Med. 2005;11:56-63.
43. Ferrara JL. Cytokine dysregulation as a mechanism of graft versus host disease. Curr Opin Immunol. 1993;5:794-799.
44. Makhija R, Kingsnorth AN. Cytokine storm in acute pancreatitis. J Hepatobiliary Pancreat Surg. 2002;9:401-410.
45. Cavaillon JM, Annane D. Compartmentalization of the inflammatory response in sepsis and SIRS. J Endotoxin Res. 2006;12:151-170.
46. Girardin E, Roux-Lombard P, Grau GE, Suter P, Gallati H, Dayer JM. Imbalance between tumour necrosis factor-alpha and soluble TNF receptor concentrations in severe meningococcaemia. The J5 Study Group. Immunology. 1992;76:20-23.
47. Marchant A, Deviere J, Byl B, De Groote D, Vincent JL, Goldman M. Interleukin-10 production during septicaemia. Lancet. 1994;343:707-708.
48. Brandtzaeg P, Osnes L, Ovstebo R, Joo GB, Westvik AB, Kierulf P. Net inflammatory capacity of human septic shock plasma evaluated by a monocyte-based target cell assay: identification of interleukin-10 as a major functional deactivator of human monocytes. J Exp Med. 1996;184:51-60.
49. Fischer E, Van Zee KJ, Marano MA, et al. Interleukin-1 receptor antagonist circulates in experimental inflammation and in human disease. Blood. 1992;79:2196-2200.
50. Marie C, Cavaillon JM, Losser MR. Elevated levels of circulating transforming growth factor-beta 1 in patients with the sepsis syndrome. Ann Intern Med. 1996;125:520-521.
51. Ayala A, Knotts JB, Ertel W, Perrin MM, Morrison MH, Chaudry IH. Role of interleukin 6 and transforming growth factor-beta in the induction of depressed splenocyte responses following sepsis. Arch Surg. 1993;128:89-94; discussion 94-85.
52. Ramer-Quinn DS, Baker RA, Sanders VM. Activated T helper 1 and T helper 2 cells differentially express the beta-2-adrenergic receptor: a mechanism for selective modulation of T helper 1 cell cytokine production. J Immunol. 1997;159:4857-4867.
53. Salicru AN, Sams CF, Marshall GD. 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. 2007;21:913-920.

54. Munford RS, Pugin J. Normal responses to injury prevent systemic inflammation and can be immunosuppressive. Am J Respir Crit Care Med. 2001;163:316-321.
55. Cavaillon JM. "Septic Plasma": an immunosuppressive milieu. Am J Respir Crit Care Med. 2002;166:1417-1418.
56. Heagy W, Hansen C, Nieman K, et al. Impaired ex vivo lipopolysaccharide-stimulated whole blood tumor necrosis factor production may identify "septic" intensive care unit patients. Shock. 2000;14:271-276; discussion 276-277.
57. Hotchkiss RS, Karl IE. The pathophysiology and treatment of sepsis. N Engl J Med. 2003;348:138-150.
58. Volk HD, Reinke P, Krausch D, et al. Monocyte deactivation--rationale for a new therapeutic strategy in sepsis. Intensive Care Med. 1996;22 Suppl 4:S474-481.
59. Bone RC. Immunologic dissonance: a continuing evolution in our understanding of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS) and the multiple organ dysfunction syndrome (MODS). Ann Intern Med. 1996;125:680-687.
60. Hotchkiss RS, Coopersmith CM, McDunn JE, Ferguson TA. The sepsis seesaw: tilting toward immunosuppression. Nat Med. 2009;15:496-497.
61. Dawson CW, Ledgerwood AM, Rosenberg JC, Lucas CE. Anergy and altered lymphocyte function in the injured patient. Am Surg. 1982;48:397-401.
62. Angele MK, Faist E. Clinical review: immunodepression in the surgical patient and increased susceptibility to infection. Crit Care. 2002;6:298-305.
63. Volk HD, Reinke P, Docke WD. Clinical aspects: from systemic inflammation to 'immunoparalysis'. Chem Immunol. 2000;74:162-177.
64. Bone RC, Grodzin CJ, Balk RA. Sepsis: a new hypothesis for pathogenesis of the disease process. Chest. 1997;112:235-243.
65. Marshall J, Sweeney D. Microbial infection and the septic response in critical surgical illness. Sepsis, not infection, determines outcome. Arch Surg. 1990;125:17-22; discussion 22-13.
66. Willatts SM, Speller DC, Winter RJ. Incidence of gram-negative bacteraemia in sepsis syndrome. Implications for immunotherapy. Anaesthesia. 1994;49:751-754.
67. Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. Crit Care Med. 2001;29:1303-1310.
68. Vincent JL, Sakr Y, Sprung CL, et al. Sepsis in European intensive care units: results of the SOAP study. Crit Care Med. 2006;34:344-353.
69. Monneret G. How to identify systemic sepsis-induced immunoparalysis. Advances in Sepsis. 2005;4:42-49.
70. Natanson C, Hoffman WD, Suffredini AF, Eichacker PQ, Danner RL. Selected treatment strategies for septic shock based on proposed mechanisms of pathogenesis. Ann Intern Med. 1994;120:771-783.
71. Opal SM, Cross AS. Clinical trials for severe sepsis. Past failures, and future hopes. Infect Dis Clin North Am. 1999;13:285-297, vii.
72. van der Poll T, Levi M, Nick JA, Abraham E. Activated protein C inhibits local coagulation after intrapulmonary delivery of endotoxin in humans. Am J Respir Crit Care Med. 2005;171:1125-1128.
73. Annane D, Bellissant E, Bollaert PE, et al. Corticosteroids in the treatment of severe sepsis and septic shock in adults: a systematic review. JAMA. 2009;301:2362-2375.
74. Arcaroli J, Fessler MB, Abraham E. Genetic polymorphisms and sepsis. Shock. 2005;24:300-312.
75. Stuber F, Klaschik S, Lehmann LE, Schewe JC, Weber S, Book M. Cytokine promoter polymorphisms in severe sepsis. Clin Infect Dis. 2005;41 Suppl 7:S416-420.
76. Villar J, Maca-Meyer N, Perez-Mendez L, Flores C. Bench-to-bedside review: understanding genetic predisposition to sepsis. Crit Care. 2004;8:180-189.
77. Hotchkiss RS, Swanson PE, Freeman BD, et al. Apoptotic cell death in patients with sepsis, shock, and multiple organ dysfunction. Crit Care Med. 1999;27:1230-1251.
78. Le Tulzo Y, Pangault C, Gacouin A, et al. Early circulating lymphocyte apoptosis in human septic shock is associated with poor outcome. Shock. 2002;18:487-494.
79. Hotchkiss RS, Tinsley KW, Swanson PE, et al. Sepsis-induced apoptosis causes progressive profound depletion of B and CD4+ T lymphocytes in humans. J Immunol. 2001;166:6952-6963.

80. Rajan G, Sleigh JW. Lymphocyte counts and the development of nosocomial sepsis. Intensive Care Med. 1997;23:1187.
81. Ding Y, Chung CS, Newton S, et al. Polymicrobial sepsis induces divergent effects on splenic and peritoneal dendritic cell function in mice. Shock. 2004;22:137-144.
82. Hotchkiss RS, Tinsley KW, Swanson PE, et al. Depletion of dendritic cells, but not macrophages, in patients with sepsis. J Immunol. 2002;168:2493-2500.
83. Benjamim CF, Lundy SK, Lukacs NW, Hogaboam CM, Kunkel SL. Reversal of long-term sepsis-induced immunosuppression by dendritic cells. Blood. 2005;105:3588-3595.
84. Flohe SB, Agrawal H, Schmitz D, Gertz M, Flohe S, Schade FU. Dendritic cells during polymicrobial sepsis rapidly mature but fail to initiate a protective Th1-type immune response. J Leukoc Biol. 2006;79:473-481.
85. Jia SH, Li Y, Parodo J, et al. Pre-B cell colony-enhancing factor inhibits neutrophil apoptosis in experimental inflammation and clinical sepsis. J Clin Invest. 2004;113:1318-1327.
86. Keel M, Ungethum U, Steckholzer U, et al. Interleukin-10 counterregulates proinflammatory cytokine-induced inhibition of neutrophil apoptosis during severe sepsis. Blood. 1997;90:3356-3363.
87. Selig C, Nothdurft W. Cytokines and progenitor cells of granulocytopoiesis in peripheral blood of patients with bacterial infections. Infect Immun. 1995;63:104-109.
88. Kaufmann I, Hoelzl A, Schliephake F, et al. Polymorphonuclear leukocyte dysfunction syndrome in patients with increasing sepsis severity. Shock. 2006;26:254-261.
89. Martins PS, Kallas EG, Neto MC, Dalboni MA, Blecher S, Salomao R. Upregulation of reactive oxygen species generation and phagocytosis, and increased apoptosis in human neutrophils during severe sepsis and septic shock. Shock. 2003;20:208-212.
90. Wenisch C, Parschalk B, Patruta S, Brustbauer R, Graninger W. Effect of polyclonal immunoglobulins on neutrophil phagocytic capacity and reactive oxygen production in patients with gram-negative septicemia. Infection. 1999;27:183-186.
91. Munoz C, Carlet J, Fitting C, Misset B, Bleriot JP, Cavaillon JM. Dysregulation of in vitro cytokine production by monocytes during sepsis. J Clin Invest. 1991;88:1747-1754.
92. Ertel W, Kremer JP, Kenney J, et al. Downregulation of proinflammatory cytokine release in whole blood from septic patients. Blood. 1995;85:1341-1347.
93. Astiz M, Saha D, Lustbader D, Lin R, Rackow E. Monocyte response to bacterial toxins, expression of cell surface receptors, and release of anti-inflammatory cytokines during sepsis. J Lab Clin Med. 1996;128:594-600.
94. Hershman MJ, Cheadle WG, Wellhausen SR, Davidson PF, Polk HC, Jr. Monocyte HLA-DR antigen expression characterizes clinical outcome in the trauma patient. Br J Surg. 1990;77:204-207.
95. Tschaikowsky K, Hedwig-Geissing M, Schiele A, Bremer F, Schywalsky M, Schuttler J. Coincidence of pro- and anti-inflammatory responses in the early phase of severe sepsis: Longitudinal study of mononuclear histocompatibility leukocyte antigen-DR expression, procalcitonin, C-reactive protein, and changes in T-cell subsets in septic and postoperative patients. Crit Care Med. 2002;30:1015-1023.
96. Caille V, Chiche JD, Nciri N, et al. Histocompatibility leukocyte antigen-D related expression is specifically altered and predicts mortality in septic shock but not in other causes of shock. Shock. 2004;22:521-526.
97. Ayala A, Ertel W, Chaudry IH. Trauma-induced suppression of antigen presentation and expression of major histocompatibility class II antigen complex in leukocytes. Shock. 1996;5:79-90.
98. Fumeaux T, Pugin J. Is the measurement of monocytes HLA-DR expression useful in patients with sepsis? Intensive Care Med. 2006;32:1106-1108.
99. van den Berk JM, Oldenburger RH, van den Berg AP, et al. Low HLA-DR expression on monocytes as a prognostic marker for bacterial sepsis after liver transplantation. Transplantation. 1997;63:1846-1848.
100. Adib-Conquy M, Adrie C, Moine P, et al. NF-kappaB expression in mononuclear cells of patients with sepsis resembles that observed in lipopolysaccharide tolerance. Am J Respir Crit Care Med. 2000;162:1877-1883.
101. Ziegler-Heitbrock HW, Wedel A, Schraut W, et al. Tolerance to lipopolysaccharide involves mobilization of nuclear factor kappa B with predominance of p50 homodimers. J Biol Chem. 1994;269:17001-17004.

102. Escoll P, del Fresno C, Garcia L, et al. Rapid up-regulation of IRAK-M expression following a second endotoxin challenge in human monocytes and in monocytes isolated from septic patients. Biochem Biophys Res Commun. 2003;311:465-472.
103. Kobayashi K, Hernandez LD, Galan JE, Janeway CA, Jr., Medzhitov R, Flavell RA. IRAK-M is a negative regulator of Toll-like receptor signaling. Cell. 2002;110:191-202.
104. Ronco C, Brendolan A, Lonnemann G, et al. A pilot study of coupled plasma filtration with adsorption in septic shock. Crit Care Med. 2002;30:1250-1255.
105. Prins JM, Kuijper EJ, Mevissen ML, Speelman P, van Deventer SJ. Release of tumor necrosis factor alpha and interleukin 6 during antibiotic killing of Escherichia coli in whole blood: influence of antibiotic class, antibiotic concentration, and presence of septic serum. Infect Immun. 1995;63:2236-2242.
106. Spinas GA, Bloesch D, Kaufmann MT, Keller U, Dayer JM. Induction of plasma inhibitors of interleukin 1 and TNF-alpha activity by endotoxin administration to normal humans. Am J Physiol. 1990;259:R993-997.
107. Chen W, Frank ME, Jin W, Wahl SM. TGF-beta released by apoptotic T cells contributes to an immunosuppressive milieu. Immunity. 2001;14:715-725.
108. Fumeaux T, Pugin J. Role of interleukin-10 in the intracellular sequestration of human leukocyte antigen-DR in monocytes during septic shock. Am J Respir Crit Care Med. 2002;166:1475-1482.
109. Heuer JG, Zhang T, Zhao J, et al. Adoptive transfer of in vitro-stimulated CD4+CD25+ regulatory T cells increases bacterial clearance and improves survival in polymicrobial sepsis. J Immunol. 2005;174:7141-7146.
110. Makarenkova VP, Bansal V, Matta BM, Perez LA, Ochoa JB. CD11b+/Gr-1+ myeloid suppressor cells cause T cell dysfunction after traumatic stress. J Immunol. 2006;176:2085-2094.
111. Asehnoune K, Fitting C, Edouard AR, et al. beta2-Adrenoceptor blockade partially restores ex vivo TNF production following hemorrhagic shock. Cytokine. 2006;34:212-218.
112. Panina-Bordignon P, Mazzeo D, Lucia PD, et al. Beta2-agonists prevent Th1 development by selective inhibition of interleukin 12. J Clin Invest. 1997;100:1513-1519.
113. Foster SL, Medzhitov R. Gene-specific control of the TLR-induced inflammatory response. Clin Immunol. 2009;130:7-15.
114. Nathan C. Points of control in inflammation. Nature. 2002;420:846-852.
115. O'Neill LA, Bowie AG. The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. Nat Rev Immunol. 2007;7:353-364.
116. Biswas SK, Bist P, Dhillon MK, et al. Role for MyD88-independent, TRIF pathway in lipid A/TLR4-induced endotoxin tolerance. J Immunol. 2007;179:4083-4092.
117. Ziegler-Heitbrock HW. Molecular mechanism in tolerance to lipopolysaccharide. J Inflamm. 1995;45:13-26.
118. Zweifach BW, Benacerraf B, Thomas L. The relationship between the vascular manifestations of shock produced by endotoxin, trauma, and hemorrhage. II. The possible role of the reticulo-endothelial system in resistance to each type of shock. J Exp Med. 1957;106:403-414.
119. Pfeiffer R. Untersuchungen uber das Choleragift. Z Hyg 1892;11:393-411.
120. Wolff A. Uber Grundgesetze der Immunitat. Zentralbl Bakteriol. 1904;37:390-397.
121. Beeson P. Development of tolerance to typhoid bacterial pyrogen and its abolition by reticulo-endothelial blockade. Proc Soc Exp Biol Med. 1946;61:248-250.
122. Berger FM. The effect of endotoxin on resistance to infection and disease. Adv Pharmacol. 1967;5:19-46.
123. Watson DW, Kim YB. Modification of Host Responses to Bacterial Endotoxins. I. Specificity of Pyrogenic Tolerance and the Role of Hypersensitivity in Pyrogenicity, Lethality, and Skin Reactivity. J Exp Med. 1963;118:425-446.
124. Freudenberg MA, Galanos C. Induction of tolerance to lipopolysaccharide (LPS)-D-galactosamine lethality by pretreatment with LPS is mediated by macrophages. Infect Immun. 1988;56:1352-1357.
125. Bishop RE. Fundamentals of endotoxin structure and function. Contrib Microbiol. 2005;12:1-27.
126. Raetz CR, Whitfield C. Lipopolysaccharide endotoxins. Annu Rev Biochem. 2002;71:635-700.
127. Raetz CR. Biochemistry of endotoxins. Annu Rev Biochem. 1990;59:129-170.
128. Fujihara M, Muroi M, Tanamoto K, Suzuki T, Azuma H, Ikeda H. Molecular mechanisms of macrophage activation and deactivation by lipopolysaccharide: roles of the receptor complex. Pharmacol Ther. 2003;100:171-194.

129. Frankenberger M, Pechumer H, Ziegler-Heitbrock HW. Interleukin-10 is upregulated in LPS tolerance. J Inflamm. 1995;45:56-63.
130. Shimauchi H, Ogawa T, Okuda K, Kusumoto Y, Okada H. Autoregulatory effect of interleukin-10 on proinflammatory cytokine production by Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide-tolerant human monocytes. Infect Immun. 1999;67:2153-2159.
131. Mathison JC, Virca GD, Wolfson E, Tobias PS, Glaser K, Ulevitch RJ. Adaptation to bacterial lipopolysaccharide controls lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor production in rabbit macrophages. J Clin Invest. 1990;85:1108-1118.
132. Foster SL, Hargreaves DC, Medzhitov R. Gene-specific control of inflammation by TLR-induced chromatin modifications. Nature. 2007;447:972-978.
133. Mages J, Dietrich H, Lang R. A genome-wide analysis of LPS tolerance in macrophages. Immunobiology. 2007;212:723-737.
134. Rayhane N FC, Cavaillon J-M. Dissociation of INFgamma from IL-12 and IL-8 during endotoxin tolerance. J Endotoxin Res. 1999;5:319-324.
135. Learn CA, Mizel SB, McCall CE. mRNA and protein stability regulate the differential expression of pro- and anti-inflammatory genes in endotoxin-tolerant THP-1 cells. J Biol Chem. 2000;275:12185-12193.
136. Schroder M, Meisel C, Buhl K, et al. Different modes of IL-10 and TGF-beta to inhibit cytokine-dependent IFN-gamma production: consequences for reversal of lipopolysaccharide desensitization. J Immunol. 2003;170:5260-5267.
137. Wolk K, Docke WD, von Baehr V, Volk HD, Sabat R. Impaired antigen presentation by human monocytes during endotoxin tolerance. Blood. 2000;96:218-223.
138. Cavaillon JM PC, Fitting C. Endotoxin tolerance is not a LPS-specific phenomenon: partial mimicry with IL-1, IL-10 and TGFb. J Endotoxin Res. 1994;1:21-29.
139. Berg DJ, Kuhn R, Rajewsky K, 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. 1995;96:2339-2347.
140. Henricson BE, Neta R, Vogel SN. An interleukin-1 receptor antagonist blocks lipopolysaccharide-induced colony-stimulating factor production and early endotoxin tolerance. Infect Immun. 1991;59:1188-1191.
141. Alves-Rosa F, Vulcano M, Beigier-Bompadre M, Fernandez G, Palermo M, Isturiz MA. Interleukin-1beta induces in vivo tolerance to lipopolysaccharide in mice. Clin Exp Immunol. 2002;128:221-228.
142. Albrecht V, Hofer TP, Foxwell B, Frankenberger M, Ziegler-Heitbrock L. Tolerance induced via TLR2 and TLR4 in human dendritic cells: role of IRAK-1. BMC Immunol. 2008;9:69.
143. Parker LC, Jones EC, Prince LR, Dower SK, Whyte MK, Sabroe I. Endotoxin tolerance induces selective alterations in neutrophil function. J Leukoc Biol. 2005;78:1301-1305.
144. Shnyra A, Brewington R, Alipio A, Amura C, Morrison DC. Reprogramming of lipopolysaccharide-primed macrophages is controlled by a counterbalanced production of IL-10 and IL-12. J Immunol. 1998;160:3729-3736.
145. Freeman HH. Passive transfer of tolerance to pyrogenicity of bacterial endotoxin. J Exp Med. 1960;111:453-463.
146. Annane D, Cavaillon JM. Corticosteroids in sepsis: from bench to bedside? Shock. 2003;20:197-207.
147. Delgado M, Pozo D, Martinez C, et al. Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide inhibit endotoxin-induced TNF-alpha production by macrophages: in vitro and in vivo studies. J Immunol. 1999;162:2358-2367.
148. Delgado M, Sun W, Leceta J, Ganea D. VIP and PACAP differentially regulate the costimulatory activity of resting and activated macrophages through the modulation of B7.1 and B7.2 expression. J Immunol. 1999;163:4213-4223.
149. Jones SB, Westfall MV, Sayeed MM. Plasma catecholamines during E. coli bacteremia in conscious rats. Am J Physiol. 1988;254:R470-477.
150. Luger TA, Kalden D, Scholzen TE, Brzoska T. alpha-melanocyte-stimulating hormone as a mediator of tolerance induction. Pathobiology. 1999;67:318-321.
151. Zuckerman SH, Evans GF, Butler LD. Endotoxin tolerance: independent regulation of interleukin-1 and tumor necrosis factor expression. Infect Immun. 1991;59:2774-2780.

152. Zuckerman SH, Qureshi N. In vivo inhibition of lipopolysaccharide-induced lethality and tumor necrosis factor synthesis by Rhodobacter sphaeroides diphosphoryl lipid A is dependent on corticosterone induction. Infect Immun. 1992;60:2581-2587.
153. Choudhry MA, Ahmad S, Ahmed Z, Sayeed MM. Prostaglandin E2 down-regulation of T cell IL-2 production is independent of IL-10 during gram-negative sepsis. Immunol Lett. 1999;67:125-130.
154. Ding XZ, Fernandez-Prada CM, Bhattacharjee AK, Hoover DL. Over-expression of hsp-70 inhibits bacterial lipopolysaccharide-induced production of cytokines in human monocyte-derived macrophages. Cytokine. 2001;16:210-219.
155. Njemini R, Lambert M, Demanet C, Mets T. Elevated serum heat-shock protein 70 levels in patients with acute infection: use of an optimized enzyme-linked immunosorbent assay. Scand J Immunol. 2003;58:664-669.
156. Dias MB, Almeida MC, Carnio EC, Branco LG. Role of nitric oxide in tolerance to lipopolysaccharide in mice. J Appl Physiol. 2005;98:1322-1327.
157. Fahmi H, Charon D, Mondange M, Chaby R. Endotoxin-induced desensitization of mouse macrophages is mediated in part by nitric oxide production. Infect Immun. 1995;63:1863-1869.
158. Fujii E, Yoshioka T, Ishida H, Irie K, Muraki T. Evaluation of iNOS-dependent and independent mechanisms of the microvascular permeability change induced by lipopolysaccharide. Br J Pharmacol. 2000;130:90-94.
159. Zingarelli B, Halushka PV, Caputi AP, Cook JA. Increased nitric oxide synthesis during the development of endotoxin tolerance. Shock. 1995;3:102-108.
160. Szabo C, Thiemermann C, Wu CC, Perretti M, Vane JR. Attenuation of the induction of nitric oxide synthase by endogenous glucocorticoids accounts for endotoxin tolerance in vivo. Proc Natl Acad Sci U S A. 1994;91:271-275.
161. Zingarelli B, Hake PW, Cook JA. Inducible nitric oxide synthase is not required in the development of endotoxin tolerance in mice. Shock. 2002;17:478-484.
162. Melo ES, Barbeiro HV, Ariga S, et al. Immune cells and oxidative stress in the endotoxin tolerance mouse model. Braz J Med Biol Res 2010;43:57-67.
163. Hirohashi N, Morrison DC. Low-dose lipopolysaccharide (LPS) pretreatment of mouse macrophages modulates LPS-dependent interleukin-6 production in vitro. Infect Immun. 1996;64:1011-1015.
164. Marigo I, Dolcetti L, Serafini P, Zanovello P, Bronte V. Tumor-induced tolerance and immune suppression by myeloid derived suppressor cells. Immunol Rev. 2008;222:162-179.
165. Gabrilovich DI, Velders MP, Sotomayor EM, Kast WM. Mechanism of immune dysfunction in cancer mediated by immature Gr-1+ myeloid cells. J Immunol. 2001;166:5398-5406.
166. De Wilde V, Van Rompaey N, Hill M, et al. Endotoxin-induced myeloid-derived suppressor cells inhibit alloimmune responses via heme oxygenase-1. Am J Transplant. 2009;9:2034-2047.
167. Gabrilovich DI, Nagaraj S. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. Nat Rev Immunol. 2009;9:162-174.
168. Linehan DC, Goedegebuure PS. CD25+ CD4+ regulatory T-cells in cancer. Immunol Res. 2005;32:155-168.
169. Scumpia PO, Delano MJ, Kelly KM, et al. Increased natural CD4+CD25+ regulatory T cells and their suppressor activity do not contribute to mortality in murine polymicrobial sepsis. J Immunol. 2006;177:7943-7949.
170. Monneret G, Debard AL, Venet F, et al. Marked elevation of human circulating CD4+CD25+ regulatory T cells in sepsis-induced immunoparalysis. Crit Care Med. 2003;31:2068-2071.
171. Wright SD, Tobias PS, Ulevitch RJ, Ramos RA. Lipopolysaccharide (LPS) binding protein opsonizes LPS-bearing particles for recognition by a novel receptor on macrophages. J Exp Med. 1989;170:1231-1241.
172. Wright SD, Ramos RA, Tobias PS, Ulevitch RJ, Mathison JC. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. Science. 1990;249:1431-1433.
173. Shimazu R, Akashi S, Ogata H, et al. MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. J Exp Med. 1999;189:1777-1782.
174. Akira S. Innate immunity to pathogens: diversity in receptors for microbial recognition. Immunol Rev. 2009;227:5-8.
175. Medzhitov R. Toll-like receptors and innate immunity. Nat Rev Immunol. 2001;1:135-145.
176. Poltorak A, He X, Smirnova I, et al. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. Science. 1998;282:2085-2088.

177. Nomura F, Akashi S, Sakao Y, et al. Cutting edge: endotoxin tolerance in mouse peritoneal macrophages correlates with down-regulation of surface toll-like receptor 4 expression. J Immunol. 2000;164:3476-3479.
178. Gao JJ, Filla MB, Fultz MJ, Vogel SN, Russell SW, Murphy WJ. Autocrine/paracrine IFN-alphabeta mediates the lipopolysaccharide-induced activation of transcription factor Stat1alpha in mouse macrophages: pivotal role of Stat1alpha in induction of the inducible nitric oxide synthase gene. J Immunol. 1998;161:4803-4810.
179. Weinstein SL, Finn AJ, Dave SH, et al. Phosphatidylinositol 3-kinase and mTOR mediate lipopolysaccharide-stimulated nitric oxide production in macrophages via interferon-beta. J Leukoc Biol. 2000;67:405-414.
180. Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, et al. Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. Science. 2003;301:640-643.
181. Biswas SK, Tergaonkar V. Myeloid differentiation factor 88-independent Toll-like receptor pathway: Sustaining inflammation or promoting tolerance? Int J Biochem Cell Biol. 2007;39:1582-1592.
182. Liew FY, Xu D, Brint EK, O'Neill LA. Negative regulation of toll-like receptor-mediated immune responses. Nat Rev Immunol. 2005;5:446-458.
183. Lopez-Collazo E, Fuentes-Prior P, Arnalich F, del Fresno C. Pathophysiology of interleukin-1 receptor-associated kinase-M: implications in refractory state. Curr Opin Infect Dis. 2006;19:237-244.
184. Nimah M, Zhao B, Denenberg AG, et al. Contribution of MKP-1 regulation of p38 to endotoxin tolerance. Shock. 2005;23:80-87.
185. Burns K, Janssens S, Brissoni B, Olivos N, Beyaert R, Tschopp J. Inhibition of interleukin 1 receptor/Toll-like receptor signaling through the alternatively spliced, short form of MyD88 is due to its failure to recruit IRAK-4. J Exp Med. 2003;197:263-268.
186. Janssens S, Burns K, Tschopp J, Beyaert R. Regulation of interleukin-1- and lipopolysaccharide-induced NF-kappaB activation by alternative splicing of MyD88. Curr Biol. 2002;12:467-471.
187. Adib-Conquy M, Adrie C, Fitting C, Gattolliat O, Beyaert R, Cavaillon JM. Up-regulation of MyD88s and SIGIRR, molecules inhibiting Toll-like receptor signaling, in monocytes from septic patients. Crit Care Med. 2006;34:2377-2385.
188. Rauh MJ, Sly LM, Kalesnikoff J, et al. The role of SHIP1 in macrophage programming and activation. Biochem Soc Trans. 2004;32:785-788.
189. Rauh MJ, Ho V, Pereira C, et al. SHIP represses the generation of alternatively activated macrophages. Immunity. 2005;23:361-374.
190. Zhao Q, Wang X, Nelin LD, et al. MAP kinase phosphatase 1 controls innate immune responses and suppresses endotoxic shock. J Exp Med. 2006;203:131-140.
191. van 't Veer C, van den Pangaart PS, van Zoelen MA, et al. Induction of IRAK-M is associated with lipopolysaccharide tolerance in a human endotoxemia model. J Immunol. 2007;179:7110-7120.
192. Nakagawa R, Naka T, Tsutsui H, et al. SOCS-1 participates in negative regulation of LPS responses. Immunity. 2002;17:677-687.
193. Hayden MS, Ghosh S. Shared principles in NF-kappaB signaling. Cell. 2008;132:344-362.
194. Blackwell TS, Blackwell TR, Christman JW. Induction of endotoxin tolerance depletes nuclear factor-kappaB and suppresses its activation in rat alveolar macrophages. J Leukoc Biol. 1997;62:885-891.
195. Dobrovolskaia MA, Medvedev AE, Thomas KE, et al. Induction of in vitro reprogramming by Toll-like receptor (TLR)2 and TLR4 agonists in murine macrophages: effects of TLR "homotolerance" versus "heterotolerance" on NF-kappa B signaling pathway components. J Immunol. 2003;170:508-519.
196. Lawrence T, Gilroy DW, Colville-Nash PR, Willoughby DA. Possible new role for NF-kappaB in the resolution of inflammation. Nat Med. 2001;7:1291-1297.
197. Sato S, Nomura F, Kawai T, et al. Synergy and cross-tolerance between toll-like receptor (TLR) 2-and TLR4-mediated signaling pathways. J Immunol. 2000;165:7096-7101.
198. Buckley JM, Wang JH, Redmond HP. Cellular reprogramming by gram-positive bacterial components: a review. J Leukoc Biol. 2006;80:731-741.
199. Fraker DL, Stovroff MC, Merino MJ, Norton JA. Tolerance to tumor necrosis factor in rats and the relationship to endotoxin tolerance and toxicity. J Exp Med. 1988;168:95-105.
200. Klir JJ, McClellan JL, Kozak W, Szelenyi Z, Wong GH, Kluger MJ. Systemic but not central administration of tumor necrosis factor-alpha attenuates LPS-induced fever in rats. Am J Physiol. 1995;268:R480-486.

201. Ogle CK, Guo X, Chance WT, Ogle JD. Induction of endotoxin tolerance in rat bone marrow cells by in vivo infusion of tumor necrosis factor. Crit Care Med. 1997;25:827-833.
202. Haas JG, Meyer N, Riethmuller G, Ziegler-Heitbrock HW. Inhibition of lipopolysaccharide-induced in vitro desensitization by interferon-gamma. Eur J Immunol. 1990;20:1181-1184.
203. Adib-Conquy M, Cavaillon JM. Gamma interferon and granulocyte/monocyte colony-stimulating factor prevent endotoxin tolerance in human monocytes by promoting interleukin-1 receptor-associated kinase expression and its association to MyD88 and not by modulating TLR4 expression. J Biol Chem. 2002;277:27927-27934.
204. Bosisio D, Polentarutti N, Sironi M, et al. Stimulation of toll-like receptor 4 expression in human mononuclear phagocytes by interferon-gamma: a molecular basis for priming and synergism with bacterial lipopolysaccharide. Blood. 2002;99:3427-3431.
205. Kox WJ, Bone RC, Krausch D, et al. Interferon gamma-1b in the treatment of compensatory anti-inflammatory response syndrome. A new approach: proof of principle. Arch Intern Med. 1997;157:389-393.
206. Youngner JS, Stinebring WR. Interferon appearance stimulated by endotoxin, bacteria, or viruses in mice pre-treated with Escherichia coli endotoxin or infected with Mycobacterium tuberculosis. Nature. 1965;208:456-458.
207. Severn A, Xu D, Doyle J, et al. Pre-exposure of murine macrophages to lipopolysaccharide inhibits the induction of nitric oxide synthase and reduces leishmanicidal activity. Eur J Immunol. 1993;23:1711-1714.
208. Mason CM, Dobard E, Summer WR, Nelson S. Intraportal lipopolysaccharide suppresses pulmonary antibacterial defense mechanisms. J Infect Dis. 1997;176:1293-1302.
209. Rayhane N, Fitting C, Lortholary O, Dromer F, Cavaillon JM. Administration of endotoxin associated with lipopolysaccharide tolerance protects mice against fungal infection. Infect Immun. 2000;68:3748-3753.
210. Lehner MD, Ittner J, Bundschuh DS, van Rooijen N, Wendel A, Hartung T. Improved innate immunity of endotoxin-tolerant mice increases resistance to Salmonella enterica serovar typhimurium infection despite attenuated cytokine response. Infect Immun. 2001;69:463-471.
211. Monneret G, Venet F, Pachot A, Lepape A. Monitoring immune dysfunctions in the septic patient: a new skin for the old ceremony. Mol Med. 2008;14:64-78.
212. Pachot A, Lepape A, Vey S, Bienvenu J, Mougin B, Monneret G. Systemic transcriptional analysis in survivor and non-survivor septic shock patients: a preliminary study. Immunol Lett. 2006;106:63-71.
213. Buras JA, Holzmann B, Sitkovsky M. Animal models of sepsis: setting the stage. Nat Rev Drug Discov. 2005;4:854-865.
214. Cavaillon JM, Adrie C, Fitting C, Adib-Conquy M. Reprogramming of circulatory cells in sepsis and SIRS. J Endotoxin Res. 2005;11:311-320.
215. Draisma A, Pickkers P, Bouw MP, van der Hoeven JG. Development of endotoxin tolerance in humans in vivo. Crit Care Med. 2009;37:1261-1267.
216. Monneret G, Finck ME, Venet F, et al. The anti-inflammatory response dominates after septic shock: association of low monocyte HLA-DR expression and high interleukin-10 concentration. Immunol Lett. 2004;95:193-198.
217. Munoz C, Misset B, Fitting C, Bleriot JP, Carlet J, Cavaillon JM. Dissociation between plasma and monocyte-associated cytokines during sepsis. Eur J Immunol. 1991;21:2177-2184.
218. Manjuck J, Saha DC, Astiz M, Eales LJ, Rackow EC. Decreased response to recall antigens is associated with depressed costimulatory receptor expression in septic critically ill patients. J Lab Clin Med. 2000;135:153-160.
219. Nakayama K, Okugawa S, Yanagimoto S, et al. Involvement of IRAK-M in peptidoglycan-induced tolerance in macrophages. J Biol Chem. 2004;279:6629-6634.
220. Deng JC, Cheng G, Newstead MW, et al. Sepsis-induced suppression of lung innate immunity is mediated by IRAK-M. J Clin Invest. 2006;116:2532-2542.
221. Biswas SK, Gangi L, Paul S, et al. A distinct and unique transcriptional program expressed by tumor-associated macrophages (defective NF-kappaB and enhanced IRF-3/STAT1 activation). Blood. 2006;107:2112-2122.
222. del Fresno C, Garcia-Rio F, Gomez-Pina V, et al. Potent phagocytic activity with impaired antigen presentation identifying lipopolysaccharide-tolerant human monocytes: demonstration in isolated monocytes from cystic fibrosis patients. J Immunol. 2009;182:6494-6507.

223. del Fresno C, Gomez-Pina V, Lores V, et al. Monocytes from cystic fibrosis patients are locked in an LPS tolerance state: down-regulation of TREM-1 as putative underlying mechanism. PLoS One. 2008;3:e2667.
224. del Fresno C, Soler-Rangel L, Soares-Schanoski A, et al. Inflammatory responses associated with acute coronary syndrome up-regulate IRAK-M and induce endotoxin tolerance in circulating monocytes. J Endotoxin Res. 2007;13:39-52.
225. Saccani A, Schioppa T, Porta C, et al. p50 nuclear factor-kappaB overexpression in tumor-associated macrophages inhibits M1 inflammatory responses and antitumor resistance. Cancer Res. 2006;66:11432-11440.
226. Adcock IM, Lane SJ. Corticosteroid-insensitive asthma: molecular mechanisms. J Endocrinol. 2003;178:347-355.
227. Almawi WY, Melemedjian OK. Molecular mechanisms of glucocorticoid antiproliferative effects: antagonism of transcription factor activity by glucocorticoid receptor. J Leukoc Biol. 2002;71:9-15.
228. Buttgereit F, Scheffold A. Rapid glucocorticoid effects on immune cells. Steroids. 2002;67:529-534.
229. Pratt WB, Dittmar KD. Studies with Purified Chaperones Advance the Understanding of the Mechanism of Glucocorticoid Receptor-hsp90 Heterocomplex Assembly. Trends Endocrinol Metab. 1998;9:244-252.
230. Spies CM, Schaumann DH, Berki T, et al. Membrane glucocorticoid receptors are down regulated by glucocorticoids in patients with systemic lupus erythematosus and use a caveolin-1-independent expression pathway. Ann Rheum Dis. 2006;65:1139-1146.
231. Wikstrom AC. Glucocorticoid action and novel mechanisms of steroid resistance: role of glucocorticoid receptor-interacting proteins for glucocorticoid responsiveness. J Endocrinol. 2003;178:331-337.
232. Bamberger CM, Bamberger AM, de Castro M, Chrousos GP. Glucocorticoid receptor beta, a potential endogenous inhibitor of glucocorticoid action in humans. J Clin Invest. 1995;95:2435-2441.
233. Yudt MR, Cidlowski JA. The glucocorticoid receptor: coding a diversity of proteins and responses through a single gene. Mol Endocrinol. 2002;16:1719-1726.
234. Geserick C, Meyer HA, Haendler B. The role of DNA response elements as allosteric modulators of steroid receptor function. Mol Cell Endocrinol. 2005;236:1-7.
235. Barnes PJ. Anti-inflammatory actions of glucocorticoids: molecular mechanisms. Clin Sci (Lond). 1998;94:557-572.
236. Kassel O, Sancono A, Kratzschmar J, Kreft B, Stassen M, Cato AC. Glucocorticoids inhibit MAP kinase via increased expression and decreased degradation of MKP-1. EMBO J. 2001;20:7108-7116.
237. Lasa M, Abraham SM, Boucheron C, Saklatvala J, Clark AR. Dexamethasone causes sustained expression of mitogen-activated protein kinase (MAPK) phosphatase 1 and phosphatase-mediated inhibition of MAPK p38. Mol Cell Biol. 2002;22:7802-7811.
238. Auphan N, DiDonato JA, Rosette C, Helmberg A, Karin M. Immunosuppression by glucocorticoids: inhibition of NF-kappa B activity through induction of I kappa B synthesis. Science. 1995;270:286-290.
239. Scheinman RI, Gualberto A, Jewell CM, Cidlowski JA, Baldwin AS, Jr. Characterization of mechanisms involved in transrepression of NF-kappa B by activated glucocorticoid receptors. Mol Cell Biol. 1995;15:943-953.
240. Beato M, Chalepakis G, Schauer M, Slater EP. DNA regulatory elements for steroid hormones. J Steroid Biochem. 1989;32:737-747.
241. Falkenstein E, Tillmann HC, Christ M, Feuring M, Wehling M. Multiple actions of steroid hormones--a focus on rapid, nongenomic effects. Pharmacol Rev. 2000;52:513-556.
242. Ogawa S, Lozach J, Benner C, et al. Molecular determinants of crosstalk between nuclear receptors and toll-like receptors. Cell. 2005;122:707-721.
243. Reily MM, Pantoja C, Hu X, Chinenov Y, Rogatsky I. The GRIP1:IRF3 interaction as a target for glucocorticoid receptor-mediated immunosuppression. EMBO J. 2006;25:108-117.
244. Croxtall JD, Choudhury Q, Flower RJ. Glucocorticoids act within minutes to inhibit recruitment of signalling factors to activated EGF receptors through a receptor-dependent, transcription-independent mechanism. Br J Pharmacol. 2000;130:289-298.
245. Hafezi-Moghadam A, Simoncini T, Yang Z, et al. Acute cardiovascular protective effects of corticosteroids are mediated by non-transcriptional activation of endothelial nitric oxide synthase. Nat Med. 2002;8:473-479.

246. Buttgereit F, Straub RH, Wehling M, Burmester GR. Glucocorticoids in the treatment of rheumatic diseases: an update on the mechanisms of action. Arthritis Rheum. 2004;50:3408-3417.
247. Gametchu B, Chen F, Sackey F, Powell C, Watson CS. Plasma membrane-resident glucocorticoid receptors in rodent lymphoma and human leukemia models. Steroids. 1999;64:107-119.
248. Bartholome B, Spies CM, Gaber T, et al. Membrane glucocorticoid receptors (mGCR) are expressed in normal human peripheral blood mononuclear cells and up-regulated after in vitro stimulation and in patients with rheumatoid arthritis. FASEB J. 2004;18:70-80.
249. Stahn C, Lowenberg M, Hommes DW, Buttgereit F. Molecular mechanisms of glucocorticoid action and selective glucocorticoid receptor agonists. Mol Cell Endocrinol. 2007;275:71-78.
250. Lowenberg M, Tuynman J, Bilderbeek J, et al. Rapid immunosuppressive effects of glucocorticoids mediated through Lck and Fyn. Blood. 2005;106:1703-1710.
251. Palacios EH, Weiss A. Function of the Src-family kinases, Lck and Fyn, in T-cell development and activation. Oncogene. 2004;23:7990-8000.
252. Besedovsky H, Sorkin E, Keller M, Muller J. Changes in blood hormone levels during the immune response. Proc Soc Exp Biol Med. 1975;150:466-470.
253. Chinenov Y, Rogatsky I. Glucocorticoids and the innate immune system: crosstalk with the toll-like receptor signaling network. Mol Cell Endocrinol. 2007;275:30-42.
254. Di Rosa M, Radomski M, Carnuccio R, Moncada S. Glucocorticoids inhibit the induction of nitric oxide synthase in macrophages. Biochem Biophys Res Commun. 1990;172:1246-1252.
255. McCall TB, Palmer RM, Moncada S. Induction of nitric oxide synthase in rat peritoneal neutrophils and its inhibition by dexamethasone. Eur J Immunol. 1991;21:2523-2527.
256. Goulding NJ, Guyre PM. Glucocorticoids, lipocortins and the immune response. Curr Opin Immunol. 1993;5:108-113.
257. Almawi WY, Saouda MS, Stevens AC, Lipman ML, Barth CM, Strom TB. Partial mediation of glucocorticoid antiproliferative effects by lipocortins. J Immunol. 1996;157:5231-5239.
258. Perretti M, Flower RJ. Modulation of IL-1-induced neutrophil migration by dexamethasone and lipocortin 1. J Immunol. 1993;150:992-999.
259. Furst R, Schroeder T, Eilken HM, et al. MAPK phosphatase-1 represents a novel anti-inflammatory target of glucocorticoids in the human endothelium. FASEB J. 2007;21:74-80.
260. Abraham E. Why immunomodulatory therapies have not worked in sepsis. Intensive Care Med. 1999;25:556-566.
261. Chi H, Barry SP, Roth RJ, et al. Dynamic regulation of pro- and anti-inflammatory cytokines by MAPK phosphatase 1 (MKP-1) in innate immune responses. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006;103:2274-2279.
262. Zhu Z, Zhao B, Wang X, et al. Differentially expressed genes in hypertensive rats developing cerebral ischemia. Life Sci. 2004;74:1899-1909.
263. Roger T, Chanson AL, Knaup-Reymond M, Calandra T. Macrophage migration inhibitory factor promotes innate immune responses by suppressing glucocorticoid-induced expression of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1. Eur J Immunol. 2005;35:3405-3413.
264. Yoshida T, Ogata H, Kamio M, et al. SOCS1 is a suppressor of liver fibrosis and hepatitis-induced carcinogenesis. J Exp Med. 2004;199:1701-1707.
265. Distelhorst CW. Recent insights into the mechanism of glucocorticosteroid-induced apoptosis. Cell Death Differ. 2002;9:6-19.
266. Ayroldi E, Migliorati G, Bruscoli S, et al. Modulation of T-cell activation by the glucocorticoid-induced leucine zipper factor via inhibition of nuclear factor kappaB. Blood. 2001;98:743-753.
267. Eddleston J, Herschbach J, Wagelie-Steffen AL, Christiansen SC, Zuraw BL. The anti-inflammatory effect of glucocorticoids is mediated by glucocorticoid-induced leucine zipper in epithelial cells. J Allergy Clin Immunol. 2007;119:115-122.
268. Delfino DV, Agostini M, Spinicelli S, Vito P, Riccardi C. Decrease of Bcl-xL and augmentation of thymocyte apoptosis in GILZ overexpressing transgenic mice. Blood. 2004;104:4134-4141.
269. Asadullah K, Woiciechowsky C, Docke WD, et al. Very low monocytic HLA-DR expression indicates high risk of infection--immunomonitoring for patients after neurosurgery and patients during high dose steroid therapy. Eur J Emerg Med. 1995;2:184-190.
270. Le Tulzo Y, Pangault C, Amiot L, et al. Monocyte human leukocyte antigen-DR transcriptional downregulation by cortisol during septic shock. Am J Respir Crit Care Med. 2004;169:1144-1151.

271. Schwiebert LM, Schleimer RP, Radka SF, Ono SJ. Modulation of MHC class II expression in human cells by dexamethasone. Cell Immunol. 1995;165:12-19.
272. Nockher WA, Scherberich JE. Expression and release of the monocyte lipopolysaccharide receptor antigen CD14 are suppressed by glucocorticoids in vivo and in vitro. J Immunol. 1997;158:1345-1352.
273. Cronstein BN, Kimmel SC, Levin RI, Martiniuk F, Weissmann G. A mechanism for the antiinflammatory effects of corticosteroids: the glucocorticoid receptor regulates leukocyte adhesion to endothelial cells and expression of endothelial-leukocyte adhesion molecule 1 and intercellular adhesion molecule 1. Proc Natl Acad Sci U S A. 1992;89:9991-9995.
274. Homma T, Kato A, Hashimoto N, et al. Corticosteroid and cytokines synergistically enhance toll-like receptor 2 expression in respiratory epithelial cells. Am J Respir Cell Mol Biol. 2004;31:463-469.
275. Rozkova D, Horvath R, Bartunkova J, Spisek R. Glucocorticoids severely impair differentiation and antigen presenting function of dendritic cells despite upregulation of Toll-like receptors. Clin Immunol. 2006;120:260-271.
276. Shuto T, Imasato A, Jono H, et al. Glucocorticoids synergistically enhance nontypeable Haemophilus influenzae-induced Toll-like receptor 2 expression via a negative cross-talk with p38 MAP kinase. J Biol Chem. 2002;277:17263-17270.
277. Bornstein SR, Schumann RR, Rettori V, McCann SM, Zacharowski K. Toll-like receptor 2 and Toll-like receptor 4 expression in human adrenals. Horm Metab Res. 2004;36:470-473.
278. Vakharia K, Hinson JP. Lipopolysaccharide directly stimulates cortisol secretion by human adrenal cells by a cyclooxygenase-dependent mechanism. Endocrinology. 2005;146:1398-1402.
279. Besedovsky HO, del Rey A. Feed-back interactions between immunological cells and the hypothalamus-pituitary-adrenal axis. Neth J Med. 1991;39:274-280.
280. Christ-Crain M, Stolz D, Jutla S, et al. Free and total cortisol levels as predictors of severity and outcome in community-acquired pneumonia. Am J Respir Crit Care Med. 2007;176:913-920.
281. Johnson KL, Rn CR. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis in critical illness. AACN Clin Issues. 2006;17:39-49.
282. Mesotten D, Vanhorebeek I, Van den Berghe G. The altered adrenal axis and treatment with glucocorticoids during critical illness. Nat Clin Pract Endocrinol Metab. 2008;4:496-505.
283. Annane D, Maxime V, Ibrahim F, Alvarez JC, Abe E, Boudou P. Diagnosis of adrenal insufficiency in severe sepsis and septic shock. Am J Respir Crit Care Med. 2006;174:1319-1326.
284. Soni A, Pepper GM, Wyrwinski PM, et al. Adrenal insufficiency occurring during septic shock: incidence, outcome, and relationship to peripheral cytokine levels. Am J Med. 1995;98:266-271.
285. Japiassu AM, Salluh JI, Bozza PT, Bozza FA, Castro-Faria-Neto HC. Revisiting steroid treatment for septic shock: molecular actions and clinical effects--a review. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2009;104:531-548.
286. Minneci PC, Deans KJ, Banks SM, Eichacker PQ, Natanson C. Meta-analysis: the effect of steroids on survival and shock during sepsis depends on the dose. Ann Intern Med. 2004;141:47-56.
287. National Institutes of Health. Guide for the care and use of laboratory animals. NIH Publication no. 85-23. Bethesda, MD: National Institutes of Health; 1985.
288. Shiau MY, Chiou HL, Lee YL, Kuo TM, Chang YH. Establishment of a consistent L929 bioassay system for TNF-alpha quantitation to evaluate the effect of lipopolysaccharide, phytomitogens and cytodifferentiation agents on cytotoxicity of TNF-alpha secreted by adherent human mononuclear cells. Mediators Inflamm. 2001;10:199-208.
289. Chiarella P, Vulcano M, Bruzzo J, et al. Anti-inflammatory pretreatment enables an efficient dendritic cell-based immunotherapy against established tumors. Cancer Immunol Immunother. 2008;57:701-718.
290. Baykal A, Kaynaroglu V, Hascelik G, Sayek I, Sanac Y. Epinephrine and endotoxin tolerance differentially modulate serum cytokine levels to high-dose lipopolysaccharide challenge in a murine model. Surgery. 1999;125:403-410.
291. Medvedev AE, Kopydlowski KM, Vogel SN. Inhibition of lipopolysaccharide-induced signal transduction in endotoxin-tolerized mouse macrophages: dysregulation of cytokine, chemokine, and toll-like receptor 2 and 4 gene expression. J Immunol. 2000;164:5564-5574.
292. Elenkov IJ. Glucocorticoids and the Th1/Th2 balance. Ann N Y Acad Sci. 2004;1024:138-146.
293. Wang JH, Doyle M, Manning BJ, et al. Cutting edge: bacterial lipoprotein induces endotoxin-independent tolerance to septic shock. J Immunol. 2003;170:14-18.
294. Varga G, Ehrchen J, Tsianakas A, et al. Glucocorticoids induce an activated, anti-inflammatory monocyte subset in mice that resembles myeloid-derived suppressor cells. J Leukoc Biol. 2008;84:644-650.

295. Chen X, Murakami T, Oppenheim JJ, Howard OM. Differential response of murine CD4+CD25+ and CD4+CD25- T cells to dexamethasone-induced cell death. Eur J Immunol. 2004;34:859-869.
296. Chang CP, Wang SW, Huang ZL, et al. Non-genomic rapid inhibition of Na+/H+-exchange 1 and apoptotic immunosuppression in human T cells by glucocorticoids. J Cell Physiol; 2010;223:679-686.
297. Ma J, Xie Y, Shi Y, Qin W, Zhao B, Jin Y. Glucocorticoid-induced apoptosis requires FOXO3A activity. Biochem Biophys Res Commun. 2008;377:894-898.
298. Ghiringhelli F, Larmonier N, Schmitt E, et al. CD4+CD25+ regulatory T cells suppress tumor immunity but are sensitive to cyclophosphamide which allows immunotherapy of established tumors to be curative. Eur J Immunol. 2004;34:336-344.
299. Suzuki E, Sun J, Kapoor V, Jassar AS, Albelda SM. Gemcitabine has significant immunomodulatory activity in murine tumor models independent of its cytotoxic effects. Cancer Biol Ther. 2007;6:880-885.
300. Morrison DC, Silverstein R, Luchi M, Shnyra A. Structure-function relationships of bacterial endotoxins. Contribution to microbial sepsis. Infect Dis Clin North Am. 1999;13:313-340.
301. Pachot A, Cazalis MA, Venet F, et al. Decreased expression of the fractalkine receptor CX3CR1 on circulating monocytes as new feature of sepsis-induced immunosuppression. J Immunol. 2008;180:6421-6429.
302. Aninat C, Seguin P, Descheemaeker PN, Morel F, Malledant Y, Guillouzo A. Catecholamines induce an inflammatory response in human hepatocytes. Crit Care Med. 2008;36:848-854.
303. Bergmann M, Gornikiewicz A, Sautner T, et al. Attenuation of catecholamine-induced immunosuppression in whole blood from patients with sepsis. Shock. 1999;12:421-427.
304. Gautier EL, Huby T, Saint-Charles F, Ouzilleau B, Chapman MJ, Lesnik P. Enhanced dendritic cell survival attenuates lipopolysaccharide-induced immunosuppression and increases resistance to lethal endotoxic shock. J Immunol. 2008;180:6941-6946.
305. Bjorkbacka H, Fitzgerald KA, Huet F, et al. The induction of macrophage gene expression by LPS predominantly utilizes Myd88-independent signaling cascades. Physiol Genomics. 2004;19:319-330.
306. Wilckens T, De Rijk R. Glucocorticoids and immune function: unknown dimensions and new frontiers. Immunol Today. 1997;18:418-424.
307. Clark AR. Anti-inflammatory functions of glucocorticoid-induced genes. Mol Cell Endocrinol. 2007;275:79-97.
308. Franchimont D, Martens H, Hagelstein MT, et al. Tumor necrosis factor alpha decreases, and interleukin-10 increases, the sensitivity of human monocytes to dexamethasone: potential regulation of the glucocorticoid receptor. J Clin Endocrinol Metab. 1999;84:2834-2839.
309. Koldzic-Zivanovic N, Tu H, Juelich TL, et al. Regulation of adrenal glucocorticoid synthesis by interleukin-10: a preponderance of IL-10 receptor in the adrenal zona fasciculata. Brain Behav Immun. 2006;20:460-468.
310. Meisel C, Schefold JC, Pschowski R, et al. GM-CSF to Reverse Sepsis-associated Immunosuppression: A Double-blind Randomized Placebo-controlled Multicenter Trial. Am J Respir Crit Care Med. 2009.
311. Riedemann NC, Guo RF, Ward PA. Novel strategies for the treatment of sepsis. Nat Med. 2003;9:517-524.
312. Barrat FJ, Cua DJ, Boonstra A, et al. In vitro generation of interleukin 10-producing regulatory CD4(+) T cells is induced by immunosuppressive drugs and inhibited by T helper type 1 (Th1)- and Th2-inducing cytokines. J Exp Med. 2002;195:603-616.
313. Artym J, Zimecki M, Kruzel M. Normalization of peripheral blood cell composition by lactoferrin in cyclophosphamide-treated mice. Med Sci Monit. 2004;10:BR84-89.
314. Nowak AK, Robinson BW, Lake RA. Gemcitabine exerts a selective effect on the humoral immune response: implications for combination chemo-immunotherapy. Cancer Res. 2002;62:2353-2358.
315. Sabbele NR, Van Oudenaren A, Benner R. The effect of cyclophosphamide on B cells and 'background' immunoglobulin-secreting cells in mice. Immunopharmacology. 1988;15:21-30.
316. Chaudhuri D, Suriano R, Mittelman A, Tiwari RK. Targeting the immune system in cancer. Curr Pharm Biotechnol. 2009;10:166-184.
317. Liu WM, Fowler DW, Smith P, Dalgleish AG. Pre-treatment with chemotherapy can enhance the antigenicity and immunogenicity of tumours by promoting adaptive immune responses. Br J Cancer, 2010;102:115-123.

318. Annane D, Bellissant E, Bollaert PE, Briegel J, Keh D, Kupfer Y. Corticosteroids for severe sepsis and septic shock: a systematic review and meta-analysis. BMJ. 2004;329:480.
319. Welty-Wolf KE, Carraway MS, Huang YC, Simonson SG, Kantrow SP, Piantadosi CA. Bacterial priming increases lung injury in gram-negative sepsis. Am J Respir Crit Care Med. 1998;158:610-619.
320. Murphey ED, Fang G, Varma TK, Sherwood ER. Improved bacterial clearance and decreased mortality can be induced by LPS tolerance and is not dependent upon IFN-gamma. Shock. 2007;27:289-295.
321. Wheeler DS, Lahni PM, Denenberg AG, et al. Induction of endotoxin tolerance enhances bacterial clearance and survival in murine polymicrobial sepsis. Shock. 2008;30:267-273.
322. Schmidt S, Rainer J, Ploner C, Presul E, Riml S, Kofler R. Glucocorticoid-induced apoptosis and glucocorticoid resistance: molecular mechanisms and clinical relevance. Cell Death Differ. 2004;11 Suppl 1:S45-55.
323. Murray SE, Rosenzweig HL, Johnson M, Huising MO, Sawicki K, Stenzel-Poore MP. Overproduction of corticotropin-releasing hormone blocks germinal center formation: role of corticosterone and impaired follicular dendritic cell networks. J Neuroimmunol. 2004;156:31-41.