UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Química Biológica

Mediadores asociados a la inmunosupresión inducida por endotoxinas bacterianas y procesos sépticos. Estrategias que permitan la modulación del *status* inmunológico

Tesis presentada para optar el título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área Química Biológica

Lic. María Florencia Todero

Directora de Tesis: Dra. Bárbara Rearte
Consejera de Estudios: Dra. Andrea Barquero

Lugar de trabajo: Academia Nacional de Medicina-Instituto de Medicina Experimental (ANM-IMEX-CONICET)

Buenos Aires, 25 de septiembre del 2025

Ana y Raúl

Índice

Resumen 5

Abstract 7

Abreviaturas 9

Introducción 11

1. Etimología de la Sepsis 12

2. Fisiopatología de la sepsis 14

2.1 Respuesta inmune temprana durante la sepsis 17

2.2 Respuesta inmune tardía durante la sepsis 23

2.2.1 Tolerancia ala endotoxina 24

2.2.2 Inmunosupresión (IS) 27

2.2.1 a) Glucocorticoides 31

2.2.1 a) I Mecanismo de acción de los GC 33

2.2.1 a) II Rol de los GC en contextos patológicos 35

2.2.1 b) Interleuquina-10 37

2.2.1 b) I Mecanismo de acción de La IL-10 38

2.2.1 b) II Rol de la IL-10 en contextos patológicos 41

Hipótesis y Objetivos 45

1. Hipótesis 48

2. Objetivo de la investigación 49

2.1 Objetivos específicos 49

Materiales y métodos 51

1. Reactivos 52

2. Animales 54

2.1 Modelo de shock endotóxico 55

2.2 Modelo de inmunosupresión inducido por LPS 56

2.3 Modelo de infección con *Staphylococcus aureus* en un estadio de inmunosupresión inducido por LPS 57

3. Obtención de suspensiones celulares 59

3.1. Inmunomarcación de moléculas de la superficie celular 61

4. Cultivo celular 62

4.1 Ensayo de proliferación: Funcionalidad de Linfocitos 62

4.2 Ensayo de proliferación en cocultivo: Funcionalidad de las células mieloides 63

5. Capacidad de *clearance* 63

6. Histopatología 64

7. Recuento de leucocitos 66

8. Determinaciones en plasma 66

9. Análisis estadísticos 67

Resultados 69

1. Modelo de Shock endotóxico 70

1.1 Participación de los GC en un estado de shock endotóxico en ausencia de IL-10 79

2. Modelo de tolerancia/IS inducida por LPS 83

2.2 Participación de los GC en un estado de tolerancia/IS inducido por LPS en ausencia de IL-10 87

2.3 Expansión de células mieloides en un estado de tolerancia/IS inducido por LPS en ausencia de IL-10 91

2.3.1 Rol de las células mieloides expandidas en el estado de tolerancia/IS inducido por LPS en ausencia de IL-10 96

2.3.2 Capacidad de eliminación bacteriana tras una infección con *S. aureus* en un estado de tolerancia/IS inducido por LPS en ausencia de IL- 10 98

Discusión 101

Estadios tempranos de la sepsis 103

Estadios tardíos de la sepsis 109

Conclusión 117

Bibliografía 118

La sepsis es una de las principales causas de muerte en UCI, actualmente definida como una disfunción orgánica potencialmente mortal causada por una respuesta desregulada del hospedador a la infección. En esta respuesta disfuncional ocurren en simultáneo respuestas hiperinflamatorias y antiinflamatorias/inmunosupresoras que varían en el tiempo. El cuadro clínico del paciente en etapas tempranas se caracteriza por el predominio de una respuesta hiperinflamatoria la cual puede conducir al desarrollo de un shock séptico, aumentando sustancialmente la mortalidad. Mientras que en etapas tardías los pacientes progresan hacia un estado de inmunosupresión (IS), en donde finalmente sucumben por la imposibilidad de controlar la infección primaria o por la adquisición de infecciones secundarias.

Entre los agentes que podrían estar involucrados en el fenómeno de IS se encuentran las citoquinas antiinflamatorias como la IL-10 así también hormonas esteroideas como los glucocorticoides (GC). Estudios recientes han sugerido que la acumulación de células mieloides supresoras (MDSC) en diferentes órganos, podría ser un componente importante de dicho fenómeno. Además, entre las moléculas que regulan la acumulación y funcionalidad de las MDSC, se ha descripto la participación tanto de la IL-10 como de los GC.

Trabajos previos de nuestro grupo han demostrado la participación sustancial de los GC en la depresión de la respuesta inmune humoral y celular en un modelo de tolerancia/IS inducido por LPS. En este marco referencial el objetivo general de este trabajo fue extender los estudios a otros mediadores que han sido involucrados como factores centrales para la instalación de la depresión inmune como es el caso de la IL-10. Para ello, se emplearon ratones *knock- out* de IL-10 (KO) para el desarrollo de los modelos experimentales.

Nuestros resultados demostraron que la IL-10 cumple un papel crítico en la regulación de la respuesta inflamatoria temprana inducida por endotoxinas. Así, los ratones KO mostraron una sensibilidad exacerbada al LPS, reflejada en una mayor letalidad, niveles elevados de citoquinas proinflamatorias como TNF-α y mayor daño tisular especialmente en hígado. A pesar de observarse un aumento en los niveles de GC y TGF-β, estos no lograron contrarrestar

completamente la hiperinflamación. Asimismo, el tratamiento con dexametasona, un GC sintético, mostró un efecto protector limitado, lo que resalta el papel esencial de la IL-10 en la acción antiinflamatoria/protectora de los GC durante la endotoxemia, sugiriendo una posible interrelación entre ambos mediadores.

En cuanto al fenómeno de tolerancia/IS, aunque se logró inducir tolerancia en ausencia de IL-10, esta fue poco robusta y limitada a desafíos de baja intensidad. Los rasgos característicos de la IS, como la reducción de la respuesta humoral y celular, linfopenia, neutrofilia y disminución de la capacidad de *clearance*, se acompañaron de una expansión de células mieloides a diversos compartimentos, que podría estar vinculado a respuestas inmunosupresoras; sin embargo, esto requiere estudios adicionales. Por otra parte, los ratones KO presentaron niveles elevados de GC que contribuyeron al mantenimiento y, en parte, al establecimiento de la tolerancia/IS. Estos hallazgos sugieren que, en ausencia de IL-10, los GC endógenos podrían desempeñar un papel clave en ambas fases del fenómeno.

En conclusión, este trabajo demuestra que la IL-10 y los GC actúan de manera bidireccional, modulando tanto la fase inflamatoria como la antiinflamatoria. Estos hallazgos contribuyen a comprender la complejidad del shock y la tolerancia/IS inducidos por sepsis, y podrían orientar futuras estrategias terapéuticas inmunomoduladoras.

Palabras claves: Sepsis; lipopolisacárido; tolerancia a la endotoxina, inmunosupresión, interleuquina-10, glucocorticoides.

Mediators associated with immunosuppression induced by bacterial endotoxins and septic processes. Strategies that allow modulation of the immune status

Sepsis is one of the leading causes of death in ICUs. It is currently defined as a life-threatening organ dysfunction caused by a dysregulated host response to infection. This dysfunctional response involves simultaneous hyperinflammatory and anti-inflammatory/immunosuppressive responses that vary over time. Clinically, the early stages are characterized by a predominant hyperinflammatory response, which can lead to the development of septic shock, substantially increasing mortality. In the later stages, patients progress to a state of immunosuppression (IS), ultimately succumbing due to the inability to control the primary infection or the acquisition of secondary infections.

Among the agents that may be involved in IS are anti-inflammatory cytokines such as IL-10, as well as steroid hormones such as glucocorticoids (GC). Recent studies have suggested that the accumulation of myeloid suppressor cells (MDSCs) in different organs could be an important component of this phenomenon. Furthermore, among the molecules that regulate MDSC accumulation and functionality, the involvement of both IL-10 and GCs has been described.

Our work group has demonstrated the substantial role of GCs in suppressing humoral and cellular immune responses in an LPS-induced tolerance/IS model. Within this framework, the overall objective of this work was to extend the studies to other mediators that have been implicated as central factors in the onset of immune depression, such as IL-10. To this end, IL-10 knockout (KO) mice were used to develop experimental models.

Our results demonstrated that IL-10 plays a critical role in regulating the early inflammatory response induced by endotoxins. The KO mice showed an exacerbated sensitivity to LPS, reflected in greater lethality, elevated levels of proinflammatory cytokines such as TNF-α, and greater tissue damage, especially in the liver. Despite an increase in GC and TGF-β levels, these failed to completely counteract the hyperinflammation. Likewise, dexamethasone treatment showed a limited protective effect, highlighting the essential role of IL-

10 in the anti-inflammatory/protective action of GCs during endotoxemia, suggesting a possible interrelationship between both mediators.

Regarding the tolerance/IS phenomenon, although tolerance was induced in the absence of IL-10, it was not robust and limited to low-intensity challenges. The characteristic features of IS, such as reduced humoral response, lymphopenia, neutrophilia, and decreased clearance capacity, were accompanied by an expansion of myeloid cells into various compartments, which could be linked to immunosuppressive responses; however, this requires further study.

Furthermore, KO mice presented elevated levels of GCs that contributed to the maintenance and, in part, the establishment of tolerance/IS. Taken together, these findings suggest that, in the absence of IL-10, endogenous GCs could play a key role in both phases of the phenomenon. In conclusion, this work demonstrates that IL-10 and GCs act bidirectionally, modulating both the inflammatory and anti-inflammatory phases. These findings contribute to our understanding of the complexity of sepsis-induced shock and tolerance/IS and could guide future immunomodulatory therapeutic strategies.

Keywords: Sepsis; lipopolysaccharide; interleukin-10, glucocorticoids, endotoxin tolerance, immunosuppression.

ALT	Alanina aminotransferasa
AST	Aspartato transaminasa
BTLA	B- and T-lymphocyte attenuator
CD	*Cluster of Differentiation*
CFSE	*Carboxy Fluorescein Succinimidyl Ester*
CLP	*Cecal Ligation and Puncture*
ConA	Concanavalina A
Cre	Creatinina
CTLA-4	*Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4*
CXCL	Ligando de quimiocinas
CXCR	Receptor de quimiocinas
DAMP	*Danger-Associated Molecular Pattern*
DEX	Dexametasona
eCIRP	*Extracellular Cold-Inducible RNA-binding Protein*
GC	Glucocorticoides
GRA	Granulocitos
HHA	Eje Hipotálamo Hipófisis Adrenal
HLA-DR	*Human Leukocyte Antigen-DR isotype*
HMGB1	*High Mobility Group Box 1*
IL	Interleuquina
IFN	Interferon
ip	Intraperitoneal
IRF3	*Interferon Regulatory Factor 3*
IS	Inmunosupresión
KO	Ratones *knock out* para IL-10
LBP	*LPS-Binding Protein*
LPS	Lipopolisacárido
LYM	Linfocitos
MDSC	*Myeloid-Derived Suppressor Cells*
MIF	Mediana de la Intensidad de Fluorescencia
MHC-II	*Class II Major Histocompatibility Complex Molecules*
Mo	Monocitos
MO	Médula Ósea
MyD88	*Myeloid differentiation primary response gene 88*
NETs	*Neutrophil Extracellular Traps*
NFkB	*Nuclear Factor κB*
NO	Nitric Oxide
PAMP	*Pathogen-Associated Molecular Pattern*
PBMC	*Peripheral Blood Mononuclear Cells*
PBS	*Phosphate Buffered Saline Solution*
PD-1	*PD-1: Programmed death-1*
PD-L1	*Programmed Death-ligand 1*
PICS	*Persistent Inflammation, Immunosuppression and Catabolism Syndrome*
PMN	Polimorfonucleares
PRR	*Patttern Recognition Receptor*
ROS	*Reactive Oxygen Species*

RU 486	Mifepristone (RU486)
SA	*Staphylococcus aureus*
sc	Subcutánea
SF	Solución Fisiológica
SIRS	*Systemic Inflammatory Response Syndrome*
SOFA	*Sepis-related (Sequential) Organ Failure Assessment*
TCR	*T Cell Receptor*
TGF-β	*Transforming Growth Factor-β*
TLR	*Toll Like Receptor*
TNF-α	*Tumor Necrosis Factor-α*
TSA	*Agar Tryptein Soy*
TSB	*Tryptein Soy Broth*
UCI	Unidad de Cuidados Intensivos
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
WT	*Wild Type*

Introducción

1. Etimología de la Sepsis

La sepsis constituye uno de los síndromes más antiguos e indescifrables de la medicina. La palabra sepsis deriva del griego “σήψε” que significa descomposición de materia orgánica en presencia de bacterias (Geroulanos *et al.,* 2006). El primer registro de su uso en un contexto médico data de más de 2700 años en los poemas de Homero. Asimismo, el término aparece en los escritos del médico y filósofo Hipócrates (400 a.c.), quien describe a la sepsis como una “descomposición peligrosa y olorosa que ocurre en el colon desde de donde se liberaba el principio peligroso causante de la autointoxicación” (Funk, *et al*., 2009). Esta definición permaneció aceptada hasta fines del siglo XIX, cuando Pasteur propuso la teoría de los gérmenes. A partir de entonces, la sepsis fue redefinida como una infección sistémica, entendida como el "envenenamiento de la sangre" resultado de la invasión del hospedador por organismos patógenos que se propagaban en el torrente sanguíneo. Sin embargo, con la llegada de los antibióticos modernos, la teoría de los gérmenes no explicaba en su totalidad la patogenia de la sepsis, ya que muchos pacientes morían a pesar de la erradicación exitosa del patógeno causante (Cerra 1985; Angus *et al.,* 2013). En consecuencia, a inicios del siglo XX los investigadores comenzaron a sugerir que era la respuesta del hospedador, más que el germen, lo que impulsaba la patogenia de la sepsis. En línea con esto, el médico Sir William Osler describió en su libro “el paciente con sepsis parece morir por la respuesta del cuerpo a la infección y no por ella” (Hommes *et al.,* 2009).

Estas transformaciones en la comprensión del síndrome reflejan cómo su definición ha sido históricamente dinámica y sujeta a revisión constante. En 1992 tuvo lugar el primer encuentro entre expertos de todo el mundo del área de cuidados críticos, del cual surgió por consenso, la definición de Sepsis -1. Este concepto definía la sepsis como un síndrome de respuesta inflamatoria sistémica desencadenado por una infección (SIRS, del inglés: *Systemic Inflammatory Response Syndrome*). El diagnóstico requería evidencia clínica o microbiológica de infección y al menos dos de los cuatro criterios de SIRS (Criterios de SIRS: temperatura corporal superior a 38° o menor a 36°;

frecuencia cardíaca superior a 90 latidos/minutos; frecuencia respiratoria superior a 20 latidos/minuto o presión parcial de CO_2 inferior a 4,3 kPa; recuento de leucocitos superior a 12000/mm^3 o inferior a 4000/mm^3 o más del 10% de formas inmaduras, neutrófilos no segmentados, en sangre periférica) (Bone *et al.,* 1992). Sin embargo, esta definición carecía de la especificidad necesaria para distinguir con claridad pacientes con sepsis de aquellos con una respuesta inflamatoria exacerbada no infecciosa. Con la finalidad de mejorar el abordaje diagnóstico, en el 2001 se propuso la definición de Sepsis-2 tras una nueva reunión entre expertos. Este concepto complementó a la definición previa con una lista ampliada de indicadores clínicos y de laboratorio, facilitando así la clasificación de los pacientes según la gravedad del cuadro clínico. Se consideraba a la sepsis como un sindrome clínico que abarcaba un continuo: desde la septicemia hasta la sepsis grave, seguida por la disfunción de órganos y el shock séptico, siendo este último la forma más severa (Levy *et al*., 2003). En esta oportunidad, no se propuso una definición alternativa debido a la falta de evidencia que la respaldara. De hecho, las definiciones de sepsis, shock séptico y disfunción orgánica se mantuvieron prácticamente sin cambios durante más de dos décadas.

A pesar de los avances, las definiciones anteriores no lograron captar la complejidad clínica de la sepsis ni mejorar de manera significativa su diagnóstico y pronóstico. Recién en 2016, en la tercera junta de expertos, se propuso una revisión y redefinición que dio lugar al concepto de Sepsis-3, vigente en la actualidad. Así, la sepsis se define como una disfunción orgánica potencialmente mortal causada por una respuesta desregulada del hospedador a la infección. El shock séptico, considerado un subconjunto, se caracteriza por alteraciones severas a nivel circulatorio, celular y metabólico que incrementan drásticamente el riesgo de mortalidad en comparación con la sepsis. El criterio diagnóstico de Sepsis -3 requiere la presencia o sospecha de infección acompañada por un aumento de al menos 2 puntos en la puntuación de SOFA (por sus siglas en inglés, *Sequential Organ Failure Assessment*) respecto al valor inicial del paciente (Singer *et al.,* 2016). Esta nueva definición pone de manifiesto la relevancia de la respuesta no homeostática del hospedador frente a la infección, su potencial letalidad - que supera ampliamente a la de una

infección simple - y la necesidad de un reconocimiento clínico urgente. Los términos “desregulación” y “respuesta del hospedador” no se definen de forma estricta, sino que se interpretan como respuestas alteradas - tanto a nivel inmunológico como de otros sistemas - que contribuyen a la disfunción orgánica y, en última instancia a la muerte (Singer *et al*., 2016; Van der Poll *et al*., 2021).

A partir de la definición propuesta en Sepsis-3, Rudd y colaboradores llevaron a cabo en 2017 el primer estudio destinado a estimar de manera global la carga de la sepsis, considerando la incidencia y mortalidad. Analizaron 195 países y territorios, con 282 causas subyacentes de muerte, ambos sexos y 23 grupos etarios en el período comprendido entre 1990 y 2017. Según los resultados, en 2017 se registraron aproximadamente 48,9 millones casos de sepsis y 11,0 millones de muertes asociadas. Estas cifras duplican las estimaciones globales previas, probablemente debido a la inclusión de datos provenientes de países de ingresos bajos y medios, regiones donde la incidencia y la mortalidad por sepsis son considerablemente más elevadas. (Rudd *et al.,* 2020).

2. Fisiopatología de la sepsis

Existen diversos agentes etiológicos asociados a la sepsis tales como bacterias, hongos, parásitos o virus que difieren enormemente en su estructura, virulencia y mecanismo de infección. Las bacterias continúan siendo los agentes etiológicos más comúnmente identificados en sepsis, seguidas por los hongos que actualmente están en incremento. Un estudio reciente sobre la prevalencia de infecciones en unidades de cuidados intensivos (UCI), arrojó que el 70% de los pacientes infectados tenían aislados positivos y más de un tipo de microorganismo, siendo el 49,8% de los aislados positivos bacterias gram-positivas, el 67,1% bacterias gram-negativas y el 12,9% hongos. En pacientes con aislamientos bacterianos positivos, el organismo gram-positivo más común fue *Staphylococcus aureus* (19,7%); y los organismos gram-negativos más comunes fueron las especies de *Pseudomonas* (16,3%) y *Escherichia coli* (22,7%) (Sakr *et al.,* 2018; Dyck *et al.,* 2024).

Independientemente del tipo de infección, la patogénesis de la sepsis es sumamente compleja. La respuesta inicial del hospedador involucra procesos heterogéneos que incluyen inflamación, activación de la coagulación, disfunción endotelial, activación del sistema del complemento, supresión inmune y alteraciones en el microbioma (Fattahi *et al*., 2018; Opal *et al.,* 2015; Levi *et al.,* 2017; Adelman *et al*., 2020; Torres *et al*., 2021a). Se han propuesto diferentes modelos para explicar el comportamiento de la respuesta inflamatoria y la inmunosupresión (IS) a lo largo de la sepsis. Inicialmente, se consideraba que la sepsis presentaba un patrón bifásico, con una respuesta inflamatoria inicial seguida por una respuesta inmunosupresora tardía (Hotchkiss *et al*., 2003). Sin embargo, estudios posteriores demostraron que ambas respuestas ocurren de manera concomitante, pudiendo predominar, en términos clínicos una sobre la otra en diferentes momentos (Hotchkiss *et al*., 2016).

Desde 2004 la iniciativa "Campaña sobreviviendo a la sepsis", ha proporcionado directrices internacionales para el manejo de la sepsis, con actualizaciones continuas a medida que surgen nuevos conocimientos (Dellinger *et a*l., 2004; Evans *et al*., 2021). Estas guías han promovido la implementación de mejores prácticas clínicas, reconocimiento temprano y reanimación exitosa, lo que ha incrementado la supervivencia durante la fase inicial de la enfermedad. Sin embargo, a pesar de la reducción en la mortalidad temprana (Damiani et al., 2015), la mortalidad a largo plazo tras la sepsis continúa siendo elevada, con muchos pacientes que fallecen meses o incluso un año después (Prescott *et al*., 2016; Shankar-Hari *et al*., 2016; Wilhelms *et al.,* 2020). Por ello, en la actualidad se busca comprender y dilucidar los mecanismos que contribuyen a estas muertes tardías. En su última actualización, la "Campaña Sobreviviendo a la Sepsis" propuso nuevas recomendaciones para el manejo previo al alta, con el objetivo de mejorar los resultados a largo plazo. Pese a esto, hubo varios aspectos importantes del tratamiento para los cuales no se pudieron emitir recomendaciones firmes, lo que subraya la necesidad de más investigaciones que orienten la atención en la sepsis (Prescott *et al*., 2023).

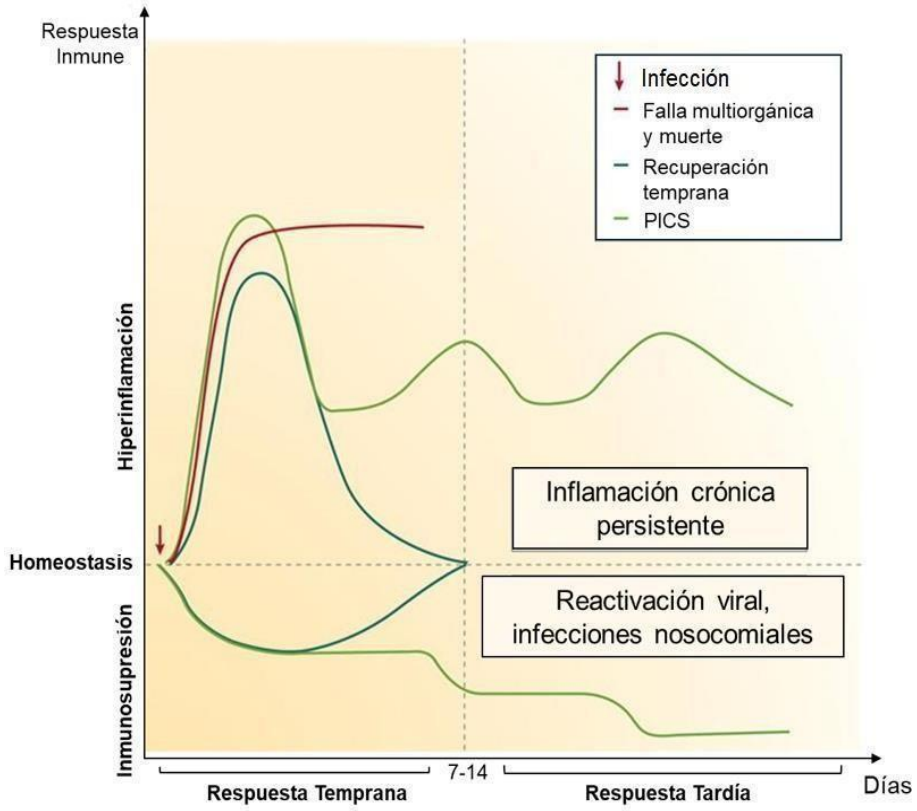


Figura 1: **Modelo actual de la trayectoria clínica que atraviesan los pacientes con sepsis.** Refleja las respuestas inflamatorias e inmunosupresoras concurrentes. Algunos pacientes experimentan una respuesta inflamatoria temprana y pronunciada que provoca insuficiencia orgánica múltiple y la muerte (línea roja). La reanimación exitosa produce que los pacientes se recuperen lo suficiente como para ser dados de alta (líneas azules). Otros pacientes sobreviven a la respuesta inflamatoria temprana, pero experimentan la enfermedad crítica crónica PICS (líneas verdes). Modificado de Hotchkiss *et al*., 2016.

En este contexto, se han propuesto dos conceptos claves que respaldan la patogénesis de la disfunción orgánica y las muertes tardías en pacientes con sepsis. El primero sugiere que estas muertes están relacionadas con la incapacidad del paciente para eliminar las infecciones primarias y con la adquisición de infecciones secundarias. Estas complicaciones derivan de fallas en elementos clave del sistema inmunológico, tanto innato como adaptativo, que promueven un estado profundo de inmunosupresión (IS), especialmente en

pacientes con sepsis prolongada (Venet *et al.*, 2018). El segundo concepto sostiene que las muertes tardías se deben a una inflamación subyacente impulsada por el propio sistema inmune. Los pacientes con sepsis prolongada presentan tanto inflamación como inmunosupresión persistente, lo que con frecuencia conduce a una enfermedad crítica crónica recientemente denominada ¯síndrome de inflamación, inmunosupresión y catabolismo persistente‖ (PICS, por sus siglas en inglés). Este síndrome se asocia con un pronóstico desfavorable, caracterizado por deterioro funcional y neurocognitivo, atrofia muscular progresiva y aumento de la mortalidad a 30 días y al año (Figura 1) (Mira *et al*., 2017; Darden *et al.,* 2021).

Estudios realizados en pacientes sépticos con estancias prolongadas en UCI han evidenciado la reactivación viral y el desarrollo de infecciones oportunistas por bacterias y hongos (Imlay *et al*., 2020; Otto *et al.,* 2011), lo que respalda la hipótesis de que las muertes tardías están relacionadas con la incapacidad del paciente para controlar y erradicar una infección.

Así, aunque se han identificado células efectoras y sistemas de órganos implicados en la respuesta inflamatoria y la inmunosupresión concurrente, los mecanismos subyacentes y los cambios persistentes a largo plazo aún no se han esclarecido completamente (Wiersinga et al., 2022).

2.1 Respuesta inmune temprana durante la sepsis

La definición actual de sepsis destaca la presencia de una ¯respuesta desregulada del hospedador frente a la infección‖ desde el punto de vista del sistema inmune, la sepsis se caracteriza por una respuesta disfuncional que varía en el tiempo, donde ocurren simultáneamente respuestas inflamatorias e inmunosupresoras que contribuyen, en diferente grado, a la inmunopatología de la sepsis (Rubio *et al.,*2019; Van der Poll *et al*., 2021). Sin embargo, clínicamente, en etapas tempranas de la sepsis, se evidencia el predominio de una respuesta inflamatoria exacerbada, la cual, dependiendo de su magnitud y duración, puede conducir al desarrollo de un shock séptico, y, en

consecuencia, aumentar de manera sustancial la mortalidad. (Hotchkiss *et al*., 2016).

Durante la fase inicial de una infección, en un contexto de inmunidad protectora, se activa rápidamente la respuesta inmune innata con el objetivo de contener y eliminar el agente patógeno. Las células de la inmunidad innata junto con células epiteliales y endoteliales, desempeñan un papel clave en la vigilancia del microambiente tisular y en la detección de microorganismos mediante el reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs, por sus siglas en inglés: *Pathogen-Associated Molecular Patterns*), estructuras moleculares altamente conservadas presentes en bacterias, virus y hongos (Zhou *et al*., 2021). Estos PAMPs son reconocidos por receptores de reconocimiento de patrones (PRRs, por sus siglas en inglés: *Pattern Recognition Receptors*), localizados en la superficie celular como en compartimentos intracelulares de células inmunes y de otros tipos celulares. Los PRRs se clasifican según su estructura, su localización subcelular y la naturaleza de sus ligandos. Entre ellos, los *Toll-like receptors* (TLRs) constituyen una de las familias de receptores que tienen un rol central en la detección inicial de patógenos (Raymond *et al.,* 2017).

La activación de los PRRs mediante PAMPs en diferentes tipos celulares del sistema inmune innato, desencadena eventos de señalización complejos que resultan en el reclutamiento y la fosforilación de intermediarios intracelulares. Esto culmina en la activación de genes de respuesta inmediata que conducen a cambios transcripcionales y a la secreción de citoquinas inflamatorias, interferones tipo I, quemoquinas y péptidos antimicrobianos (Raymond *et al*., 2017).

Esta respuesta proinflamatoria es acompañada por una respuesta antiinflamatoria reparadora y localizada, ambas coordinadas para erradicar al patógeno y restaurar la homeostasis. Cuando la respuesta del hospedador es efectiva, se genera respuesta inmune equilibrada que permite la resolución de la infección sin daño excesivo tisular. Sin embargo, en determinados contextos, los patógenos pueden evadir los mecanismos de defensa del sistema inmune, lo que permite su proliferación y una acumulación progresiva de componentes

microbianos. Esta carga creciente puede sobrepasar la capacidad funcional de los PPRs previamente activados, alterando el equilibrio de la respuesta inmune del hospedador. Como consecuencia, la estimulación sostenida de los receptores perpetúa la activación de vías inflamatorias y antiinflamatorias que, en lugar de ser protectoras, adquieren un carácter patológico. Esta desregulación inmunológica sistémica caracteriza el desarrollo de la sepsis, condición clínica que puede conducir hacia un daño tisular y disfunción orgánica (Wiersinga *et al*., 2022).

Los PRR no solo reconocen PAMP exógenos, sino que también interactúan con alarminas endógenas o DAMP (del inglés: *Danger-Associated Molecular Pattern*). Los DAMP son moléculas endógenas que, en condiciones normales, se encuentran confinadas al compartimento intracelular, pero que se liberan extracelularmente ante situaciones de estrés celular, lesión tisular o muerte celular causada por agresiones estériles o infecciosas. Se clasifican según su origen: citosólico, nuclear, mitocondrial o del retículo endoplásmico (Zhou *et al.,* 2021). Los DAMP liberados durante el curso de una sepsis, incluyen proteínas asociadas al ADN como HMGB1(del inglés: *High Mobility Group Box 1*) e histonas; proteínas asociadas al ARN como eCIRP (del inglés: *Extracellular Cold-Inducible RNA- binding Protein*), y metabolitos como ATP (Xu *et al.,* 2009; Qiang *et al*., 2013; Cauwels *et al.,* 2014; Deng *et al*., 2022; Reilly *et al.,* 2022). Estas moléculas inducen una respuesta inflamatoria y, posteriormente, pueden contribuir a un estado de inmunosupresión que se correlaciona directamente con la gravedad del cuadro séptico. Gran cantidad de evidencias han demostrado, principalmente, el papel proinflamatorio de los DAMP (Patel, 2018; Denning *et al.*, 2019). Sin embargo, estudios recientes destacan también su relevancia en la inmunosupresión en sepsis (Zhou *et al.,* 2021). Los DAMP han sido implicados y se piensa que tienen un rol fundamental en el ciclo de retroalimentación positiva entre la lesión celular y la hiperinflamación sostenida (Wiersinga *et al.,* 2022).

Como se mencionó previamente las sepsis bacterianas son las de mayor incidencia, por lo que la respuesta inmune desencadenada por este tipo de patógenos resulta de gran interés. Las bacterias gram-negativas presentan en

su superficie moléculas de lipopolisacáridos (LPS) conformados por un dominio hidrófobo conocido como lípido A (o endotoxina), un oligosacárido central no repetitivo y un polisacárido distal (o antígeno O) (Raetz *et al.,* 2002). El lípido A constituye el principal PAMP del LPS que es reconocido por un PRR, particularmente por el TLR4 (del inglés: *Toll-like receptor 4*), una proteína transmembrana con un dominio extracelular presente en células de linaje mieloide y en algunas células no inmunes, como células del epitelio intestinal y células endoteliales (Lu *et al.,* 2008).

En un escenario típico, la activación de TLR4 requiere una cascada de eventos que se inician con la interacción del LPS a la proteína LBP (del inglés: *LPS-Binding Protein*) en suero. La LBP reconoce el LPS asociado a las membranas bacterianas o libre en forma de micelas en solución acuosa. La unión de estas proteínas facilita la interacción del LPS con otros componentes inmunológicos como es el caso del CD14, una glicoproteína localizada en la superficie de la membrana plasmática de monocitos, macrófagos, células dendríticas y en menor medida neutrófilos. Luego de esta interacción, el CD14 transfiere el LPS a la proteína MD-2 en el complejo TLR4/MD-2, promoviendo la dimerización de este receptor y desencadenando la señalización celular (Da Silva Correia *et al.,* 2001).

La dimerización de TLR4 activa dos vías: una vía dependiente de MyD88 (del inglés: *Myeloid Differentiation primary response gene 88*), que recluta proteínas adaptadoras como TIRAP/MyD88 y conduce a la activación temprana de NF-κB (del inglés: *Nuclear Factor κappa-B*) y a la producción de citoquinas proinflamatorias como TNF-α e IL-6; y una vía independiente de MyD88, que recluta TRAM/TRIF y activa el factor de transcripción IRF3 (del inglés: *Interferon Regulatory Factor 3*), induciendo la expresión de interferones tipo I y quemoquinas inducibles por IFN. Esta vía conduce también, en una fase tardía, a la activación de NF-κB. Los adaptadores TRAM/TRIF se reclutan en TLR4 luego de que el receptor haya sido endocitado, lo que explica la dicotomía en las vías de activación TLR4/LPS (Figura 2) (Lu *et al*, 2008; Płóciennikowska *et al*., 2015; Rosadini *et al*., 2017).

La activación de estas vías desencadena la producción y liberación masiva de mediadores inflamatorios por células endoteliales, dendríticas, *Natural Killer*, monocitos y macrófagos. Entre estos mediadores se incluyen citoquinas tales como TNF-α, IFN-γ, IL-1β, IL-12, IL-6, IL-17, así como quemoquinas como IL-8, CXCL1 y CXCL2 (Rosadini *et al.,* 2017). Esta respuesta inflamatoria mediada por citoquinas constituye un sistema evolutivamente conservado para controlar infecciones localizadas. Sin embargo, cuando la respuesta supera un umbral crítico, se generaliza y se produce una respuesta inflamatoria sistémica (Płóciennikowska *et al*., 2015).

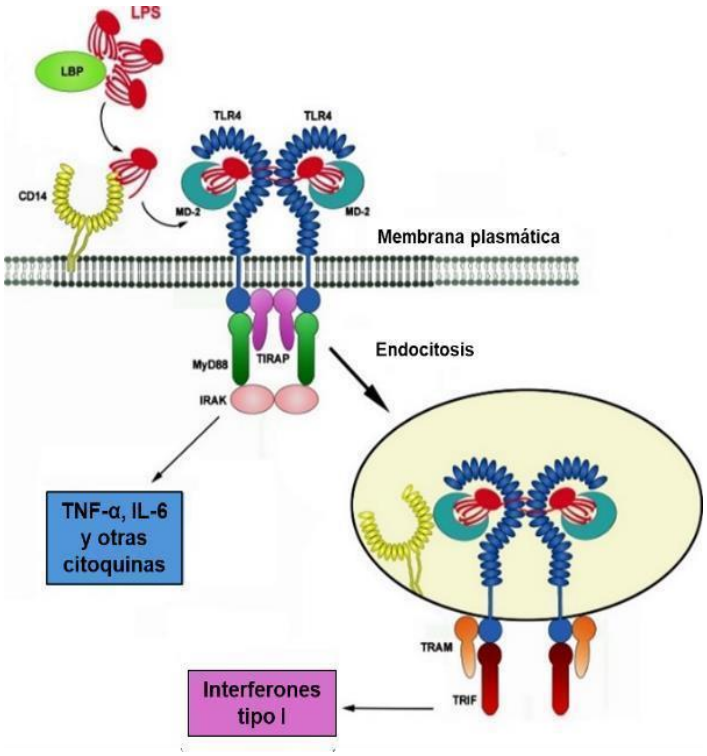


Figura 2: Descripción general de la señalización LPS/TLR4. El reconocimiento de LPS se ve facilitado por LBP y CD14, y está mediado por el complejo del receptor TLR4/MD-2. La señalización LPS/TLR4 se puede separar en dos vías MyD88- dependiente o MyD88-independiente que media la activación de genes de citoquinas proinflamatorias y de interferón tipo I. Modificado de Płóciennikowska *et al*., 2015.

Los neutrófilos en circulación expresan CXCR1 y CXCR2 en su membrana celular. Al recibir señales, CXCL1 y CXCL2 inician la extravasación hacia el sitio de infección, donde ejercen funciones efectoras como la degranulación, la liberación de especies reactivas de oxígeno o ROS (del inglés: *Reactive Oxygen Species*), la fagocitosis de patógenos y la formación de NETs (*Neutrophil Extracellular Traps*). En la sepsis, sin embargo, los neutrófilos presentan regulación negativa de CXCR2, lo que afecta su capacidad de migración. Esto favorece la diseminación de patógenos y la liberación inadecuada de NETs en la vasculatura, provocando inflamación vascular, daño endotelial y trombosis. Además, la infiltración inapropiada de neutrófilos contribuye al daño tisular en órganos como pulmones, hígado y riñones (Kolaczkowska *et al*., 2013; Zhou *et al*., 2022).

Durante la sepsis también se desarrolla una intensa activación del sistema de complemento mediante la activación de las vías clásica, alternativa y de lectinas. Esto genera la producción de anafilatoxinas como C3a y C5a, que interactúan con sus receptores, C5aR1 y C5aR2, en neutrófilos y macrófagos, induciendo formación de NETs y trampas extracelulares de macrófagos. Estas trampas, aunque diseñadas para atrapar y eliminar patógenos, liberan productos proinflamatorios y protrombóticos como mieloperoxidasa, proteasas, metaloproteasas e histonas. Otro producto importante de la activación del complemento es el complejo terminal C5b-9, conocido como complejo de ataque a la membrana, que induce citólisis, disfunción mitocondrial, activación del inflamasoma y liberación de IL-1β e IL-18 (Fattahi*, et al.,* 2020). En conjunto, la hiper-activación del sistema de complemento perpetúa la respuesta proinflamatoria, aumenta la permeabilidad vascular y la quimiotaxis leucocitaria, generando daño tisular en el hospedador (Gotts *et al.,* 2016; Arora *et a*l., 2023).

Por otro lado, las anafilotoxinas C3a y C5a también poseen efectos procoagulantes. Junto al incremento de la expresión del factor tisular (FT) en macrófagos activados, inician la activación sistémica de las cascadas de coagulación. Además, la lesión endotelial inducida por NETs, mediadores citotóxicos de neutrófilos activados, el complejo C5b-9 y la liberación de DAMPs, contribuye a la pérdida de la integridad del glucocáliz endotelial y de

sus propiedades anticoagulantes. Esto acelera la formación de trombos y conduce a la coagulación intravascular diseminada, una complicación común y potencialmente mortal de la sepsis (Gotts *et al.,* 2016; Iba *et al.,* 2021; Arora *et al.,* 2023). De esta manera, la hiperinflamación sistémica característica de la sepsis se ve intensificada por las interacciones entre los distintos sistemas de respuesta: por un lado, los factores de coagulación activan el sistema del complemento y viceversa (Lupu *et al*., 2014); por otro lado, los mediadores de la coagulación estimulan la producción de respuestas inflamatorias y viceversa (Chen *et al*., 2021). Estas interacciones no solo perpetúan, sino que amplifican de manera sostenida la respuesta hiperinflamatoria, contribuyendo al daño tisular y a la disfunción orgánica características de la sepsis.

2.2 Respuesta inmune tardía durante la sepsis

La intensidad de la respuesta hiperinflamatoria en la sepsis varía según diversos factores, como las comorbilidades del paciente, su estado nutricional, la carga de microorganismos y la virulencia de los patógenos involucrados (Van Der Poll *et al.,* 2021). En paralelo a esta respuesta exacerbada, el organismo despliega una respuesta antiinflamatoria "compensatoria" que busca mitigar la inflamación abrumadora, evitar la autoinmunidad y restablecer la homeostasis. Sin embargo, en el contexto de la sepsis, estos mecanismos de retroalimentación negativa, inicialmente protectores, pueden volverse perjudiciales a medida que persisten en el tiempo, contribuyendo a la inmunosupresión y favoreciendo infecciones secundarias (Delano *et al.,* 2016; Munford *et al.,* 2001).

El receptor TLR4 constituye el principal PRR implicado en la detección de bacterias gram-negativas y sus endotoxinas asociadas (Lu *et al.,* 2008). El reconocimiento de endotoxinas por las células del sistema inmune innato desencadena una respuesta inflamatoria robusta, esencial para la eliminación de los patógenos. Sin embargo, resulta crucial que esta respuesta se encuentre estrictamente regulada, ya que su descontrol puede causar un daño tisular

excesivo y manifestaciones clínicas graves como la sepsis y otras patologías inflamatorias (Foster *et al.,* 2009).

En este escenario, las adaptaciones fisiopatológicas que permiten modular la inflamación exacerbada constituyen un mecanismo esencial de protección del hospedador frente al shock endotóxico. Entre estos mecanismos, destaca la tolerancia a endotoxinas, que limita la hiperinflamación tras una exposición inicial al LPS, representando una estrategia clave de supervivencia en la respuesta inmune tardía (López-Collazo *et al.,* 2024; Biswas *et al.*, 2009).

2.2.1 Tolerancia a la endotoxina

El fenómeno de "tolerancia a endotoxinas" es un estado de reprogramación funcional de las células inmunitarias innatas, particularmente de monocitos y macrófagos, que ocurre tras exposiciones repetidas o sostenidas a LPS, el principal componente de la membrana externa de las bacterias gram-negativas (López-Collazo *et al.,* 2024; Biswas *et al.,* 2009). Este fenómeno, bien caracterizado tanto en modelos experimentales como en pacientes sépticos, se traduce en una reducción de la capacidad de las células inmunitarias para producir mediadores proinflamatorios tras una nueva exposición a LPS, mientras que la capacidad de producir mediadores antiinflamatorios se mantiene o incluso se potencia (Liu *et al*., 2019). Se interpreta como una estrategia adaptativa del hospedador para limitar la inflamación descontrolada, aunque también puede contribuir a la inmunosupresión observada en estadios avanzados de la sepsis (López-Collazo *et al.,* 2024).

En este contexto, los monocitos de pacientes sépticos, tras la estimulación *ex vivo* con LPS, presentan una capacidad reducida para liberar citoquinas proinflamatorias como TNF-α, IL-1α, IL-1β e IL-6 (Munoz *et al.,* 1991). En contraste, la liberación de mediadores antiinflamatorios, tales como IL-10, TGF-β, entre otros, no se observa incrementada (Rigato *et al.,* 2003; Marchant *et al*., 1995). Este hallazgo respalda la idea de que, aunque los monocitos aún responden a LPS, su señalización intracelular se ha modificado para restringir la producción de citoquinas proinflamatorias y mantener o potenciar las

respuestas antiinflamatorias, favoreciendo así la reprogramación leucocitaria (Liu *et al*., 2019). El concepto de reprogramación está mediado, al menos en parte, por mecanismos epigenéticos que incluyen modificaciones de histonas y alteraciones en la metilación del ADN. En particular, los monocitos y macrófagos exhiben un aumento de modificaciones represivas de histonas en las regiones promotoras de genes como IL-1β y TNF-α, mediadas por la dimetilación de la lisina 9 de la histona 3 (H3K9me2) (Vachharajani *et al.,* 2019). Estas modificaciones interfieren con el ensamblaje del complejo NF-κB/p65 y promueven la conversión sostenida de eucromatina a heterocromatina, lo que reduce la capacidad de respuesta a nuevos desafíos con LPS. Este mecanismo se ha observado tanto en experimentos *in vitro* de tolerancia a LPS en líneas celulares como en estudios *ex vivo* con monocitos de pacientes sépticos (Gazzar *et al*., 2009; Vachharajani *et al.,* 2019). Además, estos estudios sugieren que los glucocorticoides pueden ejercer efectos inmunosupresores a través de la modulación de la acetilación de histonas, lo que indica un posible mecanismo epigenético compartido entre la terapia antiinflamatoria y la inmunosupresión post-séptica (Beishuizen *et al.,* 2003).

Además de las modificaciones epigenéticas, la disminución de la respuesta proinflamatoria de los leucocitos tolerizados tras la reestimulación con LPS podría vincularse con la plasticidad intrínseca del factor de transcripción NF-κβ. El resultado de su activación depende del contexto celular y de las señales presentes. Por ejemplo, la activación de NF-κβ durante la fase inicial de inflamación suele asociarse con la expresión de genes proinflamatorios, mientras que su activación en fases de resolución desencadena la expresión de genes antiinflamatorios (Biswas *et al.,* 2009). En fases tempranas de la inflamación, los heterodímeros p65/p50 activan la expresión de TNF-α e IL-12, mientras que, en fases posteriores, la sobreexpresión de p50 y la acumulación de IκB favorecen la formación de homodímeros p50/p50 que reprimen genes proinflamatorios y promueven la expresión de IL-10, TGF-β y COX-2. Esto refleja la plasticidad funcional de NF-κβ y su capacidad para guiar a monocitos/macrófagos hacia un fenotipo tolerante (Figura 3). Sin embargo, las señales microambientales y los mecanismos moleculares que determinan la

transición hacia un fenotipo tolerante aún continúan en estudio (López-Collazo *et al.,* 2024; Amarasinghe, *et al.,* 2023).

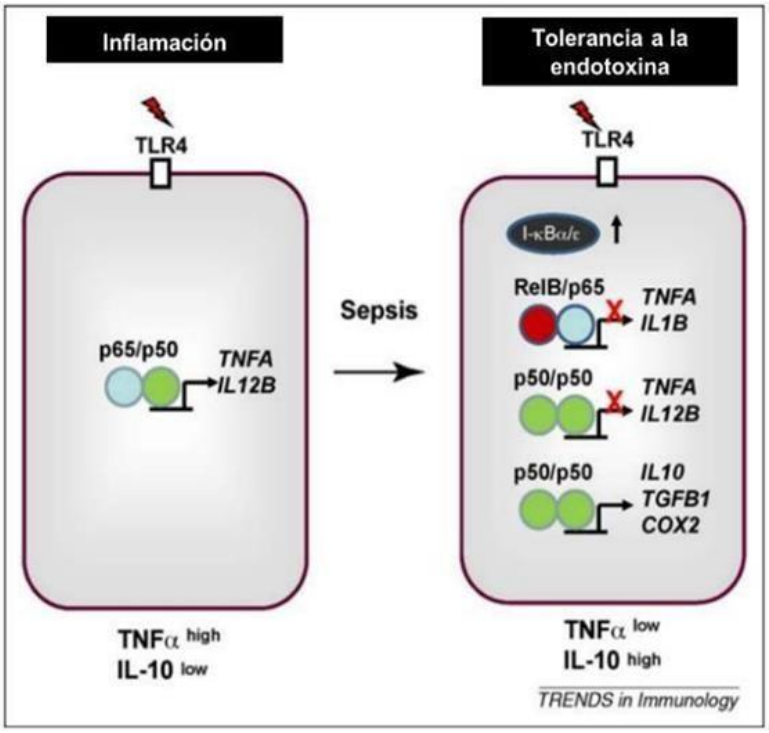


Figura 3: Plasticidad funcional del NF-kB en inflamación y tolerancia a endotoxinas. Esta figura representa cómo diferentes combinaciones de NF-kB y los heteros/homodímeros pueden activar o desactivar los mismos genes en condiciones inflamatorias o condiciones de tolerancia a endotoxinas. Modificado de Biswas *et al.,* 2009.

Otra alteración relevante en la tolerancia a endotoxinas es la disminución de la capacidad de presentación de antígenos, asociada a cambios en la expresión de moléculas de superficie. Los pacientes sépticos suelen presentar en los monocitos circulantes una reducción de la expresión de moléculas coestimuladoras como CD80 y CD40 y un aumento de moléculas coinhibidoras como PD-L1/PD-L2 (del inglés: *Programmed Death- Ligand*) (Shalova *et al.,* 2015; Avendaño-Ortiz *et al.,* 2018).

Además, la disminución en los niveles de expresión de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II o HLA-DR se ha convertido en un

marcador de referencia para la anergia en los monocitos y se encuentra asociado a una mayor incidencia de infecciones nosocomiales y mortalidad (Leijte *et al.,* 2020; Schefold, 2010). Esta disminución también se ha observado en células de bazo y pulmón en muestras post mortem de pacientes sépticos, lo que sugiere que la anergia a nivel de monocitos inducida por la sepsis no se limita a la circulación periférica, sino que constituye un fenómeno sistémico (Boomer *et al.,* 2011).

Por lo tanto, dos consecuencias claves asociadas al fenómeno de tolerancia a endotoxinas se dan sobre monocitos y macrófagos: una reducción de la liberación de mediadores proinflamatorios y la disminución de la capacidad de presentación antigénica a través de una menor expresión de HLA-DR (Drewry *et al.,* 2016; Yao *et al*., 2023). Aunque estas adaptaciones podrían limitar el daño inflamatorio excesivo durante la infección, también se han vinculado con la inmunosupresión secundaria que caracteriza a la sepsis asociado a un peor pronóstico o evolución clínica (Seeley *et al.,* 2017).

2.2.2 Inmunosupresión (IS)

Un ensayo retrospectivo realizado en pacientes admitidos en UCI entre 2006 y 2009 reveló que el 36,7% de las muertes causadas por sepsis ocurren antes del día 5 después del diagnóstico, mientras que el 63,3% ocurren de forma tardía, entre el día 6 y el día 150. Esto se asocia a que los pacientes que sobreviven al episodio inicial de sepsis permanecen hospitalizados durante períodos prolongados, que van desde 2 semanas hasta 5 meses. Esta hospitalización prolongada conlleva el riesgo de desarrollo o reactivación de infecciones por microorganismos oportunistas como *Cytomegalovirus, Pseudomonas aeruginosa, Klebsiella pneumoniae ssp., Acinetobacter spp., Enterococcus spp. o Candida spp.,* que terminan en mortalidad tardía o alta con discapacidad considerable (Imlay *et al*., 2020; Otto *et al.,* 2011). Investigaciones clínicas, de laboratorio y traslacional destacan a la inmunosupresión (IS) inducida por sepsis como la principal causa de estas muertes tardías (Kyriazopoulou *et al.,* 2021). El término IS incluye el

agotamiento inducido por apoptosis de células efectoras, la disminución de las vías de activación de células inmunitarias, la regulación positiva de vías de supresión inmune, la reactivación de virus latentes y las infecciones por microorganismos oportunistas (Ono *et al*., 2018; Hotchkiss, *et al.,* 2013a).

La apoptosis es un mecanismo por el cual el sistema inmunológico mantiene la homeostasis eliminando las células ya activadas. Este proceso involucra caspasas, unas cisteína-proteasas sintetizadas como zimógenos y activadas por escisión proteolítica. Aunque se distinguen tres vías de inducción de apoptosis, todas culminan en la activación de caspasas. Entre ellas, la vía del receptor de muerte (o vía extrínseca) se inicia en la membrana plasmática mediante la unión de ligandos, como Fas o TNFα, a sus receptores de muerte: CD95 (Fas o Apo1) y TNFRI (p55 o CD120a). TNFRI recluta intermediarios y forma el complejo I, que, mediante transducción de señales, conduce a la translocación de NF-κB al núcleo. Posteriormente, el complejo I se disocia y TNFRI recluta a FADD y a la caspasa-8 para formar el complejo II, que induce la apoptosis (Pinheiro da Silva *et al.,* 2009).

En sepsis, se ha demostrado que la apoptosis ocurre de manera concurrente con la respuesta proinflamatoria. Hotchkiss y colegas evidenciaron una profunda depleción de linfocitos, tanto en modelos murinos como en pacientes con sepsis grave (Dong *et al*., 2023; Hotchkiss *et al.,* 1999; Unsinger *et al.,* 2009, 2010). Aunque se reconoce que el agotamiento de células del sistema inmune es clave en la patogenia de la sepsis, los mecanismos responsables no se comprenden completamente (Li *et al*., 2023; Shankar-Hari *et al*., 2020).

Los linfocitos T CD4 y CD8 son particularmente susceptibles a la apoptosis inducida por sepsis. De hecho, se ha visto que el suero de pacientes con sepsis induce apoptosis en linfocitos T CD4 de voluntarios sanos, lo que sugiere la presencia de factores solubles que regulan los procesos apoptóticos en sepsis (Vaki *et al*., 2010). Además, se ha observado que las células apoptóticas per se suprimen la respuesta inflamatoria: al incubar linfocitos apoptóticos con PBMC estimulados con endotoxinas, se induce un cambio en la secreción de citoquinas de un perfil proinflamatorio a uno antiinflamatorio (Girkontaite *et al*., 2007). Por lo tanto, durante la sepsis se generan diversos

factores solubles que regulan la apoptosis y contribuyen a mantener un entorno antiinflamatorio.

Esta disminución de células efectoras se acompaña de una mayor expresión de receptores de superficie que inhiben funciones celulares. Los linfocitos T aislados de bazo y pulmón post-mortem, así como de sangre periférica a los 7 días del diagnóstico de sepsis, presentan una mayor expresión de PD-1, CTLA-4 y BTLA. Por su parte, las células presentadoras de antígenos y las células endoteliales aumentan la expresión de los ligandos PD-1, PD-L1 y PD-L2, lo que resulta en apoptosis de linfocitos T o anergia celular (Patil *et al*., 2017; Boomer, *et al.,* 2014).

Otro evento relevante en cuadros de IS es la expansión de células supresoras, como las células Treg y MDSC (del inglés: *Myeloid-Derived Suppressor Cells*). Las MDSC constituyen una población heterogénea de células mieloides inmaduras con capacidad para suprimir la respuesta de células T (Van der Poll, 2017; Schrijver *et al.,* 2019).

En humanos, así como en modelos de ratón, las MDSC se dividen principalmente en dos subgrupos según la densidad, la morfología y el fenotipo: PMN-MDSC (granulocíticas/polimorfonucleares) y M-MDSC (monocíticas) (Figura 4). En modelos murinos, se han propuesto características fenotípicas mínimas para identificarlas; las PMN-MDSC se pueden distinguir por el fenotipo, $CD11b^{+}/Ly6G^{+}/Ly6C^{low}$, y las M-MDSC por el fenotipo $CD11b^{+}/Ly6G^{-}/Ly6C^{high}$ (Bronte *et al.,* 2016).

Las MDSC suprimen la actividad de las células inmunes a través de diferentes mecanismos: la degradación de L-arginina, la producción de ROS y especies reactivas de nitrógeno, la secreción de citoquinas antiinflamatorias/inmunosupresoras como IL-10 y TGF-β y la activación de células Treg (Schrijver *et al.,* 2019). La depleción de L-arginina afecta la función de linfocitos T a través de la reducción de la cadena zeta del CD3, δ-CD3, crucial para la señalización del TCR (del inglés: *T-Cell Receptor*) (Bronte *et al*., 2005). Por otro lado, la IL-10 y TGF-β desvían la polarización de monocitos/macrófagos y linfocitos T hacia fenotipos antiinflamatorios/pro-

resolutivos (M2, Th2 y Treg), además de inhibir la citotoxicidad de los linfocitos T y la activación de células NK (Zhang *et al*., 2023).

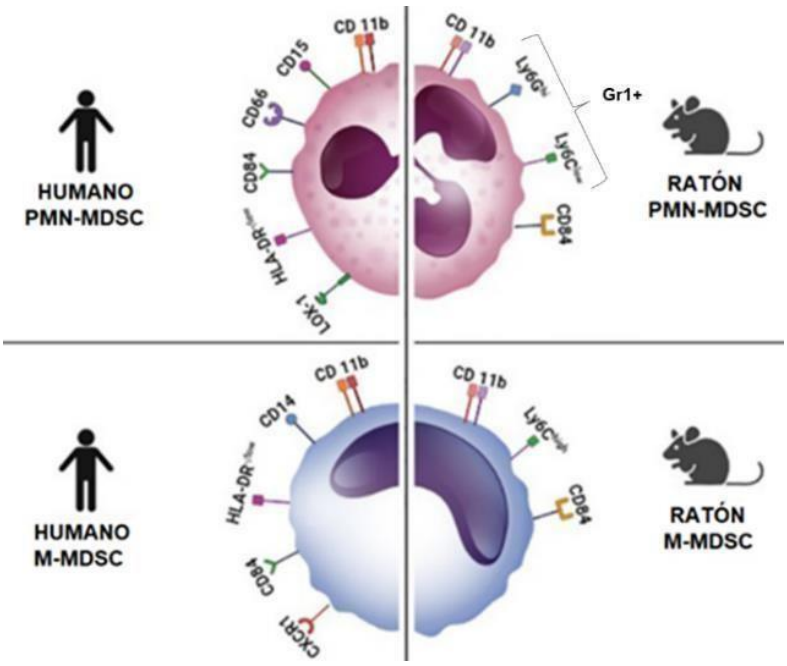


Figura 4: Marcadores de superficie de los diferentes subconjuntos de células supresoras derivadas de mieloides (MDSC) en ratones y humanos. Estos marcadores permiten la discriminación entre MDSC polimorfonucleares (PMN- MDSC) y MDSC monocíticas (M-MDCS). Modificado de Prochetto *et al*., 2022.

En este sentido, las MDSC - tras la hematopoyesis de emergencia - proporcionan una barrera inicial contra la invasión microbiana mediante la producción robusta de ROS, contrarrestando en simultáneo, la respuesta hiperinflamatoria asociada con disfunciones orgánicas tempranas, mediante la secreción de citoquinas antiinflamatorias y la polarización hacia un fenotipo pro-resolutivo (Cuenca *et al.,* 2012). Sin embargo, las MDSC también promueven el establecimiento y mantenimiento de un entorno inmunosupresor prolongado. Por lo tanto, las MDSC tienen diferentes efectos biológicos según el entorno y la progresión de la sepsis (Brudecki *et al.,* 2012a). En la actualidad, diferentes estudios clínicos, asocian las altas proporciones de MDSC con peor pronóstico,

aparición de infecciones nosocomiales y mortalidad (Janols *et al*., 2014; Zhang *et al*., 2023; Uhel *et al.,* 2017).

Recientemente se ha descrito que el heterodímero S100A8/A9 regula la diferenciación de MDSC durante la sepsis tardía. En etapas tempranas, las proteínas S100A8/A9 son liberadas al espacio extracelular por células fagocíticas. A medida que progresa el cuadro séptico, en etapas tardías, S100A8/A9 se acumula en el núcleo de las células mieloides inmaduras, reprogramando las células $Gr1^+/CD11b^+$ en MDSC (Dai *et al.,* 2017; Wang *et al.,* 2023). La IL- 10 estimula tanto la expresión como la acumulación nuclear de S100A9 en progenitores mieloides $Gr1^+/CD11b^+$. Además, la expresión diferencial de IL-6 e IL-10 se correlaciona con la expansión de células $Gr1^+/CD11b^+$; los niveles de IL-6 en plasma aumentan gradualmente durante la sepsis temprana, mientras que los niveles de IL-10 aumentan durante la sepsis tardía (Bah *et al*., 2018a). Otro actor implicado en la expansión de las MDSC son los glucocorticoides (GC) endógenos (Zhang *et al*., 2012). Estudios moleculares revelan que el mecanismo por el cual se da la amplificación de las MDSC por los GC puede atribuirse a la señalización del receptor de GC (GR) y al aumento de S100A8/A9 (Wang *et al*., 2020). Así, la vía S100A8/A9 conecta mediadores como IL-10 y GC con la expansión de las MDSC. No obstante, hasta la fecha no hay estudios que hayan explorado en sepsis tardía la relación entre la tríada GC, IL-10 y MDSC.

2.2.2 a) Glucocorticoides

Los glucocorticoides (GC) constituyen un grupo de moléculas derivadas del colesterol que cumplen funciones hormonales esenciales en prácticamente todos los tejidos del organismo. Al igual que los mineralocorticoides y los andrógenos suprarrenales son producidos en la corteza de la glándula suprarrenal, la cual presenta tres zonas histológicas y secretoras diferenciadas: la zona glomerular, donde se sintetizan los mineralocorticoides; la zona reticular, donde se producen los andrógenos; y la zona fascicular, responsable de la producción de los GC (Adcock *et al.,* 2016).

En humanos, el principal GC es el cortisol, mientras que en ratones lo es la corticosterona. Su síntesis y liberación están reguladas por el eje hipotálamo-hipófiso-adrenal. En este eje, las neuronas parvocelulares del núcleo paraventricular del hipotálamo liberan hormona liberadora de corticotropina (CRH), que a través del sistema porta hipotálamo-hipofisario alcanza la adenohipófisis. Allí, la CRH estimula a las células corticotropas para que sinteticen y secreten corticotropina (ACTH), la cual, a su vez, viaja por el torrente sanguíneo hasta la corteza suprarrenal, donde promueve la producción de cortisol (Keller-Wood, 2015).

Este eje presenta una activación circadiana que varía según la especie: en humanos, su actividad máxima ocurre en la mañana (ya que es una espacie diurna), mientras que en ratones es en la tarde (especie nocturna). Este patrón genera un pico de GC previo al inicio del periodo de actividad del día. Adicionalmente, existe una regulación ultradiana caracterizada por pulsos de ACTH que inducen la liberación de GC en pulsos a lo largo del día (Walker *et al.,* 2022). La producción de GC está sujeta a un mecanismo de retroalimentación negativa ejercido por los mismos GC, tanto a nivel hipofisario como hipotalámico. Además, su síntesis se modula en respuesta a parámetros fisiológicos como la presión arterial y la glucemia, así como por diversos factores, entre ellos citoquinas, hormonas, neuropéptidos y neurotransmisores (Keller-Wood, 2015). Entre las citoquinas, destacan la IL-1β, el TNFα y la IL-6 como potentes activadores del eje. Esta activación mediada por citoquinas derivadas de células del sistema inmune representa un mecanismo clave para mantener la homeostasis y mitigar el impacto de la inflamación excesiva en el huésped (Vandewalle *et al.,* 2020).

Los GC sintetizados en la corteza suprarrenal se liberan a la circulación y, debido a su naturaleza lipofílica, viajan principalmente unidos a proteínas transportadoras de origen hepático, como la globulina fijadora de corticosteroides o CBG (del inglés: *Corticoid Binding Globin*), transcortina con alta afinidad por cortisol/corticosterona y progesterona, o a la albumina que presenta una afinidad 3 a 4 veces menor afinidad que CBG. En consecuencia, sólo aproximadamente un 5% de los GC circulantes se encuentran en forma

libre y, por ende, biológicamente activa (Prigent, *et al.,* 2004; Vandewalle *et al.*, 2020).

2.2.2 a) I Mecanismo de acción de los GC

Una vez que los GC alcanzan su célula blanco, difunden a través de las membranas celulares para interactuar con receptores específicos: el receptor de glucocorticoides (GR) y el receptor de mineralocorticoides (MR). Ambos receptores son factores de transcripción que forman parte de la superfamilia de receptores nucleares. El MR se une con la misma afinidad a corticosterona, cortisol y aldosterona, mientras que el GR muestra afinidad exclusiva por los GC.

La expresión del GR es ubicua, mientras que la del MR se restringe principalmente a las glándulas salivales, sudoríparas, riñón, colon y sistema nervioso central, especialmente en el hipotálamo. La acción selectiva de los MR sobre sus tejidos blanco se determina por la presencia de la enzima 11-β-hidroxilasa, que inactiva los GC transformándolos en formas 11-ceto inactivas antes de interactuar con el receptor, permitiendo así la activación exclusiva de los MR (Chapman *et al.,* 2013; Cruz-Topete *et al.,* 2014). El mecanismo de acción de los GC sobre las células blanco puede ser de tipo genómico o no genómico. La acción no genómica es una respuesta rápida (segundos a minutos) y depende de los efectos de los GC sobre las características de las membranas celulares. A este nivel, el GR puede actuar en la membrana, desencadenando señales alternativas, o a través de sus efectos sobre los GR citosólicos (Panettieri *et al.,* 2019; Stahn *et al.,* 2008).

Entre los efectos más relevantes de este mecanismo se encuentran la modificación (en ambos sentidos) de las concentraciones de calcio intracelular, el aumento de la excitabilidad de las células musculares, el incremento de especies reactivas de nitrógeno (RNS, del inglés: *Reactive Nitrogen Species*) dependientes de eNOS (protector a nivel endotelial) o iNOS (inductor de estrés oxidativo), la inhibición de las funciones inflamatorias de neutrófilos y

macrófagos, y la inducción de apoptosis en distintos tipos celulares (Panettieri *et al.,* 2019).

Por otro lado, el efecto genómico constituye una respuesta más lenta (de horas), ha sido el más ampliamente estudiado y se encuentra mediado por los GR. La formación del complejo GR-GC permite la translocación al núcleo y la unión a elementos de respuesta a GC (GRE) localizados en los promotores de los genes blanco. Este proceso desencadena cambios en la expresión génica que impactan en múltiples funciones fisiológicas, como el metabolismo de lípidos, hidratos de carbono y proteínas, la formación ósea, el crecimiento, y los sistemas cardiovascular, renal e inmune (Gonzalez *et al.,* 2017). En relación con este último sistema, cabe destacar los efectos inhibitorios de los GC sobre la respuesta inflamatoria en todos sus niveles. Los GR pueden inducir apoptosis de leucocitos (linfocitos, neutrófilos, basófilos y eosinófilos), inhibir la síntesis de citoquinas proinflamatorias (TNF-α, IL-1, IL-6), reducir la expresión de quemoquiinas (MCP-1, IL-8), inhibir la adhesión, *rolling* y extravasación de leucocitos, reprogramar a los macrófagos hacia un fenotipo remodelador y aumentar la expresión de factores antiinflamatorios como la IL-10 (Cruz-Topete *et al.,* 2014). Estos efectos se llevan a cabo principalmente a través de la acción de los GR sobre el NF-κB el cual se inhibe mediante distintos mecanismos: secuestro, aumento de la expresión de I-Kb (del inglés: *Inhibitor of kappa B*). reclutamiento de inhibidores, inducción de histonas deacetilasas que reducen su expresión, y el reclutamiento de p53 que modula su actividad (Ronchetti *et al*., 2018; Franchimont *et al*., 2002).

Asimismo, los GC ejercen efectos inhibitorios sobre la respuesta inmune adaptativa, suprimiendo la expresión de genes que codifican componentes del TCR y otros implicados en la activación de las células T, incluidos aquellos relacionados con MHC-II y moléculas coestimuladoras (Cain *et al.,* 2017). De este modo, los GC suprimen la inmunidad celular (dirigida por Th1) y, en simultáneo, promueven la inmunidad y tolerancia humoral (dirigida por Th2) (Franchimont *et al*., 2000; Liberman *et al.,* 2018; Ramírez, 1988).

De forma paradójica, estudios genómicos han demostrado que los GC pueden preservar o incluso potenciar las vías genéticas asociadas a la inmunidad

innata. Por ejemplo, el tratamiento de células mononucleares de sangre periférica con GC induce la regulación positiva de varios PRR, receptores de citoquinas y quemoquinas, componentes del complemento y otros factores relacionados con la inmunidad innata. Una posible explicación a este efecto paradójico fue propuesta por Bornstein y colaboradores, quienes demostraron la expresión de TLR4 y TLR2 en las glándulas adrenales (Bornstein *et al*., 2004). Asimismo, Vakharia y Hinson observaron que el LPS y el ácido lipoteicoico pueden estimular de manera directa la liberación de GC desde las glándulas adrenales (Vakharia *et al.,* 2005). Estas observaciones respaldan la hipótesis de un bucle de retroalimentación positiva frente a la presencia de ligandos de TLR, que culmina en un aumento de la liberación de GC al torrente sanguíneo, activando así diferentes mecanismos clásicos de reversión de la inflamación.

2.2.2 a) Il Rol de los GC en contextos de IS

Los glucocorticoides (GC) regulan los procesos de inflamación, evitando respuestas exacerbadas que podrían conducir a daño tisular y destrucción excesiva de tejidos (Soto-Tinoco *et al.,* 2016). Sin embargo, en situaciones en las que se alteran los mecanismos de regulación y se producen niveles elevados de GC, sus efectos podrían contribuir a la instauración de cuadros de inmunosupresión (IS) severa, perjudiciales para el hospedador.

En pacientes con sepsis, la prevalencia de un estado hiperinflamatorio provoca una activación constante del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal, lo que suele estar asociado con niveles elevados de GC en plasma. Esta respuesta cumple un rol en la recomposición de la homeostasis inmune. Sin embargo, diversos estudios han señalado que concentraciones elevadas de GC en plasma se asocian con mayor severidad de la enfermedad y un aumento del riesgo de mortalidad en unidades de cuidados intensivos (Tan *et al.,* 2020; Güven *et al.,* 2021; Sosa, *et al.,* 2021). Incluso, un estudio reciente clasificó dos subfenotipos de sepsis según la trayectoria del cortisol plasmático; el grupo con niveles más altos mostró una correlación directa con una mayor mortalidad (Leng *et al*.,

2024). Por otro lado, Le Tulzo y colaboradores reportaron que la disminución en la expresión de HLA-DR en monocitos circulantes se asocia con un peor pronóstico de la enfermedad y demostraron que los altos niveles de GC en plasma están involucrados en el mecanismo que conduce a dicha disminución en la expresión de HLA-DR (Le Tulzo *et al.,* 2004).

Estudios desarrollados por nuestro laboratorio demostraron que el bloqueo de la acción de los GC endógenos mediante mifepristona (RU486), un antagonista competitivo del receptor de GC, promueve la restauración de la respuesta inmune humoral y celular en un modelo de IS inducido por LPS. Estos resultados se extendieron a otros moduladores de los niveles de GC, como la dehidroepiandrosterona (DHEA), una hormona natural con actividad anti-GC, y el metirapona, un inhibidor de la síntesis de GC, evidenciando que también promueven la recuperación de la respuesta inmune humoral y celular. Estos hallazgos subrayan la importancia de los GC en los cuadros de IS (Rearte, Maglioco *et al*., 2010; Rearte, Lndoni *et al.,* 2010; Rearte *et al*., 2014).

Aunque se conoce bien el efecto supresor de los GC sobre las citoquinas proinflamatorias, su impacto sobre las citoquinas antiinflamatorias - particularmente la IL-10 - no está completamente dilucidado. Por ejemplo, en cultivos de células sanguíneas estimulados con LPS, se observó un efecto bifásico de los GC sobre la secreción de IL-10: a dosis bajas, los GC aumentan la secreción de IL-10, mientras que a dosis altas la reducen. Por el contrario, la secreción de TNF-α fue suprimida en todos los casos (Franchimont *et al.,* 1999).

Recientemente, Fudulu y colaboradores desarrollaron un modelo de co-cultivo de células adrenocorticales (ATC7) y monocitos (THP1) para investigar la comunicación inmuno-esteroidogénica. Sus resultados sugieren que la expresión de IL-6 y de genes esteroidogénicos en respuesta al LPS depende de la activación de las células inmunes intra-suprarrenales. Además, demostraron que los efectos del LPS pueden ser modulados por los GC de manera dosis-dependiente (Fudulu *et al.,* 2021). Por otro lado, estudios realizados mediante técnicas de inmunocitoquímica mostraron que la zona fascicular de la glándula suprarrenal —responsable de la síntesis de

corticosterona– expresa predominantemente el receptor 1 de IL-10 (IL-10R1). Esto sugiere que la IL-10 podría desempeñar un papel relevante en la regulación de la biosíntesis de GC (Koldzic-Zivanovic *et al.,* 2006). Sin embargo, aún no se ha dilucidado por completo la interrelación entre ambos mediadores, IL-10 y GC, en un contexto de IS inducido por sepsis.

2.2.2 b) Interleuquina-10

La interleuquina-10 (IL-10) fue descripta por primera vez en 1989, inicialmente denominada como ¯factor inhibidor de la síntesis de citoquinas‖ (CSIF, del inglés: *Cytokine Synthesis Inhibitory Factor*), debido a su capacidad para inhibir la producción de citoquinas en células Th1 (Fiorentino *et al.,* 1989). Más tarde, se comprendió que esta función correspondía en realidad a un efecto indirecto de la IL-10 sobre células intermediarias, como macrófagos y monocitos. Posteriormente, diversos estudios *in vivo* e *in vitro* con IL-10 recombinante y anticuerpos neutralizantes de IL-10 permitieron ampliar el conocimiento de sus funciones y definir su papel fundamental como reguladora negativa de la respuesta inmune en múltiples niveles. Desde el punto de vista molecular, la IL-10 es una proteína de 178 aminoácidos de longitud que pierde 18 de ellos durante el proceso de secreción. Las isoformas humana y murina presentan un 75% de homología (Moore, *et al.,* 2001; Ouyang *et al.,* 2019).

La IL-10 es producida por numerosos tipos celulares, no restringidos exclusivamente al sistema inmune. En este sistema, fue descrita inicialmente en linfocitos Th2, y más tarde se reconoció su importancia en subpoblaciones de linfocitos Treg y en otras células linfoides, como linfocitos T CD8+, Th1 y Th17 (Saraiva *et al.,* 2010). En la actualidad, se ha demostrado su producción en linfocitos Breg asociados con la inducción de tolerancia (Cerqueira *et al.,* 2019). Los linfocitos Treg, inducidos por TGF-β, IL-10 y otras citoquinas como IL-2 e IL-4, secretan IL-10 tras su diferenciación, promoviendo así procesos de tolerancia (Ouyang *et al.,* 2019). Además, otras células linfoides de la respuesta inmune innata, como los linfocitos T γδ y las células NK, también han demostrado ser productoras de IL-10 (Sabat *et al*., 2010).

En cuanto a las células de origen mieloide, los monocitos, macrófagos y células dendríticas constituyen una fuente relevante de IL-10, cumpliendo un rol esencial en el mantenimiento de la concentración local de esta citoquina en los tejidos. Los granulocitos (neutrófilos y eosinófilos) circulantes, así como los mastocitos en tejidos, también son capaces de expresar y secretar IL-10. La producción de IL-10 en células mieloides se asocia típicamente con la respuesta inmune innata, inducida por la exposición a factores derivados de agentes patógenos que interactúan con PRR, como los TLR2, TLR3 y TLR4, en sinergia con correceptores como CD40, DC-SIGN y Dectina-1 (Ouyang *et al.*, 2019; Saraiva *et al.,* 2010).

Recientemente, se ha ampliado el conocimiento sobre la regulación de la expresión de IL-10, observándose que también puede inducirse en situaciones de cambios metabólicos celulares, como ocurre cuando se favorece el metabolismo respiratorio sobre el glucolítico en macrófagos, o en respuesta a metabolitos como butirato, ATP y adenosina en células dendríticas (Saraiva *et al.,* 2020)

Respecto a las fuentes productoras de IL-10 por células no inmunes, éstas incluyen queratinocitos, células epiteliales e incluso líneas celulares de carcinoma humano (Moore *et al.,* 2001; Gastl *et al.,* 1993).

2.2.2 b) I Mecanismo de acción de la IL-10

La IL-10 interactúa con un complejo de dos receptores de membrana diméricos asociados a proteínas Jak/STAT. Cada receptor está constituido por dos cadenas proteicas: IL-10R1 e IL-10R2. El IL-10R1 reconoce con alta afinidad a la IL-10 extracelular (50–200 pM) de forma dimérica, en una proporción IL-10:IL-10R1 de 1:2 (Sabat *et al*., 2010; Walter, 2014). La expresión de IL-10R1 es mayoritariamente hematopoyética: se detecta en unos cientos de moléculas por célula en linfocitos y en niveles variables en macrófagos y monocitos, donde puede incrementarse ante diversos estímulos. En células no hematopoyéticas, su expresión es principalmente inducible (Moore *et al*., 2001). El segundo componente del receptor, IL-10R2, se expresa de manera ubicua

en el organismo y, además de reconocer IL-10, puede dimerizar con IFNLR1 e IL-22R1 y unirse a IL-22, IL-26, IL-28 e IL-29 (Sabat *et al*., 2010).

Para obtener un receptor funcional de IL-10, es necesario que a cada dímero de IL-10R1 se asocien dos moléculas de IL-10R2. Ambas cadenas presentan en sus dominios intracelulares quinasas constitutivas: JAK1 en IL-10R1 y Tyk2 en IL-10R2 (Mosser *et al.,* 2008). La coexpresión de ambas cadenas receptoras influye en la conformación del dominio extracelular de IL-10R1, y las interacciones entre dominios extracelulares e intracelulares son fundamentales para iniciar la señalización a través de Jak1 y Tyk2 (Wilbers *et al*., 2017).

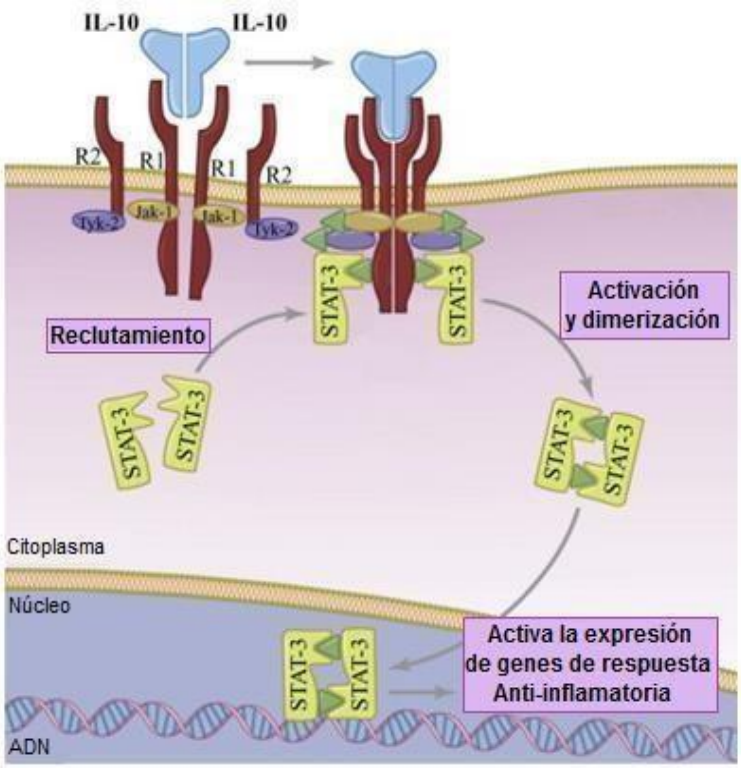


Figura 5: Vías de señalización inducidas por IL-10. La IL-10 se une al receptor de IL- 10, que está compuesto por las cadenas IL-10R1 e IL-10R2. Las quinasas asociadas, Jak1 y Tyk2, se activan y fosforilan (triángulo verde) la cadena IL-10R1. STAT3 se acopla al receptor y se activa por fosforilación. Las moléculas de STAT3 activas se dimerizan y viajan al núcleo, donde se unen a genes específicos para promover su transcripción. Modificado de Howes *et al.,* 2014.

El proceso de señalización involucra inicialmente la unión de la IL-10 a una molécula de IL-10R1, lo que permite el reclutamiento de una segunda molécula de IL-10R1. A cada una de éstas se asocia una subunidad de IL- 10R2 lo cual activa las quinasas Jak y TyK2 en los dominios intracelulares. Esto lleva a la fosforilación de dos residuos de tirosina en IL-10R1 (Tyr 446 y Tyr 496) que permiten el anclaje de STAT3 y su fosforilación por las quinasas asociadas al complejo. Como consecuencia, STAT3 se disocia, se dimeriza y es translocado al núcleo donde ejerce su acción como factor de transcripción (Figura 5) (Sabat *et al.,* 2010; Walter, 2014). Entre los factores que se expresan se encuentran SOCS3 (del inglés: *Suppressor Of Cytokine Signaling 3*), una ubiquitina ligasa capaz de poliubiquitinizar y enviar a degradación receptores de citoquinas, aunque no se ha demostrado la capacidad de su unión al complejo IL-10R (Mosser *et al.,* 2008). Alternativamente a los caminos clásicos, las vías PI3k, MAPK, Bcl-2, y c-fos también puede ser activadas, así como también la inhibición de la vía NF-κβ, aunque esta última es dependiente del tipo celular, siendo en algunos inactivada de manera indirecta a través de otras acciones de la IL-10 (Moore *et al*., 2001; Mosser *et al.,* 2008).

El estudio de las funciones y efectos de la IL-10 ha permitido catalogarla como una citoquina antiinflamatoria paradigmática, siendo uno de los factores solubles más potentes dentro de esta categoría. Su acción antiinflamatoria se observa tanto en la respuesta inmune innata como en la adaptativa, desarticulándolas integralmente. Sus principales blancos celulares son los macrófagos y, en menor medida, otras células presentadoras de antígenos, teniendo un rol esencial en la modificación del microambiente y en la presentación antigénica (Sabat *et al*., 2010; Wang *et al.,* 2019).

En macrófagos, que presentan alta expresión de IL-10R en su superficie, la IL-10 inhibe la producción de citoquinas y quemoquinas proinflamatorias, reduce la expresión de MHC-II y de moléculas coestimuladoras (Saraiva *et al*., 2020). Esto interfiere con la presentación antigénica y el microambiente de citoquinas. El mecanismo principal de supresión es la represión de la transcripción de genes proinflamatorios (Conaway *et al.,* 2017). En macrófagos preestimulados con LPS, la IL-10 reduce la expresión de IL-1β, IL-6, IL-12, TNF-α y

quemoquinas (Moore *et al.,* 2001). Adicionalmente, mediante la activación de SOCS3, induce la degradación de receptores de citoquinas proinflamatorias, desensibilizando a las células frente a ellas (Mosser *et al.,* 2008).

Por otra parte, la IL-10 es capaz de regular otros mecanismos de los macrófagos, entre los que se encuentran la inhibición del estallido respiratorio (por alteración de la producción de IFN-γ y TNF-α endógeno), la producción de metaloproteinasas de matriz (MMP) y el aumento de la capacidad fagocítica de partículas opsonizadas vía la sobreexpresión de CD64, CD32, CD16 y FcγR y no opsonizadas por aumento de CD14 (Moore *et al.,* 2001). Estas acciones confieren a los macrófagos un perfil menos microbicida e inflamatorio, y más orientado a la resolución y remodelación del proceso inflamatorio. De hecho, la IL-10, en conjunto con TGF-β y glucocorticoides, induce la diferenciación de macrófagos hacia un fenotipo antiinflamatorio y remodelador (M2c) (Shapouri-Moghaddam *et al.,* 2018).

En células dendríticas, la IL-10 bloquea la maduración de sus precursores al inhibir la producción de IL-12, generando células dendríticas ineficientes con baja expresión de IFN-γ, moléculas coestimuladoras y MHC-II. Asimismo, inhibe la quimiotaxis de monocitos a los sitios inflamatorios, evitando su diferenciación a macrófagos o células dendríticas y afectando así la presentación antigénica (Sabat *et al.,* 2010).

En las poblaciones linfoides, la IL-10 inhibe la proliferación y producción de citoquinas de las subpoblaciones Th1 y Th2, pero no de Th17, aunque sí reduce la producción de IL-23 necesaria para su diferenciación. Además, la IL-10 induce la producción de linfocitos Tr1, que secretan grandes cantidades de IL-10 y promueven la tolerancia y la anergia. También es necesaria para la inducción de linfocitos Treg $CD4^{+}FOXP3^{+}$, que cumplen funciones regulatorias especialmente en pulmón e intestino (Sabat *et al*., 2010). En las células T de memoria, su efecto es mínimo o indirecto (Mosser *et al.,* 2008).

En linfocitos T CD8+ el efecto de la IL-10 es menos claro, pudiendo inducir su reclutamiento y actividad citotóxica. Por otra parte, la IL-10 estimula la proliferación, sobrevida, diferenciación, expresión de MHC-II y producción de

inmunoglobulinas en linfocitos B, favoreciendo el cambio de isotipo (*class switching*) (Sabat *et al.,* 2010). De igual forma, en linfocitos NK, promueve la proliferación, la actividad citotóxica y la producción de citoquinas proinflamatorias como IFN-γ y TNF-α, lo que evidencia su capacidad de modular la respuesta inflamatoria de manera no exclusivamente antiinflamatoria (Mannino *et al.,* 2015).

En conjunto, la IL-10 ejerce un control sobre la respuesta inflamatoria inicial y sobre los efectores tempranos, evitando su persistencia y favoreciendo la resolución (Moore *et al.,* 2001). Sin embargo, también presenta propiedades inmunoestimuladoras, como la potenciación de la función de linfocitos B y la estimulación de linfocitos T citotóxicos (Bagheri *et al.,* 2019; Oft, 2019).

2.2.2 b) II Rol de IL-10 en contextos de IS

El conocimiento de los efectos individuales de la IL-10 permite comprender su rol en el contexto de distintas patologías, siendo una de las herramientas más relevantes para su estudio el uso de modelos murinos, particularmente ratones transgénicos deficientes o knock-out para esta citoquina.

Los ratones knock-out para IL-10 no presentan al momento del nacimiento alteraciones en la capacidad de generar células T ni B, por lo que inicialmente son capaces de montar una respuesta inmune adecuada. Sin embargo, hacia los cuatro meses de vida desarrollan anemia y retraso en el crecimiento, culminando en muerte prematura en comparación con sus contrapartes wild type (Rennick, *et al.,* 1995). Este fenotipo se correlaciona con un infiltrado de linfocitos, macrófagos y neutrófilos en la mucosa intestinal, acompañado de una disminución en la producción de moco, hiperplasia de criptas intestinales y ulceraciones multifocales (Madsen *et al.,* 2003). Además, se observa desorganización de los tejidos linfoides asociados, aumento del tamaño de los ganglios linfáticos mesentéricos y esplenomegalia. En conjunto, estos efectos deletéreos resultan de un desbalance en la respuesta inflamatoria, con un predominio del perfil Th1, caracterizado por la producción de citoquinas

proinflamatorias y un intenso reclutamiento celular (Madsen *et al.,* 2003; Zigmond *et al.,* 2014).

Más allá de esta inflamación espontánea que sufren los animales deficientes en IL-10, estos modelos han sido ampliamente empleados para estudiar el papel de dicha citoquina en diversas enfermedades infecciosas (González *et al*., 2021; Guo *et al.,* 2021; McKelvey *et al.,* 2024).

Por ejemplo, en modelos de shock endotóxico, los ratones *knock-out* para IL-10 muestran una mayor mortalidad tras la inoculación con endotoxina, junto con niveles elevados de TNF-α, IL-1β, IL-6, IL-12, IFN-γ y nitratos (Berg *et al*., 1995). Por otro lado, la administración de IL-10 recombinante antes de la inyección de una dosis letal de LPS reduce de manera significativa los niveles de TNF-α y previene la letalidad (Gerard *et al.,* 1993). De manera similar, en humanos, la administración de IL-10 recombinante disminuye la fiebre, las concentraciones plasmáticas de TNF-α, IL-6 e IL-8 y la activación del sistema de coagulación (Pajkrt *et al*., 1997). Estos hallazgos evidencian que la IL-10 endógena constituye un importante mecanismo autorregulador que modula la producción de citoquinas proinflamatorias y controla la toxicidad de las endotoxinas.

En contraste, Muenzer y colaboradores, utilizando un modelo de CLP (del inglés: *Cecal Ligation and Puncture*), que permite el estudio de las etapas tardías de la sepsis, demostraron que el bloqueo de la síntesis de IL-10 durante la fase de IS mejora la respuesta inmune y la supervivencia (Muenzer *et al.,* 2010). Esto sugiere que la liberación continua de IL-10 podría contribuir a la IS inducida por sepsis y, por ende, incrementar la susceptibilidad a infecciones secundarias. De hecho, un estudio prospectivo realizado en 1089 pacientes demostró que la persistencia de niveles elevados de IL-10 aumenta el riesgo de infecciones secundarias en aquellos pacientes que permanecen hospitalizados por más de cuatro días (Van Vught *et al*., 2017).

En definitiva, el impacto global de la IL-10 sobre el hospedador depende del contexto. Ante una respuesta inflamatoria exagerada, su actividad resulta beneficiosa al atenuar la inflamación y proteger los tejidos. Sin embargo, en un

escenario inmunológico distinto, donde la respuesta inmune es predominantemente protectora, un exceso de IL-10 puede atenuar la respuesta y resultar perjudicial, promoviendo una incapacidad para eliminar la infección y favoreciendo la cronicidad. Por lo tanto, la regulación inmune mediada por IL-10 constituye un arma de doble filo, actuando en beneficio del hospedador en algunos casos, pero resultando perjudicial en otros (Howes *et al.,* 2014).

En este sentido, aunque el papel antiinflamatorio de la IL-10 como mediador de la homeostasis inmunológica se encuentra bien caracterizado, su participación en los cuadros de IS inducidos por sepsis aún no está del todo esclarecida. Los mecanismos responsables de la IS en el contexto de sepsis permanecen poco definidos. Así, el papel de los mediadores antiinflamatorios e inmunosupresores, como la IL-10 y los GC, y su relación con la expansión de las células mieloides aún no se ha dilucidado completamente. Además, dado que la mayoría de los estudios se ha centrado en analizar estos mediadores de manera aislada, el objetivo de este trabajo es evaluar el papel de la IL-10, su interacción con los GC y su impacto sobre las células mieloides en el contexto de IS inducida en cuadros de sepsis.

Hipótesis y Objetivos

La OMS en su último reporte informó que las muertes asociadas a sepsis representan el 20% de todas las defunciones a escala mundial; esto convierte a la sepsis en una importante amenaza para la salud pública, motivo por el cual, oficinas regionales de la OMS actualmente se encuentran trabajando en colaboración y coordinación proporcionando orientación y apoyo a diferentes países sobre la prevención de la sepsis, el diagnóstico temprano y apropiado y el tratamiento clínico oportuno y apropiado (OMS, 2020).

Esta compleja patología puede ser causada por diversos agentes infecciosos, tales como bacterias, virus, parásitos y hongos. En la actualidad las infecciones bacterianas se posicionan como la causa más común de sepsis, particularmente las originadas por bacterias gram-negativas (Dyck *et al*., 2024). En estas, las endotoxinas -LPS- juegan un rol central en la respuesta desencadenada por el hospedador. En primer lugar, el LPS induce una rápida secreción de mediadores pro y antiinflamatorios que, finalmente, concluyen en un estado de tolerancia a LPS o tolerancia a endotoxinas, donde se genera un estado refractario a ulteriores efectos inflamatorios inducidos por LPS, u otros agentes inflamatorios (Biswas *et al.,* 2009).

La evidencia actual indica que la tolerancia a LPS se asocia con una evolución clínica desfavorable en pacientes con sepsis, observándose una correlación directa con una mayor incidencia de infecciones secundarias. Mientras que en el pasado se consideraba a la tolerancia como una respuesta adaptativa beneficiosa para el hospedador, hoy se reconoce como un componente clave de la desregulación inmune, siendo una de las principales causas de la inmunosupresión inespecífica (IS) reportada en pacientes sépticos, con un rol central en la susceptibilidad a infecciones secundarias (López-Collazo *et al.,* 2024).

La integración de los conceptos de sepsis/tolerancia/ IS permiten considerar a la tolerancia a LPS como un evento crucial en la fase inicial para instalar la IS durante el curso de una sepsis (Rearte *et al*., 2010; Cavaillon *et al.,* 2006; Seeley *et al.,* 2017). Experimentalmente la tolerancia a LPS se puede inducir mediante la inoculación diaria (2 a 3 días) de dosis bajas de LPS (1-5 µg) que

conducen al hospedador a un estado refractario frente a un desafío posterior con una dosis letal de LPS (150-200 µg). Establecer un estado de IS inducido por LPS se hace evidente mediante un esquema más largo con inoculaciones diarias y dosis crecientes de LPS (10 a 12 días) (Rearte, Maglioco *et al*., 2010).

En este fenómeno de tolerancia y/o IS participan diversos agentes entre los que se encuentran las citoquinas antiinfamatorias como la IL-10 y el TGF-β, como así también los glucocorticoides (GC). La participación de los GC ha sido y continúa siendo motivo de controversias, sin embargo, existe evidencia de su participación como mediador activo en los fenómenos de IS (Cain *et al.,* 2017; Ehrchen *et al.,* 2019). La desactivación de monocitos se ha identificado como un factor importante de IS en sepsis y se asocia con la pérdida en la expresión del HLA-DR en la superficie de monocitos circulantes. En este sentido, mediante ensayos *in vitro* Le Tulzo y colaboradores demostraron que los GC disminuyen la expresión de HLA-DR a nivel transcripcional. Además, reportaron en pacientes sépticos que, tanto la disminución de la expresión de HLA-DR como los niveles elevados de GC, muestran una correlación con un mayor *score* de gravedad, infecciones secundarias y muerte (Le Tulzo *et al.,* 2004). En línea con esto, resultados previos del laboratorio demostraron que la inhibición de la actividad endógena de los GC desempeña un papel importante en la restauración de la respuesta inmune humoral y celular en ratones con un cuadro de IS inducido por LPS, lo que evidencia la participación crucial de los GC endógenos en este fenómeno (Rearte, Maglioco *et al*., 2010; Rearte, Lndoni *et al.,* 2010; Rearte *et al*., 2014).

Por lo tanto, resulta de gran interés extender estos estudios hacia otros mediadores que han sido considerados factores relevantes en la instalación de la depresión inmune, como es el caso de las citoquinas anti-inflamatorias, en particular la IL-10, conocida por sus propiedades tanto antiinflamatorias como inmunosupresoras (Howes *et al.,*2014). Niveles elevados de IL-10 se han reportado en pacientes sépticos y se han asociado con un peor pronóstico de la enfermedad (Van Vught *et al*., 2017; Zhang *et al.,* 2022; Abe *et al.,* 2008). En este sentido, Muenzer y colaboradores demostraron, en un modelo experimental de sepsis por CLP, que el bloqueo de la síntesis de IL-10

mediante el compuesto AS101, mejora la respuesta inmune y la sobrevida de los animales, lo que pone en evidencia el rol central de esta citoquina en los eventos de disfunción/depresión inmune (Muenzer *et al.*, 2010).

Sin embargo, también existen controversias respecto a la relevancia de la IL-10 en los procesos de IS, en gran parte vinculadas al momento en que se evalúa su efecto. Esta complejidad queda reflejada en el trabajo de Kalechman y colaboradores, quienes utilizando un modelo de CLP murino observaron que el bloqueo de la IL-10 previo a la inducción de la sepsis disminuye la sobrevida de los ratones, mientras que el mismo tratamiento aplicado 12 horas posteriores a la inducción de la sepsis aumenta significativamente dicha sobrevida (Kalechman, *et al*., 2002). Estos resultados resaltan la importancia de considerar que un mismo proceso puede estar conformado por fases funcionalmente diferenciadas - en este caso, inducción y mantenimiento de la IS - en las que un mismo mediador puede ejercer efectos opuestos dependiendo del momento del cuadro. Tal es también el caso de los GC, para los cuales estudios previos del laboratorio demostraron que pueden ejercer efectos divergentes en función del momento temporal de su intervención (Rearte, Landoni *et al*., 2010).

En base a estos antecedentes, se propone evaluar la relevancia y participación de la IL-10 en un contexto de shock endotóxico y de IS inducido por LPS, analizando además su posible relación con los GC a fin de determinar si sus efectos se ejercen de manera independiente o sinérgica. Este abordaje permitiría comprender y evaluar la relevancia y jerarquización de los agentes en cuestión en el fenómeno de estudio.

1. Hipótesis

En la patogenia de la sepsis, la interrelación entre mediadores antiinflamatorios como la IL-10 y los glucocorticoides cumpliría un rol clave modulando de manera diferencial la respuesta inmune según el estadio evolutivo del proceso. En etapas tempranas, dicha interacción contribuiría al control y/o modulación

de las respuestas hiper-inflamatorias, mientras que, en etapas tardías, participarían en el establecimiento y mantenimiento de un estado de inmunosupresión. Esta interacción funcional podría favorecer la expansión y/o el acondicionamiento de poblaciones mieloides con fenotipo inmunosupresor, promoviendo así la persistencia del estado inmune deprimido. En este sentido, la interrelación funcional entre IL-10 y glucocorticoides resultaría crítica para la regulación del balance entre inflamación y tolerancia/inmunosupresión durante la evolución del cuadro séptico.

2. Objetivo de la investigación

A fin de poner a prueba la hipótesis planteada, el objetivo general de este trabajo consistió en estudiar la implicancia e interrelación entre la IL-10 y los GC en la patogenia de la sepsis. Para ello, se utilizaron modelos murinos inducidos por LPS que recapitulan diferentes estadios de la inmunopatología. El modelo de shock endotóxico simula etapas tempranas de la sepsis, el modelo de tolerancia/IS recapitula etapas tardías de la sepsis y el modelo de infección permite evaluar la susceptibilidad a infecciones secundarias, evento asociado a los contextos tardíos de inmunosupresión. Todos los modelos fueron desarrollados en ratones *knock out* para IL-10 (KO) y sus respectivos controles *wild type* (WT), lo que permitió analizar comparativamente el impacto de la ausencia de esta citoquina.

2.1 Objetivos especifico

2.1.1 Modelo de shock endotóxico

Objetivo 1: Determinar el rol de la IL-10 en estadios tempranos de la sepsis. Evaluar su participación y su interrelación con los GC.

a- Evaluación de la cinética de citoquinas proinflamatorias y antiinflamatorios en plasma luego del desafío con LPS.
b- Evaluación de marcadores de daño tisular e histopatología hepática y

renal luego del desafío con LPS.

c- Determinación de los niveles de GC endógenos y evaluación del tratamiento con un GC exógenos (dexametasona) previo al desafío con LPS.

2.1.2 Modelo de tolerancia/IS inducido por LPS

Objetivo 2: Determinar la participación de la IL-10 en la instalación y mantenimiento de la inmunosupresión en estadios tardíos de la sepsis. Evaluar su relevancia y su posible relación con los GC.

a- Evaluación del establecimiento del fenómeno de tolerancia /IS.

b- Determinación de parámetros inmunológicos que caractericen el modelo de tolerancia/IS.

c- Evaluación de la contribución de los GC en el montaje y mantenimiento del fenómeno de tolerancia/IS.

d- Estudio fenotípico y funcional de poblaciones celulares en diferentes compartimentos y su implicancia en el cuadro de tolerancia/IS.

2.2.3 Modelo de infección por *S. aureus*

Objetivo 3: Evaluar del rol de la IL-10 en la susceptibilidad a infecciones bacterianas durante estadios tardíos de la sepsis con signos de IS.

a- Evaluar la capacidad de *clearance* bacteriano luego de una infección pulmonar por *S. aureus* en un estado de IS.

b- Caracterizar las poblaciones mieloides en compartimento pulmonar luego de la infección por *S. aureus* en un estado de IS.

Materiales y métodos

1. Reactivos

1.1 Solución *Buffer* Fosfato (PBS)

La solución fue preparada con NaCl 0,138 M; KCl 0,027M; Na_2HPO_4 0,078M y $KHPO_4$ 0,015 M; ajustando el pH = 7,4.

1.2 Solución de Türk

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.

1.3 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).

1.4 *Buffer* de lisis de eritrocitos

Se preparó una solución $ClNH_4$ 0.15M; $NaHCO_3$ 10mM; EDTA 0.1mM en H_2O estéril. Se ajustó pH a 7,3. Se guardan a -20 °C hasta su uso.

- En bazo se agregan 2ml por *pellet* y se incuba por 5 minutos en hielo. Transcurrido el tiempo se frena la reacción por el agregado de SF-SFB10% hasta completar el volumen en tubos de 15 ml.

- En médula ósea se agrega 1ml a 500µl de suspensión celular (no se adiciona directamente sobre el *pellet)* y se incuba durante 2 minutos en hielo. Luego se frena la reacción por el agregado de SF-SFB10% hasta completar el volumen en tubos de 15 ml.

1.5 Medio de cultivo completo

Se empleó medio de cultivo RPMI 1640 (GIBCO, Invitrogen, Argentina) inactivado por calentamiento a 56ºC durante 30 minutos, suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) (GIBCO, Invitrogen, Argentina), penicilina estreptomicina (Penicilina G 10.000 U/ml; Sulfato de estreptomicina 10.000 µg/ml en 0,85% de solución fisiológica) (GIBCO, Invitrogen, Argentina) y β-mercaptoetanol 50mM.

1.6 Paraformahldeído 4% (PFA)

La solución fue preparada bajo campana de seguridad disolviendo 4g de paraformaldehído puro en 90ml de H_2O a 60ºC. Luego se adicionó 10 ml de PBS10X se ajustó el pH a 7,4 y por último se filtró la solución.

1.7 Anticuerpos para citometría de flujo

El siguiente panel de anticuerpos monoclonales fue utilizado en sangre y en suspensiones celulares de bazo, médula ósea y pulmón.

Tabla 1: Anticuerpos monoclonales utilizados para el análisis de citometría de flujo

Anticuerpo	Especie que reconoce	Conjugado	Cantidad (µg)	Fabricante
CD11b	ratón	FITC	0,8	BD-Pharmingen
Ly6G	ratón	PE	0,7	BD-Pharmingen
Ly6C	ratón	PE-Cy5	0,7	BD-Pharmingen
CD4	ratón	FITC	0,8	BD-Pharmingen
CD8	ratón	PE	0,6	BD-Pharmingen
B220	ratón	APC	0,7	BD-Pharmingen
PDL-1	ratón	PE	0,8	eBio
TNFRI	ratón	FITC	0,8	BD-Pharmingen
TNFRII	ratón	PE	0,8	BD-Pharmingen

FITC (isotiocianato de fluoresceína), PE (ficoeritrina), APC (Aloficocianina), PECy5 (Ficoeritrina-Cianina5).

2. Animales

En este estudio se utilizaron ratones provenientes de dos bioterios:

1) Ratones de la cepa BALB/c *wild type* (WT) provistos por el Bioterio del Instituto de Medicina Experimental, Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires, Argentina.
2) Ratones deficientes de IL-10 *background* BALB/c (C.129P2 (B6)-IL10 tm1Cgn/J) (KO) y ratones BALB/c WT provistos por el Bioterio de la Fundación Instituto Leloir, Buenos Aires, Argentina.

Se utilizaron ratones de ambos sexos de entre 12-16 semanas. Alojados de a 4-6 ratones por jaula con viruta y material para enriquecer el ambiente. Todos fueron criados en condiciones de luz y temperatura estándar con un ciclo de 12 horas luz-oscuridad a 22 ± 2ºC con comida y agua administrada *ad limitum*. Los experimentos realizados en esta tesis fueron desarrollados de acuerdo a los principios establecidos por la Guía para el Cuidado y el Uso de Animales de Laboratorio (Carbone, 2012) y aprobados por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (Protocolo Nº 068/2019).

Estímulos utilizados en ensayos *in vivo*

a) Lipopolisacárido (LPS) de *Escherichia coli* O111:B4 (Sigma-Aldrich; St Louis, MO, USA); preparado en solución fisiológica.

b) Mifepristone [RU486-17-hidroxi-11-(4-dimetilaminofenil) 17-(1-propinil) estra-4,9-dieno-3-ona] (Sigma-Aldrich; St Louis, MO, USA).

c) Glucocorticoide sintético dexametasona (DEX; Decadrón Shock; fromSidus 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).

d) Glóbulos rojos de carnero (GRc) (Alfredo Gutierrez®; Bs As, Argentina).

e) Inoculo inicial de $1*10^7$ UFC de *Staphylococcus aureus* (ATCC® 25923™) gentilmente cedida por la Dra. Gabriela Fernández (IMEX- Academia nacional de Medicina-CONICET).

El LPS, los glóbulos rojos de carnero y la bacteria *Staphylococcus aureus* fueron preparado en solución fisiológica libre de pirógeno. El mifepristone fue preparado en propilenglicol a 37°C y la dexametasona pura y Dex-3H fueron preparadas en etanol.

2.1 Modelo de shock endotóxico

Los ratones fueron inoculados vía intraperitoneal con 100 µg/ratón de LPS. A diferentes tiempos después de la exposición al LPS (0; 1,5; 3 y 6 horas) se tomaron muestras de sangre por punción submandibular para la obtención de plasma. En el grupo control los animales fueron inoculados con PBS (grupo sin tratamiento previo). Luego de 6 horas de la exposición al LPS se realizó la eutanasia de los animales mediante dislocación cervical y se extrajo el hígado y los riñones para el análisis histológico.

2.1.1 Estudios de letalidad

Ratones WT y KO fueron inoculados por vía intraperitoneal a diferentes dosis de LPS. Dosis decrecientes de LPS, comenzando desde la dosis letal para los ratones WT (2 LD50 = 200 µg/ratón) seguida de 100 µg/ratón, 50 µg/ratón, 10 µg/ratón, 5 µg/ratón, 1 µg/ratón y 0,25 µg/ratón. La mortalidad se evaluó hasta 72 horas después de cada dosis, considerando la eutanasia por inhalación de CO_2 como punto final experimental determinado por la evaluación del *score* clínico.

2.1.2 Pretratamiento con dexametasona (DEX)

Los ratones fueron pretratados con DEX un glucocorticoide sintético (62,5 µg/ratón, intraperitoneal) o PBS, 20 minutos antes de la inoculación con LPS (5, 50 o 200 µg/ratón, intraperitoneal). 90 minutos después del LPS, se obtuvieron muestras de sangre para obtener plasma y se evaluó la mortalidad durante 72 horas.

2.2 Modelo de inmunosupresión inducido por LPS

Debido a que la inmunosupresión es un efecto cuantitativo que depende del número de dosis y la concentración de las inoculaciones de LPS. Se desarrolló un modelo tal que muestre signos de inmunosupresión y además sea tolerable en ratones KO, este consistió en el tratamiento con dosis crecientes de LPS durante 10 días consecutivos. Ratones KO y WT fueron inocularon con LPS vía intraperitoneal con las dosis indicadas en la Tabla 2. En el grupo control ratones KO y WT fueron inoculados durante 10 días consecutivos con PBS.

Tabla 2: Esquema de inmunosupresión realizado en ratones WT y KO

Días	LPS (µg/ml)	Dosis (µg/ratón)
1-2	2,5	0,25
3-4	5	0,5
5-6	10	1
7-8	50	5
9-10	100	10

2.2.1 Tratamiento con mifepristona (RU486)

2.2.1 A) Mantenimiento de la inmunosupresión:

Ratones KO y WT inmunosuprimidos se inocularon con RU486 (300 µg/dosis/ratón, vía subcutánea) 24 horas después de la última dosis de LPS. Treinta minutos más tarde, cada grupo fue desafiado con su dosis letal de LPS

(200 µg/ratón para WT y 10 µg/ratón para KO). El grupo de ratones control fue tratado con propilenglicol (vehículo del RU486) y 30 minutos después, fueron expuestos a la dosis letal de LPS. La mortalidad se evaluó hasta 48 horas después del tratamiento, considerando la eutanasia por dislocación cervical como punto final experimental determinado por la evaluación del *score* clínico.

2.2.1. B) Establecimiento de la inmunosupresión*:*

Los ratones WT y KO fueron inmunosuprimidos con el esquema descrito anteriormente, pero 30 min antes de cada dosis de LPS fueron tratados con RU486 (300 µg/dosis/ratón; vía subcutánea). Veinticuatro horas después de la última dosis de LPS, los animales fueron desafiados con la dosis letal de LPS correspondiente a cada cepa. El grupo de ratones control fue tratado con propilenglicol. La mortalidad se evaluó hasta 48 horas después del tratamiento, considerando la eutanasia por dislocación cervical como punto final experimental determinado por la evaluación del *score* clínico.

2.3 Modelo de infección con *Staphylococcus aureus* en un estadio de inmunosupresión inducido por LPS

2.3.1 Cultivo bacteriano

Se utilizó la bacteria gram-positiva *Staphylococcus aureus* (ATCC® 25923™) que fue gentilmente cedida por la Dra. Gabriela Fernández (IMEX- Academia nacional de Medicina-CONICET). La bacteria fue cultivada en 1ml caldo tripteína de soja (TSB) en placas de 6 *wells* e introducida en el *Varioskan LUX Multimode Microplate Reader* (*Thermo Fisher Scientific*) donde se establecieron las condiciones para realizar la determinación de la curva de crecimiento (Figura 1A). Condiciones de cultivo: con agitación; temperatura: 37°C; determinación de la densidad óptica (DO): 600nm; intervalo de medición: 15 minutos; duración total: 7 horas. Luego se seleccionó el rango de crecimiento exponencial donde se tomaron alícuotas a diferentes tiempos. Estas fueron

cultivadas en placas de agar tripteína de soja (TSA) e incubadas durante 24 horas en estufa a 37°C. Sobre estas placas se realizó el recuento de unidades formadoras de colonias (UFC). Por último, se realizó la regresión lineal entre la densidad óptica (DO) y las UFC (Figura 1B y C).

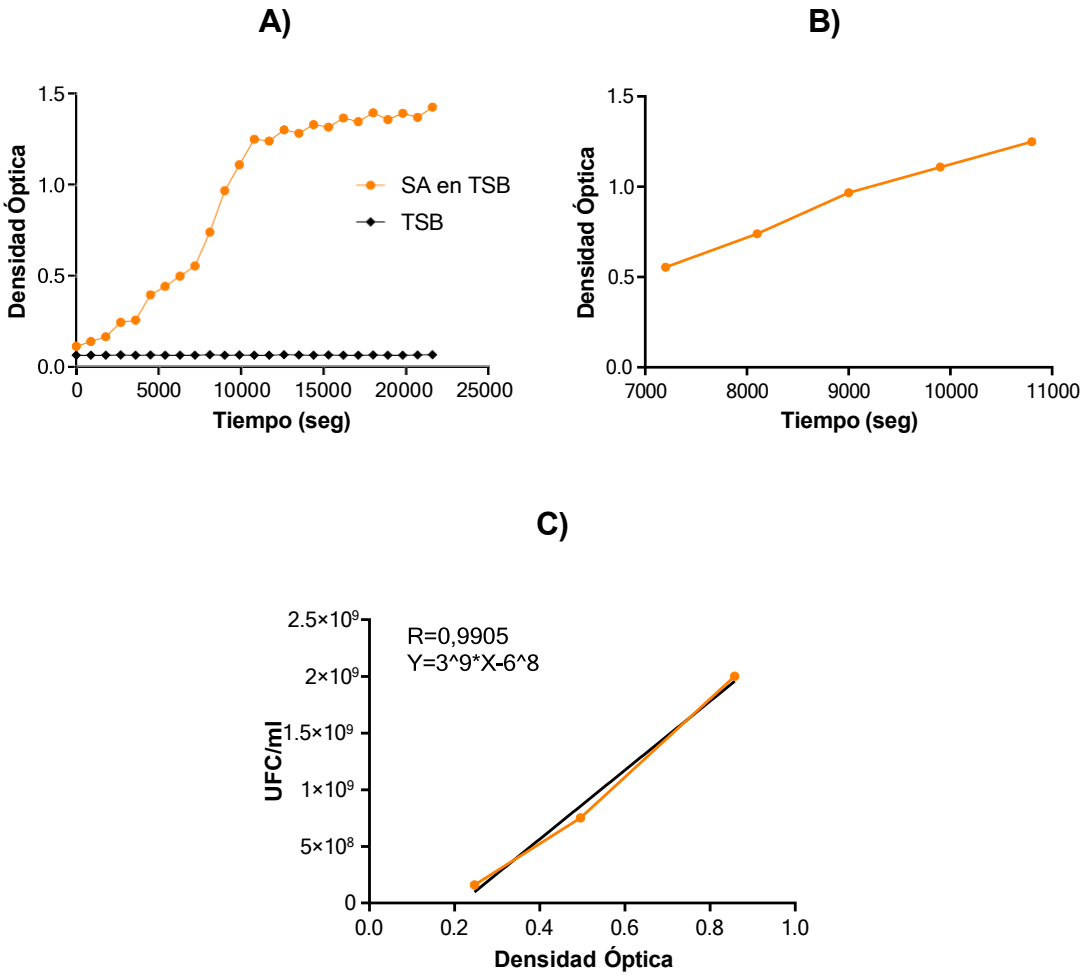


Figura 1: Preparación de *Staphylococcus aureus* (SA) para la infección. A) Cinética del crecimiento de SA cultivada durante 7 horas en TSB a 37°C en agitación. **B)** Fase exponencial de crecimiento. **C)** Regresión lineal de las unidades formadores de colonias (UFC/ml) en función de la densidad óptica. Ecuación de la recta que permite la determinación del inoculo inicial.

2.3.1 A) Preparación del inoculo inicial:

De una placa de TSA stock se tomó con un ansa estéril una colonia y se la colocó en un tubo, de 50ml, con 5 ml de TSB. Este se incubó en la estufa a 37 °C, en agitación durante toda la noche. A día siguiente se tomaron 100 µl del cultivo y se los adicionó a un nuevo tubo con 4900 µl de TSB fresco, éste se colocó nuevamente en la estufa y se lo dejó incubando 110 minutos hasta obtener un DO_{600nm}=0,442 que equivale a $1,72*10^8$ UFC. Para obtener la solución madre se tomó 1 ml del cultivo y se lo centrifugó a 13000g durante 5 minutos. Luego se descartó el sobrenadante y se resuspendió el *pellet* en 850 µl de SF.

2.3.1 B) Infección mediante instilación intranasal

Ratones WT y KO inmunosuprimidos 24 horas después de finalizar el esquema de inmunosupresión, fueron anestesiados por vía inhalatoria con 100 µl de isofluorano en cámara cerrada. Luego se realizó la infección bacteriana con $1*10^7$UFC de *Staphylococcus aureus* administrada en 50 µl mediante instilación intranasal, 25 µl en cada narina. Luego de 24 horas de la infección se realizó la eutanasia de todos los animales mediante dislocación cervical y se extrajeron en esterilidad los pulmones.

3. Obtención de suspensiones celulares

3.1 Sangre

Tras la eutanasia de los animales, las células sanguíneas fueron obtenidas mediante enucleación ocular en tubos heparinizados. Se tomaron 100 µl de muestra y se realizó la lisis de los eritrocitos mediante la adición de 900 µl de H_20 durante 30 segundos y luego 100 µl de PBS10X. Tras la lisis se realizó un lavado y sobre el *pellet* obtenido se procedió a la inmunomarcación de superficie celular.

3.2 Bazo

Los bazos fueron removidos se registró el peso del órgano y en condiciones de esterilidad fueron disgregados mediante el pasaje a través de una malla estéril con SF-SFB10% a fin de obtener una única suspensión celular. Luego las células fueron lavadas con SF-SFB10% y se centrifugaron a 500g por 10 minutos. El *pellet* celular fue resuspendido y se lisaron los eritrocitos mediante la adición de *buffer* de lisis (Sección 1.4). Tras la lisis se realizó un lavado y el *pellet* obtenido se resuspendió en un 1 ml de medio completo. Posteriormente se procedió al recuento de las células viables con Tripán (Sección 1.3) para utilizar en cultivo y/o para la inmunomarcación de superficie celular.

3.3 Pulmón

Los pulmones fueron removidos se registró el peso del órgano y en condiciones de esterilidad fueron disgregados mediante el pasaje a través de una malla estéril con SF a fin de obtener una única suspensión celular. Luego las células se centrifugaron a 500g por 10 minutos. El *pellet* celular fue resuspendido y se lisaron los eritrocitos mediante la adición de 900 µl de H_20 durante 30 segundos y luego 100 µl de PBS10X. Tras la lisis se realizó un lavado y el *pellet* obtenido se resuspendió en un 1 ml de SF. Posteriormente se tomaron 100 µl suspensión para la inmunomarcación de superficie celular.

3.4 Médula ósea

Los animales fueron sacrificados y se realizó la extracción de fémur y tibia para la obtención de células a partir de médula ósea. Las células fueron eluidas mediante el lavado del canal medular con PBS y posteriormente centrifugadas durante 10 minutos a 500 g. El sobrenadante se descartó y sobre el *pellet se* realizó la lisis de eritrocitos con *buffer* de lisis (Sección1.4). Tras la lisis se realizó un lavado y el *pellet* obtenido se resuspendió en un 1 ml de medio completo. Posteriormente se procedió al recuento de las células viables con Tripán (Sección 1.3) para utilizar en cultivo y/o para la inmunomarcación de superficie celular.

4. Inmunomarcación de moléculas de la superficie celular

Para la identificación de las células presentes en sangre, médula ósea, bazo y pulmón se realizó la tinción de antígenos de superficie y posterior análisis por citometría de flujo. Las suspensiones celulares provenientes de los diferentes órganos se centrifugaron durante 5 minutos a 500g a 4ºC, luego se descartó el sobrenadante y sobre el *pellet* se agregó el *mix* de anticuerpos fluorescentes (Tabla 1) así fueron incubados en oscuridad a 4ºC durante 40 minutos. Al finalizar la incubación se realizó un lavado con 1 ml de PBS frío y se centrifugó durante 5 minutos a 500g a 4ºC. Finalmente, las células se resuspendieron en 150 µl de isoflow y se adicionó 50 µl de paraformaldehído al 0,5% para su fijación. Las muestras fueron conservadas en oscuridad a 4°C hasta su análisis por citometría de flujo.

4.1 Células mieloides

La marcación específica para la detección de células mieloides presentes en sangre, bazo, médula ósea y pulmón se realizó mediante la utilización de los anticuerpos antiCD11b, anti-Ly6G y anti-Ly6C, que permiten identificar dos subpoblaciones: las células mieloides tipo granulocítica ($CD11b^{+}/Ly6G^{+}/Ly6C^{low}$) y monocítica ($CD11b^{+}/Ly6G^{-}/Ly6C^{higt}$). Se calculó el número absoluto y el porcentaje de cada población respecto al total de células para cada animal.

4.2 Células linfoides

En las suspensiones celulares de sangre y bazo se determinó además la presencia de las distintas poblaciones de linfocitos utilizando los anticuerpos anti-CD8, anti-CD4 y anti-B220. Para linfocitos T $CD4^{+}$ o $CD8^{+}$ y para linfocitos B $B220^{+}$. Se calculó el número absoluto y el porcentaje de cada población de linfocitos respecto al total para cada animal.

4.3 Determinación de los receptores del TNF-α en leucocitos sanguíneos

En la suspensión celular de sangre se determinó la expresión de los receptores de TNF-α con anticuerpos anti-TNF-RI y anti-TNF-RII. La expresión de los receptores del TNF-α se analizó en diferentes poblaciones de leucocitos definiendo las poblaciones según tamaño y complejidad celular en el citómetro de flujo, utilizando el grafico de puntos (FSC vs SSC). Se calculó el porcentaje de células que expresan determinado receptor en las diferentes poblaciones para cada animal.

4.4 Condiciones de adquisición de eventos celulares por citometría de flujo

Las muestras fueron adquiridas en un citómetro Becton Dickinson FACScan (BD Biosciences) del IMEX-Academia Nacional de Medicina-CONICET. Los datos fueron analizados utilizando el software CellQuest (Becton Dickinson, San José, CA). Los resultados del análisis de citometría de flujo fueron expresados como el porcentaje y/o el número absoluto de células que resultaron positivas para el marcador de superficie evaluado.

5. Cultivo celular

5.1 Ensayo de proliferación celular: Funcionalidad de linfocitos

Se aislaron $1*10^6$ esplenocitos suspendidos en 990 µl de RPMI-5%SFB-βMer a estos se les adicionaron 10 µl CFSE 5µM y se incubaron durante 20 minutos a 37°C. Luego se realizaron 6 lavados con 1 ml de SF con una incubación de 15 minutos a 37°C al tercer lavado. Finalmente las células marcadas se resuspendieron en 1 ml de RPMI-5%SFB-βMer. Se tomaron $3*10^5$ esplenocitos que fueron incubados en placas de 96 *wells*, fondo en U, en un volumen final de 200 µl de RPMI-5%SFB-βMer. Estimulados o no con Concanavalina A (ConA) 2µg/ml por 96 horas. Luego se realizó la adquisición por citometría de

flujo en donde se determinó la intensidad de fluorescencia en el canal FL1 (para la detección de CFSE) y se cuantificó el porcentaje de células de baja intensidad ($CFSE^{low}$).

5.2 Ensayo de proliferación celular: Funcionalidad de células mieloides

Esplenocitos de ratón controles, WT y KO, fueron co-cultivados con células de médula ósea de ratones KOIS en una proporción de Esplenocitos: Células de medula ósea (1:2). Los esplenocitos fueron marcados con CFSE utilizando el protocolo detallado anteriormente (Sección 5.1) previo al cultivo. Los cultivos se estimularon con ConA 2µg/ml y a las 72 horas las células fueron colectadas para la adquisición por citometría de flujo y posterior cuantificación de la proliferación como se describe en la Sección 5.1. Se utilizó como control positivo esplenocitos controles estimulados con ConA en presencia de células de médula ósea de ratones KO y WT.

6. Capacidad de *clearance*

6.1 Obtención de homogenato de pulmón

Tras la remoción de los pulmones, se registró el peso del órgano y en condiciones de esterilidad se disgregó mediante el pasaje a través de una malla estéril con SF a fin de obtener una única suspensión celular. Luego, la suspensión se centrifugó a 13000g por 5 minutos, se descartó el sobrenadante y sobre el pellet se lisaron las células eucariotas con agua, adicionando 900 µl de H_2O durante 3 minutos y luego 100 µl de PBS 10X. Tras la lisis, se lavó y se resuspendió el *pellet* en 100 µl de SF.

6.2 Recuento de UFC en homogenato de pulmón

A partir del homogenato de pulmón se realizan ocho diluciones seriadas 1/10 en SF. De estas diluciones se toman cuatro réplicas de 10 µl y se sembraron en placas de agar las cuales fueron incubdas en estufa a 37°C durante 24 horas.

Luego se retiraron las placas de la estufa y se realizó el recuento de UFC. En los resultados del recuento de bacteria viable se expresa el número de UFC relativizado al peso del pulmón en gramos.

7. Histopatología

7.1 Histología: Hematoxilina-eosina y ácido periódico-Schiff (PAS)

Para la recolección de muestras de hígado, riñones y glándulas suprarrenales, los animales fueron sacrificados mediante inhalación de CO_2. Los órganos se diseccionaron cuidadosamente, las glándulas suprarrenales se extrajeron completas, el hígado y el riñón decapsuladas. Todos los órganos se fijaron en PBS con formaldehído al 10% (pH 7,2); seguido de inclusión en parafina según el protocolo estándar (Giani *et al.*, 2011). Se obtuvieron cortes longitudinales de 3 µm de espesor de órganos incluidos en parafina. Mediante la técnica de rutina de hematoxilina-eosina y ácido periódico-Schiff (PAS) se colorearon cortes previamente desparafinados y rehidratados para la evaluación histológica del daño hepático y renal y la evaluación morfométrica de los cambios estructurales de la corteza suprarrenal inducidos por el tratamiento con LPS.

7.2 Inmunohistoquímica: TNF-α

Para la evaluación del estado proinflamatorio del tejido, se inmunomarcaron muestras de riñón e hígado, obtenidas como se describe en la sección 7.1. Los cortes fueron desparafinados con xileno, rehidratados mediante soluciones graduadas de etanol en agua y posteriormente incubados en una solución de bloqueo (PBS-1%SFB) a temperatura ambiente durante 1 hora. Luego, sobre los cortes se adiciono el anticuerpo primario: anticuerpo policlonal de cabra contra TNF-α de rata (Cat. #af-510-na, *R&D Systems, Minneapolis, MN*) en una dilución 1:400, en solución de bloqueo y se los dejó durante toda la noche a 4°C. Para los controles negativos los cortes fueron incubadas con PBS en lugar del anticuerpo primario. El inmunomarcaje de las muestras se llevó a cabo

utilizando la técnica de avidina-biotina-peroxidasa (*kit Vectastain ABC, Universal Elite, Vector Laboratories,* CA, EE. UU.) como se describió anteriormente (Toblli *et al.*, 2010). Brevemente, tras de la incubación con el anticuerpo primario los cortes se lavaron con PBS durante 5 minutos. Para la inhibición de la peroxidasa endógena los cortes se incubaron durante 30 minutos en peróxido de hidrógeno al 1% en metanol. Luego se realizó un lavado en PBS durante 20 minutos, tras el lavado los cortes se incubaron con solución de bloqueo durante 20 minutos. Posteriormente, los cortes fueron enjuagados en PBS y se incubaron con el anticuerpo universal biotinilado por 30 minutos. Después de lavar en PBS por última vez, los cortes se incubaron durante 40 minutos con el reactivo Vectastain Elite ABC (Vector *Laboratories,* CA, EE.UU) y finalmente se expusieron durante 5 minutos a diaminobencidina al 0,1% (*Polyscience*, Warrington, PA, EE. UU.) y peróxido de hidrógeno al 0,2 % en tampón Tris 50 mM (pH 8).

7.3 Microscopía y análisis histológico

Para la evaluación histomorfométrica, todas las observaciones se realizaron con un microscopio óptico, Nikon E400 (*Nikon Instrument Group*, Melville, Nueva York). Todas las mediciones se realizaron utilizando un analizador de imágenes Image-*Pro Plus* ver. 4.5 para Windows (Media *Cybernetics*, LP, *Silver Spring*, MD). Las muestras, riñón e hígado, se evaluaron en cada animal (n=6) en 10 campos microscópicos consecutivos con un aumento de 400x, donde cada campo representa 1,13 mm^2, lo que resultó en un área total explorada de 11,3 mm^2. La inmunolocalización del tejido TNF-α y tinción PAS^+ se expresó como porcentaje de área con tinción positiva TNF-α o PAS/mm^2. En la glándula suprarrenal todas las mediciones se realizaron en un conjunto de 5 cortes paralelos en serie tomados a través del centro de la glándula suprarrenal y perpendiculares a su lado plano (renal). Se realizó un análisis cuantitativo en un conjunto de al menos 4 imágenes aleatorias tomadas con un aumento de 200x de cada animal utilizando el software *Image J* (Institutos Nacionales de Salud, https://imagej.nih.gov/). Brevemente, las mediciones se realizaron trazando una línea paralela a la base de cada

imagen, identificando el punto medio de esta línea y luego marcando una línea perpendicular que abarca la zona *fasciculata* (zf, identificada morfológicamente) y luego se extiende hasta la zona medular y capsular bordes para abarcar el conjunto de la corteza suprarrenal (C). El ancho proporcional ocupado por la zf se calculó como la relación de estas líneas (es decir, zf:C) y se expresó como el porcentaje medio.

8. Recuentos de leucocitos

Las células sanguíneas obtenidas mediante punción submandibular en tubos heparinizados se contaron microscópicamente de manera diferencial (células mononucleares y polimorfonucleares) en una cámara de Neubauer con solución de Turk (*Merck, Kenilworth*, Nueva Jersey).

9. Determinaciones en plasma

9.1 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, TNF-α, IL-6 y TGF-β 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).

9.2 Medición de corticosterona

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).

9.3 Parámetros bioquímicos

Los niveles de alanina aminotransferasa (ALT), aspartato transaminasa (AST) y creatinina (Cre) se determinaron en plasma con un kit disponible comercialmente de BioTécnica (Varginha, Minas Gerais, Brasil) en un autoanalizador de química clínica MINDRAY BS-200E de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

9.4 Titulo de anticuerpos anti-GRC

9.4.1 Inmunización de los animales

Ratones WT y KO luego de 24 horas de finalizar el esquema de inmunosupresión fueron desafiados con glóbulos rojos de carnero ($1*10^8$ GRC/ratón i.p). Pasados cinco días de la inmunización, los animales fueron sacrificados por dislocación cervical y se recolectaron muestras de sangre por enucleación ocular en tubos no heparinizados. Las muestras de sangre se incubaron 10 minutos a 37°C hasta la formación del coagulo, luego se centrifugaron a 500 g durante cinco minutos y se recolectó el suero.

9.4.2 Ensayo de hemoaglutinación

Las muestras de suero de ratones inmunizados fueron inactivadas a 56°C por 30 minutos. Para la evaluación de la respuesta inmune 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 *wells* 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.

10. Análisis estadísticos

Los valores son expresados como la media ± error estándar de la media (SEM) de n observaciones. Los ensayos de ELISA y los parámetros bioquímicos fueron analizados utilizando un test Mann Whitney no pareado. Las diferencias entre grupos en los análisis de citometría y ensayos de proliferación fueron evaluadas mediante un análisis de la varianza (ANOVA) seguido por un test de comparación múltiple de Tukey o Bonferroni. En los casaos particulares donde se compararon solo dos grupos se utilizó el test t -*Student* no pareado. Para los estudios de sobrevida y mortalidad (vivo/muerto), se empleó el test exacto de Fisher (bilateral) en tablas de contingencia 2x2 para comparar diferencias entre grupos experimentales. Los valores p se ajustaron por múltiples comparaciones mediante la corrección de Bonferroni. Todas las pruebas se interpretaron de forma bilateral, considerando $p<0,05$ como significativo. Los análisis y gráficos se realizaron con el software *GraphPad Prism.*ver.7. y 8.0.1.

Resultados

1. Modelo de Shock endotóxico

En la sepsis de origen bacteriano una de las bacterias gram-negativas más frecuentemente aislada es la *Escherichia coli* (Dyck *et al*., 2024). En su membrana externa presenta como componente principal el LPS, gran glicoconjugado conformado por un dominio hidrofóbico que es el principal factor de virulencia. La mayoría de las moléculas bacterianas de LPS son termoestables y generan un fuerte estímulo proinflamatorio en el sistema inmunológico de los mamíferos. Debido a estas propiedades únicas, el LPS ha ganado considerable atención en el campo de la investigación básica ya que permite comprender la interacción hospedador-patógeno que facilita el proceso de infección (Farhana *et al.,* 2023).

La inoculación de LPS se utiliza ampliamente en modelos experimentales para recapitular la dinámica de la fisiopatología de la sepsis en distintos estadios. Los estudios que utilizan dosis letales de LPS muestran una cinética rápida y una inflamación extrema (Copeland *et al*., 2005). Sin embargo, el modelo de tolerancia al LPS que se induce mediante la exposición repetida a dosis subletales de LPS, se asemeja a una característica clave del sistema inmunológico innato en la sepsis humana, conocida como reprogramación leucocitaria. La reprogramación de leucocitos define una respuesta inmune que se asocia con una disminución en la producción de citoquinas proinflamatorias y la regulación negativa de la expresión de HLA-DR en la superficie de los leucocitos. Esta reprogramación de leucocitos también se puede detectar en ratones tolerantes a LPS (Biswas *et al.,* 2009b; Liu *et al*., 2019). Por lo tanto, los modelos experimentales inducidos por LPS son valiosos para explorar los mecanismos tempranos de inflamación excesiva y los mecanismos a largo plazo desde la inflamación excesiva a la IS en la sepsis (Wang *et al*., 2022).

Como se describió previamente en la introducción, la IL-10 es una citoquina que desempeña un papel crucial en la homeostasis inmune. Es expresada por muchas células del sistema inmune adaptativo, incluidos los linfocitos T_H1, T_H2 y T_H17, T_{Reg}, $TCD8^+$ y linfocitos B. Además, de células del sistema inmune innato, incluidas células dendríticas, macrófagos, mastocitos, NK, eosinófilos y

neutrófilos. Su función característica es la inducción a una respuesta antiinflamatoria mediada por el receptor de IL-10 (IL-10R) que limita las funciones efectoras de macrófagos, células dendríticas y la posterior activación de células T. Además, induce un circuito de retroalimentación positivo al promover la diferenciación de células T_{Reg} que secretan aún más IL-10. De esta forma, la IL-10 puede reprimir las respuestas proinflamatorias y limitar las alteraciones tisulares causadas por la inflamación (Saraiva *et al.,* 2010).

Durante la sepsis, la resolución de la infección requiere de una respuesta coordinada en la que los mecanismos proinflamatorios iniciales, desencadenados para contribuir a la eliminación del patógeno, son modulados negativamente por agentes antiinflamatorios como la IL-10, antes de que tengan lugar las lesiones tisulares. En consecuencia, la IL-10 con sus múltiples funciones puede limitar la respuesta inmune al patógeno y mejorar la inmunopatología en etapas tempranas (Peñaloza *et al*., 2018; Ouyang *et al.,* 2019). Sin embargo, su participación en etapas tardías aun es esquivo.

En base a lo recién expuesto en la primera sección de este trabajo se abordó el estudio de la fisiopatología de la sepsis en un modelo que permite estudiarla de forma discreta, en principio se analizó una etapa temprana, proinflamatoria o de shock endotóxico inducido por LPS y en la siguiente sección se abordó una etapa tardía, de tolerancia o IS inducida por LPS.

Así, en primer lugar, se evaluó la sensibilidad de ratones deficientes de IL-10 (KO) frente a una dosis de LPS administrando diferentes concentraciones de endotoxina como única dosis a distintos grupos de ratones WT y KO. Se analizó la evolución de los diferentes grupos hasta 24 horas después del desafío, observando que una dosis de 200µg/ratón resultó letal para ambos grupos, mientras que una dosis de 1 µg/ratón solo resultó letal para los ratones KO. Evidenciando así que los ratones KO presentan una exacerbada sensibilidad al LPS, siendo 200 veces más sensibles que ratones WT (Figura 1).

En relación con esta marcada sensibilidad es que se evaluó la cinética de diferentes mediadores pro/antiinflamatorios asociados a un shock endotóxico

en ausencia de IL-10. Así los ratones fueron desafiados frente a una dosis letal 50 de LPS, DL50=100µg/ratón, y a distintos tiempos se evaluaron en plasma citoquinas proinflamatorias como TNF-α, IFN-γ, IL-6 e IL-12 y citoquinas antiinflamatorias como IL-10 y TGF-β.

A)

Tasa de sobrevida (%)			
Dosis LPS (µg/ratón)	**WT (n=10)**	**KO (n=10)**	***p* (Test exacto de Fisher)**
0.25	100	100	1
0.5	100	70	0,8491
1	100	0	0,0008****
5	100	0	0,0008****
10	100	0	0,0008****
50	100	0	0,0008****
100	54	0	0,095
200	0	0	1

B)

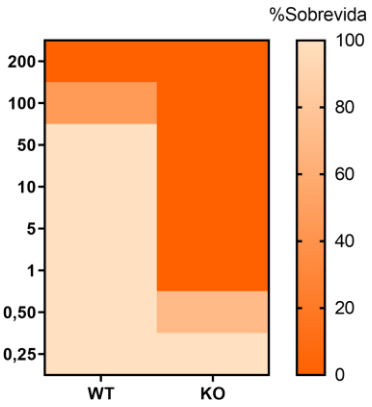


Figura 1: Sensibilidad al LPS. Ratones WT y KO fueron desafiados con una única dosis de LPS (0,25; 0,50; 1; 5; 10; 50; 100; 200 µg/ratón). Se evaluó la sobrevida a las 24 horas del desafío. **A)** Tabla con porcentajes de sobrevida en cada dosis. Las diferencias significativas entre WT y KO por dosis se determinaron mediante la prueba exacta de Fisher combinando 2 experimentos independientes (n = 5 ratones/grupo/experimento; n total = 10/grupo). (Bonferroni, α = 0.0064 para 8 comparaciones); **p*< 0.0064. **B)** Mapa de calor con escala de color representativo de los porcentajes de sobrevida (Rstudio).

Los resultados mostraron que luego del desafío con LPS los ratones KO presentaron niveles significativamente más altos de TNF-α que los ratones WT en cada tiempo y estos se mantuvieron durante al menos 6 horas, mientras que los ratones WT mostraron un aumento transitorio 1,5 horas después de la exposición al LPS, seguido de una disminución que se mantuvo hasta el final del experimento (Figura 2A). Además, la concentración plasmática de las citoquinas proinflamatorias IFN-γ e IL-12 aumentó a las 3 y 1,5 horas, respectivamente, después del desafío con LPS, siendo significativamente mayor en ratones KO (Figura 2B y C). Los niveles de IL-6, una citoquina con

funciones proinflamatorias y antiinflamatorias, no mostró diferencias entre los ratones WT y KO (Figura 2D).

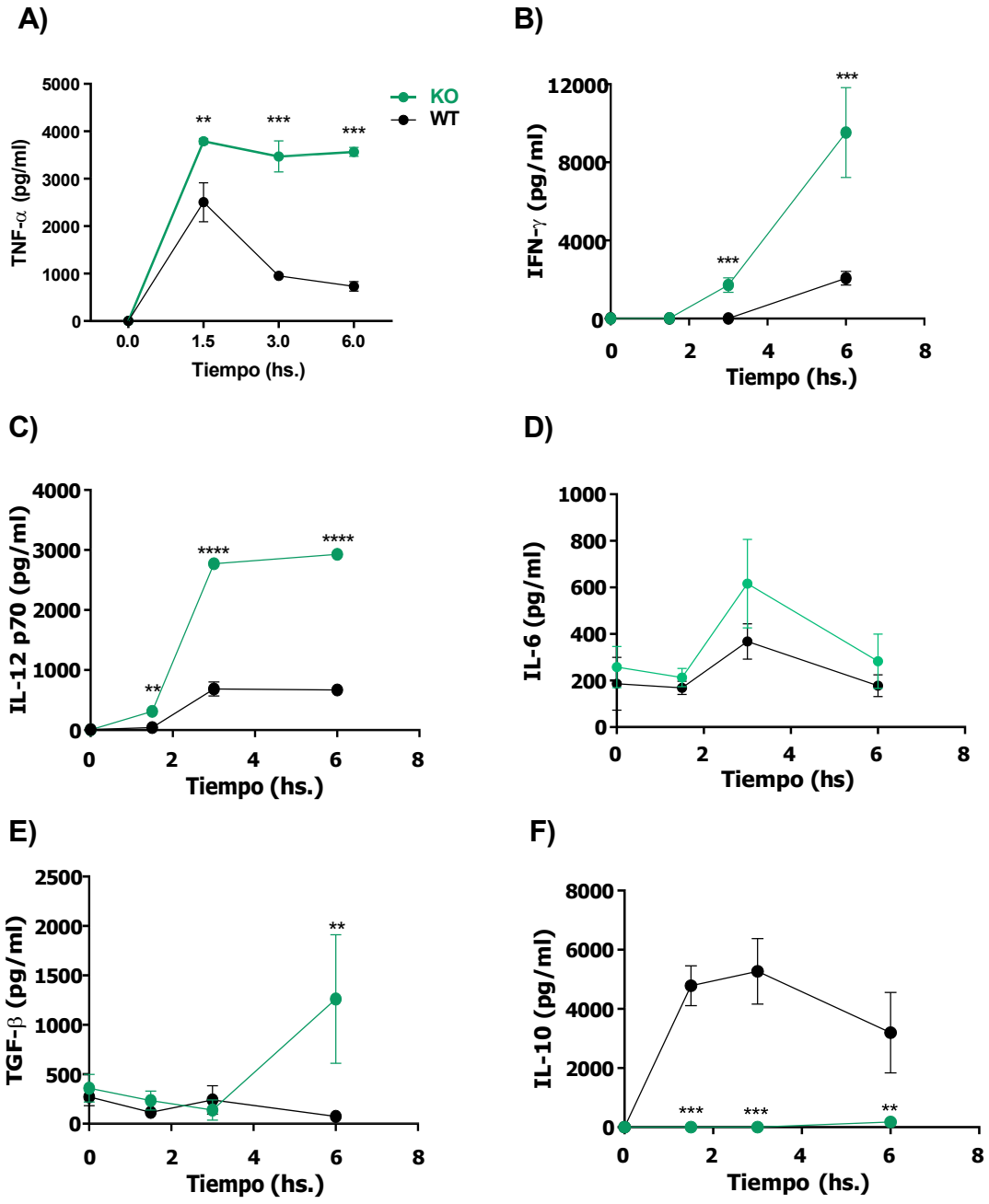


Figura 2: Cinética de citoquinas post desafío con LPS. Ratones WT y KO fueron inoculados con LPS (100µg/ratón), se tomaron muestras de plasma a diferentes tiempos luego del desafío con LPS (0; 1,5; 3 y 6 horas) y se evaluaron los niveles de **A)** TNF-α, **B)** IFN-γ, **C)** IL-12, **D)** IL-6, **E)** TGF-β y **F)** IL-10 por ELISA, **p<0,005; ***p<0.01; ****p<0,001 comparado con el grupo WT en el mismo tiempo. En todos los casos se realizó Mann-Whitney no

pareado y cada punto representa la media ± SEM de n=5 ratones por grupo. La figura es representativa de dos experimentos realizados bajo las mismas condiciones de forma independiente (n=10 total por grupo). WT: Ratones WT tratados con LPS; KO: Ratones KO tratados con LPS.

El incremento de citoquinas proinflamatorias fue acompañado por niveles significativamente altos de citoquinas antiinflamatorias como muestra el TGF-β en ratones KO o IL-10 en ratones WT. Aunque, este incremento de TGF-β resultó más tardío en comparación con las citoquinas proinflamatorias, a las 6 horas, y presentó un perfil de secreción diferente al del grupo WT. En el caso de la IL-10, como era de esperar en los ratones KO no fue detectable y su cinética de secreción en los ratones WT fue temprana, a partir de 1,5 horas, acompañando a las citoquinas proinflamatorias (Figura 2E y F).

La literatura indica que, además de citoquinas antiinflamatorias se liberan otras moléculas con efectos antiinflamatorios como los GC, que inhiben la producción de citoquinas proinflamatorias, y los receptores solubles de TNF-α, que son los inhibidores directos del TNF-α (Shubin *et al.*, 2011). Sin embargo, este conjunto de mediadores antiinflamatorios a veces no es suficiente para contrarrestar completamente los efectos de las citoquinas proinflamatorias. Incluso, la presencia de TNF-α en plasma demuestra una liberación inadecuada de sus receptores solubles TNF-RI-p55 y TNF-RII-p75, insuficientes para su neutralización (Bemelmans *et al.,* 2017).

Considerando que niveles elevados de TNF-α podrían estar asociados a la mayor sensibilidad a la endotoxina que presentan los ratones KO, y teniendo en cuenta que la actividad de TNF-α depende de los niveles de sus receptores específicos, se evaluó la expresión de dos receptores de TNF-α (TNF-RI-p55- y TNF-RII-p75-) en la membrana de leucocitos de sangre periférica de ratones WT y KO, a las 0 y 6 horas después de la exposición a endotoxinas.

Los resultados mostraron que la expresión basal de los receptores TNF-RI y TNF-RII no difiere entre los grupos WT y KO y que en ambos se expresan principalmente en monocitos y polimorfonucleares. Sin embargo, la exposición

a LPS indujo un aumento significativo en el porcentaje de polimorfonucleares que expresan TNF-RI en ratones KO, mientras que en ratones WT solo pudo verse una tendencia al aumento. Por el contrario, en linfocitos de ambos grupos se vio una disminución del TNF-RI (Figura 3A). Respecto al TNF-RII, tras el estímulo con LPS, se observó un porcentaje significativamente mayor en polimorfonucleares y monocitos de ratones KO; en cambio, en los ratones WT este aumento solo fue significativo en polimorfonucleares (Figura 3B). Resultados similares fueron obtenidos evaluando la intensidad de fluorescencia media (MIF) en cada tipo celular (datos no mostrados).

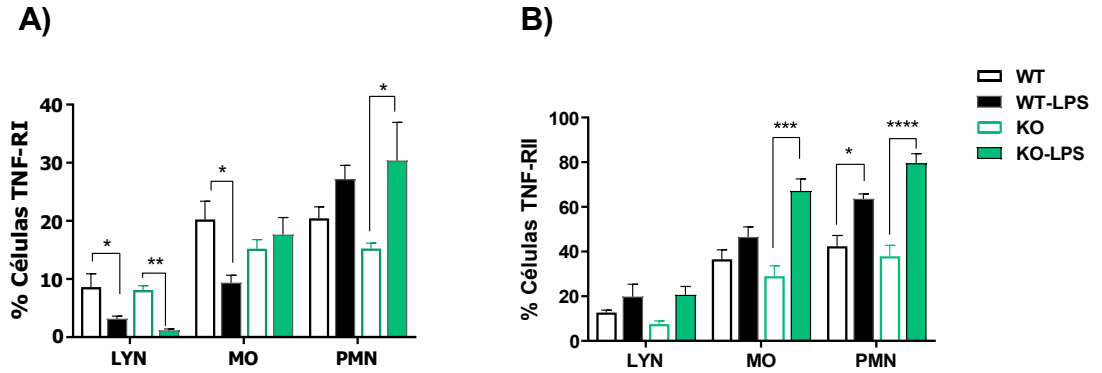


Figura 3: Determinación de los receptores de TNF-α en leucocitos de sangre periférica después de la exposición a LPS. Ratones WT y KO fueron inoculados con LPS (100 µg/ratón) o PBS y 6 horas después del desafío se obtuvieron muestras de sangre para la determinación de la expresión de los receptores de TNF-α (TNF-RI y TNF-RII) mediante marcaciones y análisis por citometría de flujo. La expresión en diferentes poblaciones celulares fue definida por *gates* en función de la relación FSC vs. SSC. **A)** Porcentaje de células que expresan TNF-RI. **B)** Porcentaje de células que expresan TNF-RII, *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001 ANOVA de dos vías post test de Tukey. Los resultados se expresan como la media ± SEM de n = 5 ratones por grupo. El experimento es representativo de dos experimentos independientes (n=10 total por grupo). WT: ratones WT tratados con PBS; KO: ratones KO tratado con PBS; WT-LPS: ratones WT tratados con LPS; KO-LPS: ratones KO tratados con LPS. PMN: neutrófilos polimorfonucleares; MO: monocitos; LYN: linfocitos.

Así, teniendo en cuenta que los leucocitos desempeñan un papel clave en el proceso inflamatorio de un shock endotóxico y que migran desde sangre

periférica a diversos tejidos, se evaluó el número de leucocitos circulantes en los ratones tratados. El recuento de células de sangre periférica mostró una disminución significativa en las células mononucleares y polimorfonucleares 6 horas después de la exposición a LPS tanto en ratones WT como KO, con una mayor reducción en polimorfonucleares en los ratones KO, a pesar de tener niveles basales comparables de ambos tipos de células (Figura 4).

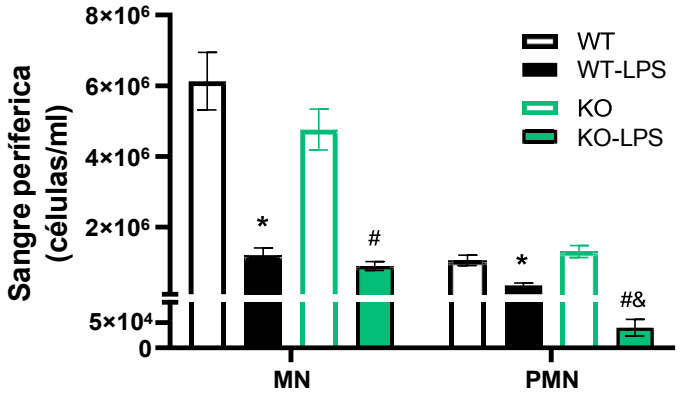


Figura 4: Recuento celular en sangre periférica luego del desafío con LPS. Ratones KO y WT fueron inoculados con una dosis de LPS (100 ug/ratón) o PBS y 6 horas después de la inyección, se determinó el recuento diferencial de células en muestras de sangre periférica, *p<0,001 en comparación con ratones WT, #p<0,01 en comparación con ratones KO, &p<0,0001 en comparación con ratones WT-LPS, ANOVA de dos vías post test de Tukey. Los resultados se expresan como la media ± SEM de n=5 ratones por grupo. El experimento es representativo de dos experimentos independientes (n=10 total por grupo). WT: ratones WT tratados con PBS; KO: ratones KO tratado con PBS; WT-LPS: ratones WT tratados con LPS; KO-LPS: ratones KO tratados con LPS; PMN: células polimorfonucleares; MN: células mononucleares.

Bajo ciertas condiciones patológicas, como infarto de miocardio, shock séptico, quemaduras graves, lesión pulmonar aguda, entre otras, los leucocitos pueden ser reclutados hacia sitios con lesiones tisulares en donde generan daños adicionales, conduciendo a una profundización, ampliación y empeoramiento de la lesión tisular hasta una necrosis irreversible o una pérdida completa de funcionalidad (Geng, 2001). Entre los órganos más

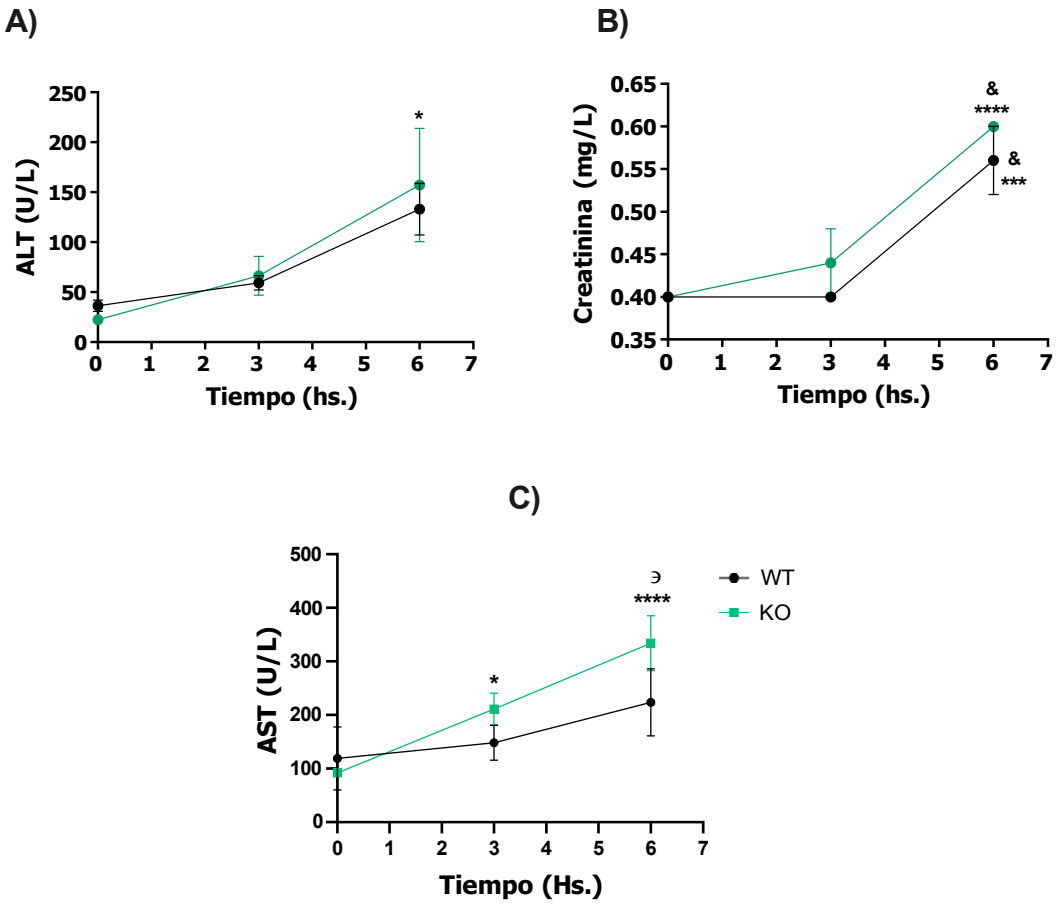


Figura 5: Cinética de marcadores de daño tisular post desafío con LPS. Ratones WT y KO fueron inoculados con una dosis de LPS (100 µg/ratón) y se tomaron muestras de plasma a diferentes tiempos luego del desafío con LPS (0; 3 y 6 horas) y se evaluaron los niveles de **A)** Alanina transferasa, ALT; **B)** Creatinina, Cre; **C)** Aspartato transferasa, AST, ə $p<0,05$ comparado con el grupo WT; *$p<0,005$; ***$p<0.001$; ****$p<0,001$ comparado con el tiempo cero; & $p<0,005$ comparado con el tiempo 3 horas; Mann-Whitney no pareado. Cada punto representa la media ± SEM de n=5 ratones por grupo. La figura es representativa de dos experimentos realizados bajo las mismas condiciones de forma independientes (n=10 total por grupo). WT: ratones WT tratados con LPS; KO: ratones KO tratados con LPS.

afectados se encuentran los pulmones, los riñones, el hígado y el sistema nervioso central (Caraballo *et al.,* 2019).

Hasta aquí los resultados mostraron que en ausencia de IL-10 se desencadena una respuesta inflamatoria exacerbada inducida por LPS junto con una disminución de leucocitos en sangre periférica que podría estar asociada a una

migración excesiva hacia diferentes órganos en donde podrían inducir daño lesión tisular. Para evidenciar si en este contexto se producen lesiones tisulares en diferentes órganos, se evaluaron en plasma parámetros bioquímicos asociados a daño tisular como creatinina (Cre), marcador específico de daño renal; alanina transferasa (ALT) y aspartato transferasa (AST) marcadores de daño hepático; en conjunto con el análisis histopatológico en donde se evaluó la coloración PAS, asociada a la disfunción de los hepatocitos y la inmunomarcación para TNF-α revelando un entorno proinflamatorio.

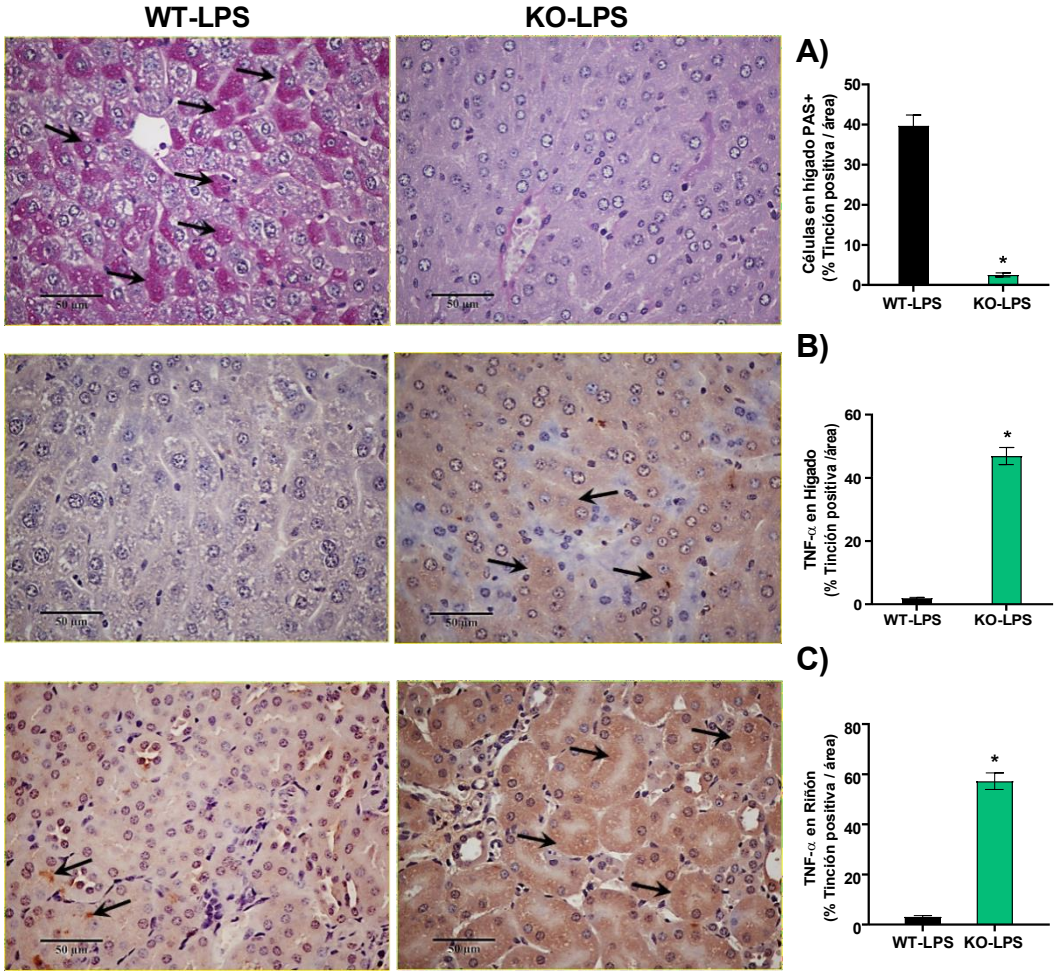


Figura 6: Histopatología hepática y renal post desafío con LPS. Ratones WT y KO fueron inoculados con una dosis de LPS (100 ug/ratón). Luego de 6 horas del desafío con LPS se extrajeron riñón e hígado para el análisis histopatológico, se realizó **A)** Tinción de PAS en hígado (las flechas señalan acúmulos de glucógeno). **B)** Marcación de TNF-α en hígado. **C)** Marcación de TNF-α en riñón (las flechas indican marcación positiva para TNFα), *p<0,05

comparado con el grupo WT; ANOVA de una vía post test de Bonferroni. Cada barra representa la media ± SEM de n=5 ratones por grupo. Microfotografía representativa de cada grupo a la izquierda el grupo WT, a la derecha grupo KO, aumento 400X. WT-LPS: ratones WT tratados con LPS; KO-LPS: ratones KO tratados con LPS.

Los resultados mostraron que ALT y creatinina presentan la misma cinética de liberación en ambos grupos presentando un incremento significativo a las 6 horas respecto a la concentración basal (Figura 5A y B). En cambio, la cinética de liberación de AST difiere entre grupos, en ratones KO hay un incremento más temprano a las 3 horas, mientras que a las 6 horas puede verse un incremento en ambos grupos siendo significativamente mayor en los ratones KO (Figura 5C). Los análisis histológicos evidenciaron que, en hígado los ratones KO mostraron un notable agotamiento de las células PAS+ en comparación con los animales WT, lo que indica una disminución de la capacidad de almacenamiento de glucógeno de las células hepáticas (Figura 6A). Además, se observó un marcado aumento en la expresión de la citoquina proinflamatoria TNF-α tanto en hígado como en riñón de ratones KO expuestos a LPS (Figura 6B y C).

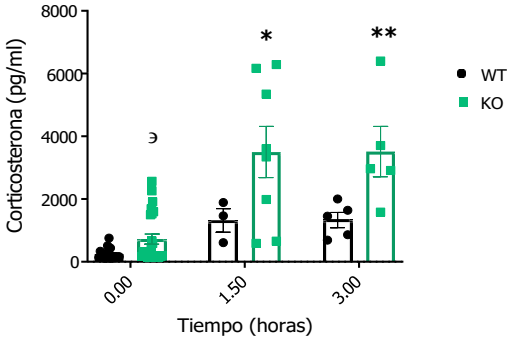
Tanto los hallazgos bioquímicos como el análisis histológico revelaron un mayor daño tisular en ratones KO, que en ratones WT, después de la exposición a LPS.

1.1 Participación de los GC en un estado de shock endotóxico en ausencia de IL-10

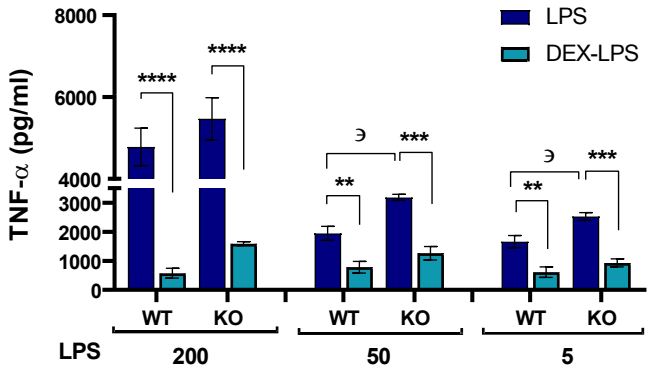
Durante la respuesta inflamatoria, existe una comunicación bidireccional entre el sistema nervioso y el sistema inmunológico. El LPS no solo desencadena la activación del sistema inmunológico, sino que además es un potente activador del sistema neuroendocrino, particularmente del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HHA), lo que resulta en un aumento de los niveles circulantes de GC. El LPS activa el eje HHA *per se* y actúa en sinergia con las citoquinas IL-1β, IL-

6 y TNF-α producidas por las células inmunes periféricas (Bangsgaard *et al.,* 2017; Beishuizen *et al.,* 2003).

A)



B)



C)

Tasa de mortalidad (%)				
Dosis LPS (µg/ratón)	WT (n=8)		KO (n=8)	
	LPS	DEX	LPS	DEX
200	100	0 ***	100	100
50	0	0	100	100
5	0	0	75	0***

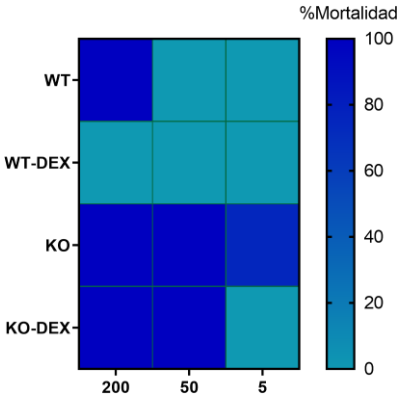


Figura 7: GC endógena y efecto de GC exógeno post desafío con LPS. A) Ratones WT y KO fueron inoculados con LPS (100 µg/ratón). A diferentes tiempos luego del desafío con LPS (0; 1,5 y 3 horas) se tomaron muestras de plasma y se evaluaron los niveles de GC por RIA, ə $p<0,01$ comparado con la condición basal *$p<0,05$; **$p<0,001$ comparado con el grupo WT en el mismo tiempo; ANOVA de una vía post test de Tukey. WT: Ratones WT tratados con

LPS; KO: Ratones KO tratados con LPS**. B)** Ratones WT y KO fueron pretratados con Dexametasona (DEX 62,5 µg/ratón) o PBS y 20 minutos después fueron desafiados con diferentes dosis de LPS (200, 50 y 5 µg/ratón). Luego de 1,5 horas se tomaron muestras de plasma y se evaluaron los niveles de TNF-α por ELISA, **p<0,01; ***p<0.001; ****p<0.0001 comparado con el grupo LPS; ə p<0,01 comparado con el grupo WT; ANOVA de dos vías post test de Tukey. Barra azul: Ratones pretratados con PBS previo al LPS; Barra turqueza: ratones pretratados con DEX previo al LPS. **C)** Ratones WT y KO fueron pretratados o no con DEX (62,5 µg/ratón) y 20 min después desafiados con distintas dosis de LPS (5; 50 y 200 µg/ratón). Luego la mortalidad fue evaluada hasta 48 horas después del desafío. El mapa de calor ilustra el porcentaje de mortalidad de cada grupo luego del tratamiento. Escala de colores: turquesa (0%, mortalidad), azul (100% mortalidad). Prueba exacta de Fisher comparando Con DEXA vs. Sin DEXA (Bonferroni, $\alpha = 0.0083$); ***: $p < 0.0083$. WT LPS 200 µg vs WT DEXA LPS 200 µg: $p = 0.0001$ (***), KO LPS 5 µg vs KO DEXA LPS 5 µg: $p = 0.0071$ (***). ***: $p < 0.0083$ de $n = 4$ ratones por grupo. WT: Ratones WT pretratados con PBS previo al LPS; WT-DEX: ratones WT pretratados con DEX previo al LPS; KO: Ratones KO pretratados con PBS previo al LPS; KO-DEX: ratones KO pretratados con DEX previo al LPS. La figura es representativa de dos experimentos realizados bajo las mismas condiciones de forma independientes (n=8-10 total por grupo).

El aumento resultante de los GC suprarrenales tiene efectos inhibidores bien documentados sobre el proceso inflamatorio y sobre la liberación de citoquinas inflamatorias, siendo fundamentales para la supervivencia del hospedador (Vandewalle *et al.,* 2020). Como lo demuestra el hecho de que la eliminación del eje HHA, mediante adrenalectomía, hipofisectomía o el bloqueo del receptor de GC, aumenta la gravedad de la infección y en algunos casos aumenta la tasa de mortalidad. El reemplazo de los GC endógenos con un GC sintético revierte estos efectos al reducir la gravedad de la infección y proporciona protección contra efectos letales (Webster *et al.,* 2004).

Es sabido que la síntesis de GC e IL-10 están interrelacionadas, y que una puede modular la inducción de la otra, pero esta relación no siempre es lineal (Koldzic-Zivanovic *et al.*, 2006). La interrelación y/o jerarquía entre ambos mediadores antiinflamatorios no ha sido completamente dilucidada.

Así, a fin de investigar esta relación es que se incorporó el tratamiento con dexametasona (DEX) un GC sintético con conocidos efectos protectores en contextos inflamatorios (Dias *et al.*, 2007; Lemieux *et al.,* 2019; Mikolka *et al.*, 2019). En primer lugar, se midieron los niveles endógenos de GC frente a un desafío con LPS y luego el efecto del tratamiento DEX a fin de determinar si aún en ausencia de IL-10 induce el efecto protector frente a una dosis letal de LPS reflejado tanto en los niveles de TNF-α en plasma como en la refractariedad a la letalidad de la endotoxina.

Los resultados mostraron que el nivel de GC en condiciones basales fue más elevado en grupo KO que en el WT. Además, tras el desafío con LPS ambos grupos mostraron un incremento de GC en plasma, siendo significativamente mayor en el grupo KO, al menos durante las primeras 3 horas (Figura 7A).

Por otro lado, el pretratamiento con un GC exógeno como la DEX, seguido del desafío con distintas dosis de LPS (200, 50 o 5 µg/ratón) mostró un claro efecto refractario en ratones WT frente al efecto letal del LPS (Figura 7C), reflejado además en una marcada disminución en los niveles de TNF-α en plasma (Figura 7B). En el grupo de ratones KO si bien se observó una disminución en los niveles de TNF-α de manera dosis dependiente, el efecto protector solo pudo observarse frente a la dosis más baja de LPS evaluada (5µg/ratón).

En conjunto estos resultados demostraron que DEX, en ausencia de IL10, promueve una protección parcial solo a dosis muy bajas de LPS, sugiriendo que el efecto refractario del GC exógeno podría manifestarse en su totalidad solamente en presencia de IL-10.

- **Conclusiones parciales**

Los resultados obtenidos en esta primera sección demuestran que la IL-10 desempeña un papel fundamental en la protección del hospedador frente a la inflamación sistémica inducida por LPS. Su ausencia desencadenó un estado hiperinflamatorio caracterizado por niveles exacerbados de citoquinas proinflamatorias acompañado por un daño tisular significativo (evidenciado por

parámetros bioquímicos e histológicos). De manera paradójica presentaron niveles elevados de GC endógenos luego del encuentro con la endotoxina, que resultan insuficientes para contrarrestar el shock endotóxico. Además, la administración de GC exógenos (DEX) solo ejerció un efecto protector limitado en ausencia de IL-10, lo que sugiere una interdependencia funcional entre la acción de los GC y la IL-10 para modular adecuadamente la respuesta inflamatoria. Sin embargo, deberían realizarse más estudios para poder establecer esta interrelación.

En las próximas secciones, se explorará el rol de estos mediadores en modelos murinos que replican etapas avanzadas de la patología, con manifestaciones claras de inmunosupresión (IS), a fin de profundizar en los mecanismos subyacentes que regulan.

2. Modelo de tolerancia/IS inducida por LPS

La IS en pacientes con sepsis involucra alteraciones que se dan directa o indirectamente en diferentes tipos celulares del sistema inmunológico. Entre las diversas alteraciones se destacan la apoptosis acelerada y el agotamiento de células T, la expansión de MDSC y la reprogramación de leucocitos (Van der Poll, *et al.,* 2021). Como se mencionó previamente la reprogramación leucocitaria es adecuadamente reproducida en el modelo de tolerancia al LPS, siendo ésta la mayor fortaleza del modelo (Wang *et al.*, 2022). Un estudio sobre la señalización celular en leucocitos de pacientes sépticos reveló numerosas alteraciones de las vías de activación, que se asemejan a las observadas en las células tolerantes al LPS (Adib-Conquy *et al.*, 2000).

El fenómeno de tolerancia a endotoxinas se manifiesta como una respuesta disminuida frente a un nuevo desafío con LPS, luego de un primer contacto con la endotoxina. Esta hiporreactividad se refleja principalmente en la menor producción de TNF-α y otras citoquinas inflamatorias. Por esta razón, el TNF-α se considera el marcador más representativo de la tolerancia a LPS, dado que muestra una producción marcadamente reducida en comparación con el aumento agudo y rápido observado tras la primera estimulación (Liu, *et al.*, 2019). El fenómeno de tolerancia a endotoxinas es considerado por varios autores como uno de los mecanismos causales de la IS inespecífica reportada en pacientes sépticos (Cavaillon *et al.,* 2006a; Seeley *et al.,* 2017).

En base a esto, en la siguiente sección se abordó el estudio de la fisiopatología de la sepsis en etapas tardías utilizando un modelo de tolerancia/IS inducido por LPS. Se investigó sobre la participación de la IL-10 y su vinculación con los GC como así también la participación de células mieloides en un contexto de IS.

Trabajos previos del laboratorio han reportado que la IS que se adquiere tras múltiples dosis subletales de LPS es un fenómeno cuantitativo que depende del número de dosis y la concentración de LPS. Entonces, el modelo de tolerancia a LPS extendido muestra signos de IS más evidentes que el modelo de

tolerancia habitual. La diferencia entre ambos modelos radica en la extensión del esquema de inoculación de LPS y el incremento de la dosis. Aquí se utilizó el modelo de tolerancia al LPS extendido a fin de recapitular parámetros de IS lo suficientemente robustos (Rearte, Landoni *et al.*, 2010; Rearte, Maglioco, 2010; Martire-Greco *et al.*, 2014; Rearte *et al.*, 2014).

Dado que, el modelo de tolerancia/IS implica un esquema de múltiples inoculaciones de LPS y que en la sección anterior los ratones KO mostraron una alta sensibilidad al LPS, se tuvo que realizar un ajuste en el esquema de administración de dosis subletales para que se adapte a la sensibilidad de los ratones KO y así poder llevarlo a cabo en ambos grupos. De esta manera, se debieron utilizar dosis de LPS mucho más reducidas que las habitualmente empleadas en ratones WT.

En primera instancia se evaluó la posibilidad de inducir un estado de tolerancia/IS a endotoxinas en ratones deficientes de IL-10. Dicho fenómeno es caracterizado principalmente por una disminución en la producción de mediadores proinflamatorios junto con un aumento en la secreción de citoquinas antiinflamatorias, tales como la IL-10. Así, los ratones WT tolerantes mostraron un aumento en los niveles de IL-10 en plasma 8 horas después del desafío con LPS (Figura 8A). Así mismo, dado que la disminución de los niveles de TNF-α constituye un marcador clave del establecimiento del fenómeno de tolerancia/IS, se evaluó la producción de esta citoquina en plasma a lo largo del esquema.

De este modo, mientras que los ratones KOIS exhibieron un aumento exacerbado de TNF-α tras la primera dosis de LPS, la cinética a lo largo de los días fue similar a la de los ratones WTIS. Estos resultados sugieren que, incluso en ausencia de IL-10, es posible inducir tolerancia/IS (Figura 8B), aunque con menor robustez. En efecto, mientras los ratones KOIS fueron refractarios a su dosis letal de LPS (10 µg/ratón), cuando se los desafió con la dosis letal para los ratones WTIS (200 µg/ratón), la mortalidad fue del 100% (mortalidad de ratones IS tras el desafío con 200µg/ratón: WT: 0/6 vs. IL-10 KO: 6/6). Esto indica que, aunque los ratones KO desarrollan tolerancia/IS, este fenómeno se establece con menor intensidad que en los ratones WT.

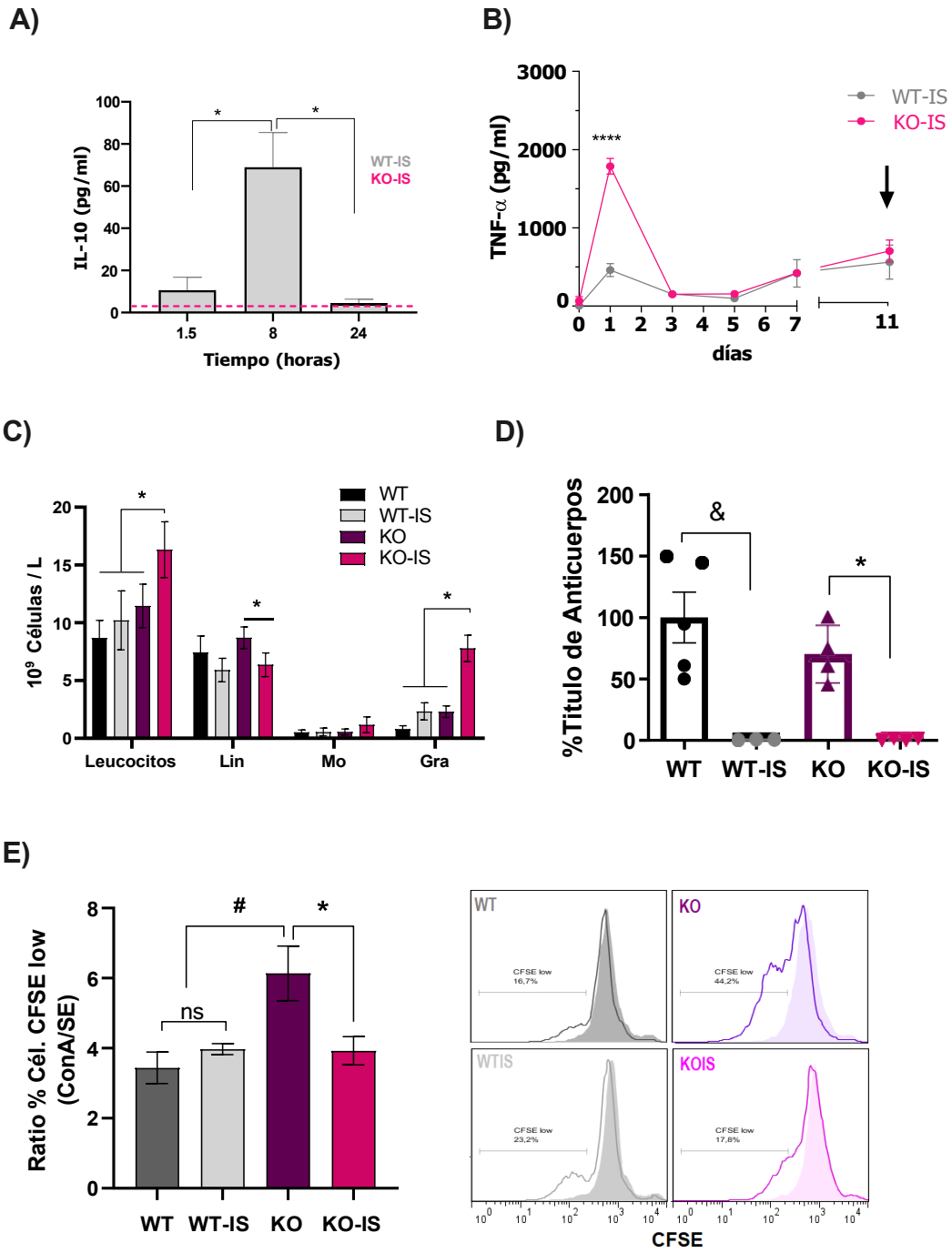


Figura 8: Panel de caracterización del estado de IS. Ratones WT y KO fueron inoculados durante diez días consecutivos con dosis crecientes de LPS (0,25 a 50 µg/ratón i.p.) **A)** Al finalizar el esquema de IS a distintos tiempos (1,5; 8 y 24 horas) después de la última dosis de LPS se obtuvieron muestras de plasma y se realizó la determinación de los niveles e IL-10 mediante ELISA, *p<0,05 comparado con el tiempo 8 horas; ANOVA de una vía post test de Tukey. **B)** Durante todo el esquema de IS 1,5 horas después de cada dosis se obtuvieron muestras de plasma y se realizó la determinación de los niveles de TNF-α mediante ELISA****p<0,01 comparado con el grupo KOIS*; t-student* no

pareado. La flecha indica que en el día 11 se realizó el desafío con una dosis letal de LPS (10 µg/ratón, 200 µg/ratón) en ambos grupos. **C)** Ratones WT y KO fueron inoculados durante diez días consecutivos con dosis crecientes de LPS (0,25 a 50 µg/ratón i.p.) o PBS. Al finalizar el esquema de IS se obtuvieron muestras de sangre y se realizó el recuento hematológico mediante *Coulter* Veterinario, *p<0,05 comparado con el grupo KOIS ANOVA de dos vías post test de Tukey. **D)** Al finalizar el esquema de IS los ratones fueron desafiados con glóbulos rojos de carnero ($1x10^8$GR/ratón) y cinco días después se determinó el título de anticuerpos mediante el ensayo de hemoaglutinación, se expresa el % relativizado a la media de cada grupo, *p<0,05 comparado con el grupo KOIS, &<0,05 comparado el grupo WT, ANOVA de una vía post test de Tukey. **E)** Al finalizar el esquema de IS se extrajo el bazo y se realizó un homogenato para obtener una suspensión celular. Los esplenocitos obtenidos fueron teñidos con CFSE 5µM y estimulados por 96 horas con Concanavalina A 2µg/ml (ConA), o sin estimulo (SE). Luego por citometría de flujo en el *gate* de linfocitos se analizó la mediana de intensidad de florescencia en FL1, solapando histogramas de células SE y ConA se estableció el *Marker* el cual permitió cuantificar el porcentaje de las células CFSElow, se expresa el ratio del porcentaje de células CFSElow que se calcula relativizando %Cel CFSElow a su control SE, *p>0,05 versus grupo KO, #p>0,05 versus grupo WT; ANOVA de una vía post test de Tukey. Histogramas representativos de cada grupo con el *Marker* utilizado para cuantificar el porcentaje de células CFSElow. Cada punto o barra de las distintas figuras representa la media ± SEM de n= 4 ratones por grupo. Las figuras son representativas de dos experimentos realizados de forma independiente bajo las mismas condiciones experimentales. WT: Ratones WT tratados con PBS; WTIS: Ratones WT tratados con LPS; KO: ratones KO tratados con PBS; KOIS: Ratones KO tratados con LPS.

Con el objetivo de examinar si el modelo de tolerancia/IS inducido por LPS presenta características propias de IS, se evaluaron diversos parámetros inmunológicos al finalizar el esquema de inoculación. En primer lugar, se analizó el perfil hematológico para identificar similitudes con el perfil hematológico en un cuadro de IS. En los ratones KOIS se observó linfopenia significativa acompañada de un incremento de leucocitos totales asociado a una expansión marcada de células granulocíticas. En los ratones WTIS se evidenció una tendencia similar, aunque menos pronunciada que en los ratones KOIS (Figura 8C).

En segundo lugar, se evaluó el *status* de la respuesta inmune humoral mediante el título de anticuerpos anti-glóbulos rojos de carnero. Se detectó una disminución significativa tanto en ratones KOIS como en WTIS en comparación con sus respectivos controles, indicando una respuesta humoral reducida (Figura 8D).

Finalmente, se analizó la respuesta inmune celular a través de la capacidad proliferativa de esplenocitos. Los esplenocitos de ratones KOIS mostraron una capacidad de proliferación significativamente menor respecto a su control KO, evidenciando una inmunosupresión celular. En cambio, en el grupo WTIS no se observó esta disminución. Comparando los grupos controles, los esplenocitos de ratones KO presentaron una capacidad proliferativa significativamente mayor que los de ratones WT, sugiriendo un posible efecto inhibitorio de la IL-10 (Figura 8E).

En conjunto, estos resultados demuestran que, aún en ausencia de IL-10, se logró establecer y sostener un estado de tolerancia/IS inducido por LPS, que exhibió claros signos de IS.

2.2 Participación de los GC en un estado de IS inducido por LPS en ausencia de IL-10

Teniendo en cuenta que fue posible establecer la IS en ratones KO y habiendo demostrado en trabajos previos la relevancia de los GC en el mantenimiento tanto de la tolerancia inducida por LPS como de la IS (Rearte, Landoni, *et al.*, 2010; Rearte, Maglioco, *et al.*, 2010; Rearte *et al.*, 2014) es que se consideró extender el análisis a un contexto de IS en ausencia de IL-10. Para ello, en diferentes días durante el esquema de IS y 3 horas después de cada dosis de LPS, se recolectaron muestras de plasma y se evaluaron los niveles de corticosterona. Los resultados mostraron un aumento sostenido de los niveles de corticosterona en ambos grupos, siendo significativamente mayor en los ratones KOIS. Además, se observó que los ratones KO presentaron niveles de GC basales más elevados que los ratones WT (Figura 9A).

Considerando los niveles significativamente exacerbados de GC encontrados en ratones KOIS, se estudió la histología de la glándula suprarrenal, particularmente la región histológica encargada de la producción de estos mediadores hormonales. De esta manera, el análisis histológico se llevó a cabo

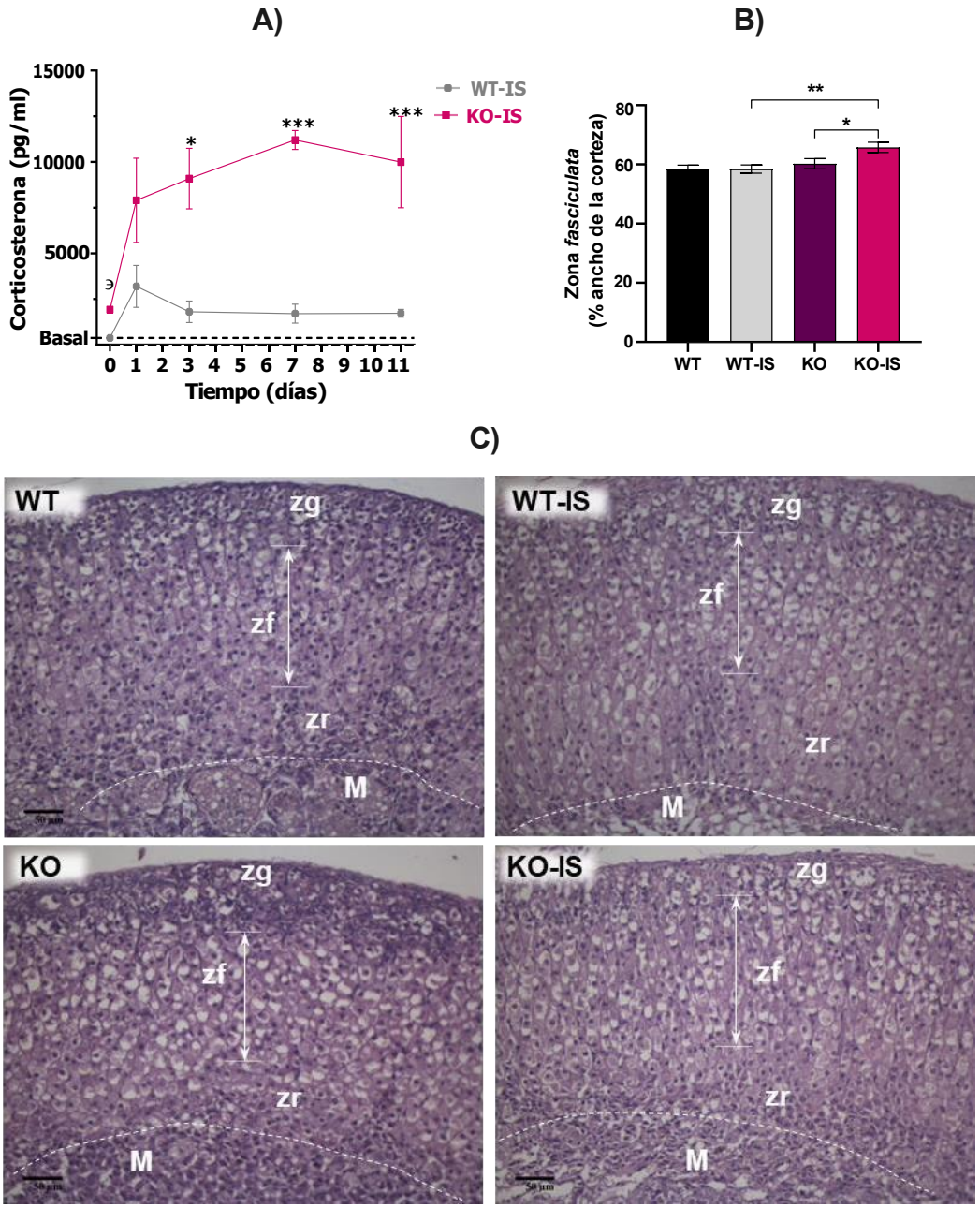


Figura 9: GC en el estado de IS: Ratones WT y KO fueron inoculados durante diez días consecutivos con dosis crecientes de LPS (0,25 a 50 ug/ratón i.p.) **A)** Durante el esquema de IS 3 horass después de cada dosis se obtuvieron muestras de plasma y se realizó la determinación de los niveles de GC por ELISA, * p<0,05, **p<0.01, ***p<0.001 comparado con WT al mismo tiempo, ə p<0,01 comparando condición basal, Mann-Whitney no pareado. **B)** Ratones WT y KO fueron inoculados durante diez días consecutivos con dosis crecientes

de LPS (0,25 a 50 ug/ratón i.p.) o PBS. Análisis morfométrico del ancho de la zona fasciculada en relación con el ancho total de la corteza. Los resultados se expresan como la media ± SEM del % de ancho de la zf de una imagen aleatoria obtenida de al menos 4 de cada glándula suprarrenal, * p<0.05 en comparación con ratones WTIS, ** p<0,005 en comparación con ratones KO. ANOVA de una vía post test de Tukey. **C)** Microfotografía 10X de la glándula suprarrenal representativa de cada grupo. Zg: zona granular; zf: zona fascicular; zr: zona reticular; M: médula. WT: Ratones WT tratados con PBS; WTIS: Ratones WT tratados con LPS; KO: ratones KO tratados con PBS; KOIS: Ratones KO tratados con LPS. Cada punto o barras de las figuras representan la media ± SEM de n= 5 ratones por grupo.

sobre la corteza, particularmente en la zona fascicular (zf) que es la región en donde se encuentran los espongiocitos encargados de la producción de los GC endógenos. Se realizó la cuantificación del grosor de la zona fascicular relativizado al ancho total de la corteza, esto permitió tener información acerca de cambios estructurales.

Los resultados revelaron que los ratones KOIS presentan un incremento significativo del grosor de la zona fascicular en comparación con los ratones KO y WTIS, demarcando así una asociación entre el cambio histológico y los niveles exacerbados de GC en plasma de los ratones KOIS (Figura 9B).

Está ampliamente documentado que tanto la IL-10 como los GC poseen propiedades antiinflamatorias e inmunosupresoras y que su aumento en plasma se asocia con un peor pronóstico en pacientes sépticos (Rivas *et al*., 2023; Li X. *et al.,* 2017). Sin embargo, en modelos murinos, la neutralización de IL-10 mediante anticuerpos anti-IL10 ha demostrado resultados controversiales dependiendo del momento de administración. Algunos estudios reportan que el tratamiento con anti-IL-10 revierte aspectos disfuncionales de la IS, como la capacidad de *clearance* y la mortalidad, mientras que otros estudios no evidencian cambios significativos (Kalechman *et al.,* 2002; Murphey *et al.,* 2006). Por el contrario, la inhibición de los GC utilizando diferentes estrategias ha demostrado que permite la restauración de la respuesta inmune humoral y celular en modelos de tolerancia/IS inducidos por LPS, sugiriendo un papel central de los GC en el mantenimiento de la tolerancia a la endotoxina y de la IS inducida por LPS (Rearte, Maglioco *et al.,* 2010; Rearte et al., 2014).

Considerando estos antecedentes, se evaluaron si los niveles elevados de corticosterona en ratones KOIS podrían contribuir a la tolerancia/IS parcial, analizando su función tanto en el mantenimiento como en el establecimiento del fenómeno. Para ello, ratones IS de ambas cepas fueron tratados con diferentes esquemas de mifepristone (RU486) y posteriormente desafiados con su dosis letal respectiva de LPS, evaluando la mortalidad a las 24 horas.

Durante la fase de mantenimiento, el tratamiento con RU486 se administró 24 horas después de finalizado el esquema de IS, en simultáneo con la dosis letal de LPS. Los resultados evidenciaron la ruptura de la tolerancia/IS mediada por RU486 tanto en ratones WTIS como en ratones KOIS, cabe destacar que en los ratones KOIS se manifestó de manera más temprana (Tabla 1 Mantenimiento).

En la fase de establecimiento, el tratamiento con RU486 se administró junto a cada dosis diaria de LPS durante el período de inducción de la IS y 24 horas después, se realizó el desafió letal. En ratones KOIS el tratamiento con RU486 provocó signos clínicos de inflamación exacerbada -como temblores, diarrea, letargo y pelaje erizado- con una mortalidad del 40 %. En contraste, los ratones WTIS sometidos al mismo tratamiento, presentaron una sobrevida del 100%, en concordancia con hallazgos previos del laboratorio (Rearte, Maglioco et al., 2010) (Tabla 1 Establecimiento).

Tabla 1: Efecto de la mifepristona (RU486) en el mantenimiento y el establecimiento de la IS.

	Mantenimiento		**Establecimiento**	
	IS + RU486		Dosis diaria (LPS) + RU486	
Grupos	WT	KO	WT	KO
%Mortalidad	100	100	0	40

Mantenimiento: ratones WTIS y KOIS, después de 24 horas de la última dosis de LPS, se inocularon con RU486 (300 µg/ratón s.c.) y luego con una dosis letal de LPS (200 o 10 µg/ratón, i.p.) respectivamente. **Establecimiento**: Ratones WT y KO se trataron simultáneamente con RU486 (300 µg/ratón s.c.) y la dosis diaria de LPS, 24 horas después

de la última dosis de LPS se inocularon con una dosis letal de LPS (200 o 10 µg/ratón, i.p.) respectivamente. La tabla es representativa de dos repeticiones de un experimento con n=4-5 por grupo. Grupos control: Ratones WT IS (n=8) tratados con vehículo (PEG); Ratones KO IS tratados con PEG (n=10). Todos los animales sobrevivieron a la dosis letal de LPS. Prueba exacta de Fisher para la comparación entre grupos durante el Mantenimiento: WTIS+RU486, p = 0.0004*** vs WTIS+PEG; KOIS+RU486, p = 0.0004*** vs KOIS+PEG; umbral de significancia: p < 0.0127. n = 10/grupo. NS (no significativo) para las comparaciones entre cepas (WTIS+RU86 vs KOIS+RU486). Establecimiento: WTIS+RU486, p =0.9999 (NS) vs WTIS+PEG; KOIS+RU486 p= 0.3042 (NS) vs KOIS+PEG; n = 10/grupo. NS para las comparaciones entre cepas (WTIS+RU86 vs KOIS+RU486)

En conclusión, estos resultados demostraron que el bloqueo de los receptores de GC con RU486 interfiere de manera relevante tanto en el mantenimiento como en el establecimiento de la tolerancia/IS en ratones KO. En ausencia de IL-10, la inhibición de los receptores de GC desarticuló de forma más temprana el mantenimiento del fenómeno, mientras que su participación en el establecimiento se vio parcialmente inhibida, aunque sin alcanzar significación estadística. Estos hallazgos resaltan el papel esencial de los GC endógenos en ambos procesos en ausencia de IL-10. Cabe aclarar que, aunque la administración combinada de RU486 y LPS durante la fase de establecimiento intensificó la respuesta inflamatoria, no resultó letal en todos los animales, lo que subraya la necesidad de realizar estudios adicionales para comprender mejor la interacción entre IL-10 y los GC en el contexto del establecimiento.

2.3 Expansión de células mieloides en un estado de IS inducido por LPS en ausencia de IL-10

Además de la desregulación asociada a mediadores inflamatorios y antiinflamatorios, el fenómeno de IS en sepsis se caracteriza también por un desajuste a nivel celular, tanto de la inmunidad innata como adaptativa.

Los estudios pioneros de autopsias realizados por Hotchkiss R. y sus colegas en pacientes fallecidos por cuadros de sepsis, revelaron una profunda pérdida de linfocitos B y T CD4 inducida por apoptosis en bazo, sangre y tejido linfoide asociado a intestino (Hotchkiss *et al.,* 1999; Hotchkiss *et al.*, 2001b).

Paradójicamente, la apoptosis en los neutrófilos es retrasada provocando que el paciente séptico tenga un mayor número de neutrófilos activados, implicados en la lesión de órganos debido a la liberación excesiva de sus proteasas (Li, Y. *et al.,* 2023; Sayeed, 2004;).

Más recientemente en la sepsis se ha informado la expansión de las células supresoras, incluidos los linfocitos T_{reg} y las MDSC (Huang *et al*., 2015; Mathias *et al.*, 2017). Las MDSC constituyen una población heterogénea de células mieloides inmaduras caracterizadas por su capacidad para suprimir la respuesta de los linfocitos T (Van der Poll, 2017; Schrijver *et al.,* 2019). En modelos murinos se identifican las PMN-MDSC por el fenotipo, $CD11b^{+}/Ly6G^{+}/Ly6C^{low}$, y las M-MDSC por el fenotipo $CD11b^{+}/Ly6G^{-}/Ly6C^{high}$ (Bronte *et al.*, 2016).

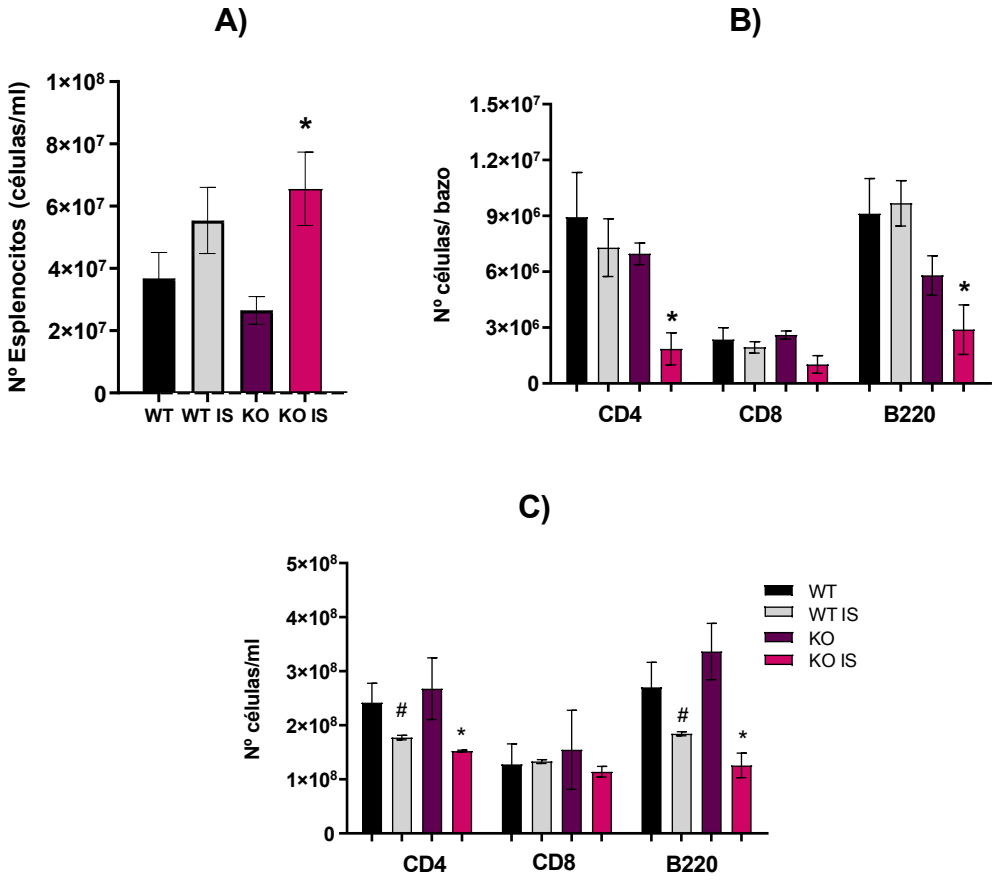


Figura 10: Caracterización fenotípica de poblaciones linfoides en distintos compartimentos en un estado de IS. Ratones WT y KO fueron inoculados durante diez días consecutivos con dosis crecientes de LPS (0,25 a 50 ug/ratón

i.p.) WTIS y KOIS, en paralelo los controles fueron inoculados con PBS, WT y KO. A las 24 horas luego de finalizar el esquema de IS se obtuvieron muestras de sangre y bazo en donde se realizaron marcaciones específicas de distintas poblaciones linfoides que posteriormente fueron analizadas por citometria de flujo. Se marcaron linfocitos T (CD4+ y CD8+) y linfocitos B (B220+). **A)** Recuento celular por cámara de Neubauer de esplenocitos tenidos con Turk, se expresa el número de células por ml (N°cel/ml), *p<0,05 versus grupo KO; ANOVA de una vía post test de Tukey. **B)** Poblaciones linfoide en bazo, se expresa el número absoluto de cada tipo celular por bazo (N° abs/bazo). **C)** Poblaciones linfoide en sangre periférica, se expresa el número absoluto de cada tipo celular por mL (N° abs/ml), *p<,05 versus grupo KO, #p<0,05 versus grupo WT; ANOVA de dos vías post test de Tukey. En los gráficos cada barra representa la media ± SEM de n= 5 ratones por grupo de dos experimentos realizados de forma independiente bajo las mismas condiciones experimentales.

Para comprender las alteraciones fenotípicas y funcionales a nivel celular durante los procesos de IS y evaluar el impacto de la deficiencia de IL-10, se llevó a cabo un esquema de IS y se evaluaron diferentes poblaciones celulares en distintos compartimentos que fueron analizadas mediante citometría de flujo. De esta manera se evaluaron linfocitos T ($CD4^+$, $CD8^+$), linfocitos B ($B220^+$) y mieloides ($CD11b^+/Ly6G^+/Ly6C^{low}$, $CD11b^+/Ly6G^-/Ly6C^{high}$), en tres compartimentos: sangre, bazo y médula ósea. Esto permitió obtener información acerca de la compartimentalización de las disfunciones/alteraciones a nivel celular que tienen lugar en un cuadro de IS en ausencia de IL-10.

Evaluando el compartimento esplénico se observó una hiperplasia celular en los ratones KOIS y solo una tendencia en ratones WTIS (Figura 10A). Las poblaciones linfoides presentaron una disminución significativa de linfocitos T $CD4^+$ y linfocitos B $B220^+$ en ratones KOIS en comparación con los ratones KO (Figura 10B). Este perfil no fue evidente en ratones WTIS. Por otro lado, en el compartimento de sangre periférica tanto los ratones KOIS como los WTIS mostraron una linfopenia asociada a la disminución significativa de los linfocitos T $CD4^+$ y linfocitos B $B220^+$ (Figura 10C).

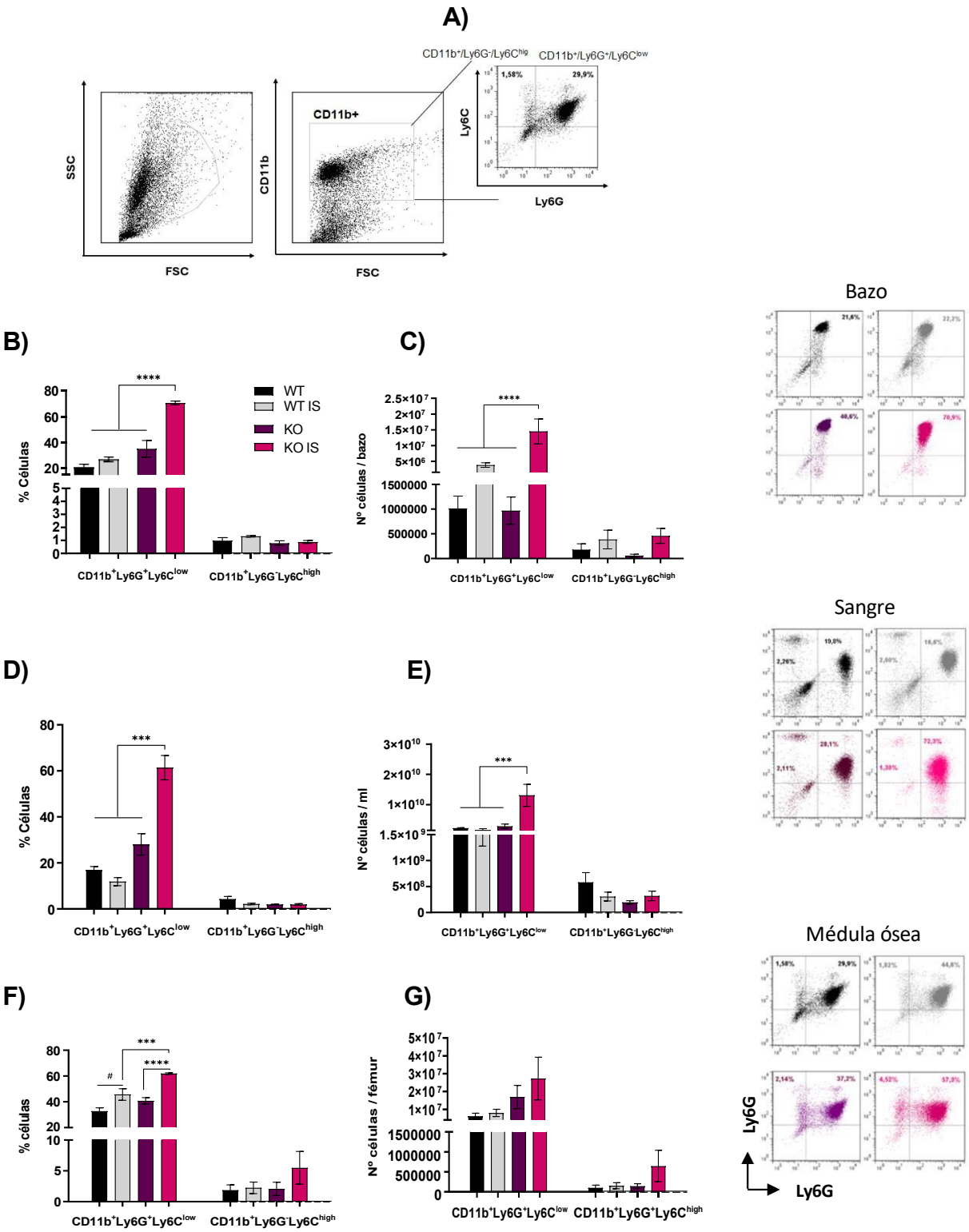


Figura 11: Caracterización fenotípica de poblaciones mieloides en distintos compartimentos en un estado de IS. Ratones WT y KO fueron inoculados durante diez días consecutivos con dosis crecientes de LPS (0,25 a 50 ug/ratón i.p.) WTIS y KOIS, en paralelo los controles fueron inoculados con PBS, WT y KO. A las 24 horas luego de finalizar el esquema de IS se

obtuvieron muestras de sangre, médula ósea y bazo en donde se realizaron marcaciones específicas de distintas poblaciones celulares que posteriormente fueron analizadas por citometria de flujo. Se marcaron poblaciones mieloides PMN-MDSC ($CD11b^{+}Ly6G^{+}Ly6C^{low}$) y M-MDSC ($CD11b^{+}Ly6G^{-}Ly6C^{high}$). **A)** Análisis realizado en citometro de flujo. En el *dot plot* FSC-SSC se seleccionó el *gate* de células vivas, en estas se delimitó el *gate* de células vivas que expresan CD11b, población CD11b+, utilizando el *dot plot* CD11b-FSC, sobre la población CD11b+ se analizan las subpoblaciones PMN-MDSC ($CD11b^{+}Ly6G^{+}Ly6C^{low}$) y M-MDSC ($CD11b^{+}Ly6G^{-}Ly6C^{high}$) utilizando el *dot plot* Ly6G-Ly6C en diferentes compartimentos. FSC: dispersión directa; SSC: dispersión lateral. **B,C)** Poblaciones mieloides en sangre periférica, se expresa el porcentaje y el número absoluto de cada tipo celular por mL (N° abs/ml). **D,E)** Poblaciones mieloides en bazo, se expresa el porcentaje y número absoluto de cada tipo celular por bazo (N° abs/bazo). **F,G)** Poblaciones mieloides en medula ósea se expresa el porcentaje y número absoluto de cada tipo celular por fémur. En todos los casos se realizó el análisis estadístico ANOVA de dos vías post test de Tukey *p>0,05; **p<0,01; ****p<0,0001 versus grupo KOIS, #p>0,05 versus grupo WT. En los gráficos cada barra representa la media ± SEM de n= 5 ratones por grupo, de dos repeticiones en las mismas condiciones experimentales. *Dot plot* Ly6G-Ly6C representativo de cada grupo (WT, negro; WTIS, gris; KO, violeta; KOIS, rosada) en cada compartimento, sangre, bazo y médula ósea.

En cuanto a los linfocitos T $CD8^{+}$ solo se observó una tendencia a la disminución en los ratones KOIS tanto en bazo como en sangre periférica.

Respecto a las poblaciones mieloides, analizando el compartimento esplénico los resultados mostraron un incremento significativo de células mieloides con fenotipo $CD11b^{+}/Ly6G^{+}/Ly6C^{low}$ en ratones KOIS en comparación con el resto de los grupos experimentales, mientras que en el grupo WTIS solo pudo visualizarse una tendencia al incremento en comparación con el grupo WT (Figura 11B y C). En el compartimento de sangre periférica, al igual que en bazo, se observó un incremento significativo de la misma población mieloide $CD11b^{+}/Ly6G^{+}/Ly6C^{low}$ en el grupo de ratones KOIS (Figura 11D y E). Finalmente, en médula ósea también se observó un incremento significativo de la población $CD11b^{+}/Ly6G^{+}/Ly6C^{low}$ en ratones KOIS respecto a su control y a diferencia de los compartimentos anteriores este incremento también se vio en

los ratones WTIS (Figura 11F y G). Estas células no difieren entre los grupos KO y WT en ninguno de los compartimentos.

La población mieloide con fenotipo $CD11b^{+}/Ly6G^{-}/Ly6C^{high}$ no mostro diferencias significativas entre grupos en ningún compartimento. Solo en medula ósea pudo visualizarse una tendencia al incremento en el grupo KOIS (Figura 9F y G).

En conjunto, estos resultados demostraron una mayor producción de células mieloides $CD11b^{+}/Ly6G^{+}/Ly6C^{low}$ a nivel medula ósea, acompañado por un reclutamiento exacerbado hacia diferentes compartimentos, sangre periférica y bazo, en ratones deficientes de IL-10 que cursan un cuadro de IS. Estas características no fueron evidenciadas en el grupo de ratones WT cursando el mismo esquema de IS. Esto sugiere que la IL-10 podría desempeñar un papel clave como regulador negativo del reclutamiento y/o migración de células mieloides hacia diferentes compartimentos durante la IS.

2.3.1 Rol de las células mieloides expandidas en el estado de IS inducido por LPS en ausencia de IL-10

Las células supresoras de origen mieloide aumentan persistentemente en pacientes sépticos y se correlacionan con resultados adversos, debido a su papel clave en la progresión de la IS asociada a sus funciones como la inhibición de la proliferación y producción de citoquinas en los linfocitos T (Mathias *et al.*, 2017). Estudios en modelos murinos demostraron que en ratones IS inducido por LPS, las MDSC adquieren su capacidad supresora en la medula ósea y posteriormente migran a los ganglios linfáticos para inhibir la proliferación de linfocitos (Landoni *et al*., 2016).

Con el objeto de determinar si existe una relación entre la expansión ubicua de las células $CD11b^{+}/Ly6G^{+}/Ly6C^{low}$ en ratones KOIS y la funcionalidad disminuida de los linfocitos, se realizó un ensayo de proliferación en cocultivo. Para ello, se obtuvieron esplenocitos provenientes de ratones WT y KO controles, los cuales fueron estimulados con Concanavalina A y, en simultáneo, cocultivados con células de medula ósea provenientes de ratones KOIS o

controles WT y KO (Figura 12A). Teniendo en cuenta que en el bazo de ratones BALB/c los linfocitos constituyen aproximadamente entre el 40% y el 60% del total de células esplénicas y considerando, además, que en la médula ósea de ratones KOIS aproximadamente el 60% de las células totales corresponden a las células en estudio -$CD11b^{+}/Ly6G^{+}/Ly6C^{low}$- se diseñó este abordaje experimental con el fin de evaluar en un sistema complejo, aunque indirecto, el efecto de las células mieloides sobre la funcionalidad proliferativa de los linfocitos "*naive*" esplénicos.

Los resultados mostraron una disminución significativa en la proliferación de los linfocitos provenientes de ratones KO cocultivados con células de medula ósea de ratones KOIS en comparación al grupo control (linfocitos de ratones KO cocultivados con células de medula ósea de ratones KO). Por otro lado, la proliferación en linfocitos provenientes de ratones WT cocultivados con células de medula ósea de ratones KOIS mostró una tendencia a la disminución en comparación al grupo control (linfocitos de ratones WT cocultivados con células de medula ósea de ratones WT) sin mostrar significancia estadística, pero con una marcada disminución (Figura 12B).

A) **B)**

Figura 12: Modulación de la proliferación celular de esplenocitos controles WT y KO por células de medula ósea de ratones KOIS. Ratones WT y KO fueron inoculados durante diez días consecutivos con dosis crecientes de LPS (0,25 a 50 ug/ratón i.p.), WTIS y KOIS, en paralelo los controles fueron inoculados con solución fisiológica, WT y KO. A las 24 horas

luego de finalizar el esquema de IS se extrajo el bazo y se realizó un homogenato para obtener una suspensión celular. Los esplenocitos obtenidos fueron teñidos con CFSE 5µM y estimulados por 72hs con Concanavalina A 2µg/ml (ConA), o sin estimulo (SE). Luego por citometría de flujo en el *gate* de linfocitos se analizó la mediana de intensidad de florescencia en FL1, solapando histogramas de células SE y ConA se estableció el *Marker* el cual permitó cuantificar el porcentaje de las células CFSElow. **A)** Ilustración del ensayo de proliferación celular en cocultivo **B)** Porcentaje de células CFSElow de esplenocitos controles, WT y KO, cocultivados con células de médula ósea de ratones controles, WT y KO, o KOIS, estimuladas por 72 horas con ConA, 2µg/ml. Relación de cocultivo 1:2, 1esplenocito:2medula ósea (1B:2MO), *p<0,05 versus grupo KO; *t-student* no pareado. En el gráfico cada barra representa la media ± SEM de n= 5 ratones por grupo de dos experimentos realizados de forma independiente bajo las mismas condiciones experimentales.

En conjunto, estos resultados sugieren que la interacción entre los linfocitos y las células de médula ósea provenientes de ratones KOIS -mayoritariamente de fenotipo $CD11b^{+}/Ly6G^{+}/Ly6C^{low}$- mostraron un efecto supresor significativo sobre la proliferación de los linfocitos en ratones KO, mientras que en los linfocitos de ratones WT se observó una tendencia similar, aunque sin alcanzar significancia estadística. Estos hallazgos respaldan un papel modulador de las células de médula ósea expandidas de ratones KOIS en la regulación de la respuesta proliferativa de los linfocitos, especialmente en condiciones de deficiencia de IL-10. Cabe señalar que en este ensayo no se evaluó específicamente el efecto aislado de esta población celular, por lo que para establecer con mayor certeza esta relación sería necesario realizar experimentos adicionales con poblaciones celulares purificadas. No obstante, los resultados obtenidos aquí sugieren que esta población podría tener un efecto relevante en el contexto del conjunto de las células presentes en la médula ósea.

2.3.2 Capacidad de eliminación bacteriana tras una infección con *S. aureus* en un estado de IS inducido por LPS en ausencia de IL-10

Las deficiencias en componentes clave del sistema inmunológico pueden conducir a un estado de IS profundo, caracterizado por una respuesta inmune deficiente para eliminar infecciones primarias y una mayor susceptibilidad a infecciones secundarias (Delano *et al.,* 2016). Este fenómeno ocurre principalmente a nivel pulmonar, siendo *S. aureus* uno de los microorganismos gram-positivos más frecuentemente aislados (Sakr *et al*., 2018; Dyck *et al.,* 2024).

En este contexto, y con el objetivo de evaluar si en ratones deficientes en IL-10 -que presentan una expansión de células mieloides en distintos compartimentos, con potenciales efectos supresores sobre linfocitos-, se ve afectada la capacidad de eliminación bacteriana, se utilizó un modelo de infección pulmonar por instilación nasal de *S. aureus.*

Para ello, se utilizaron ratones WT y KO en un contexto de IS. Veinticuatro horas después de la última dosis de LPS del protocolo de IS, se indujo la infección pulmonar y, transcurridas 24 horas post-infección, se procedió a cosechar los pulmones para el recuento de bacterias viables expresadas en unidades formadoras de colonias por gramo de tejido pulmonar (UFC/gr), a partir de homogenatos pulmonares. Además, mediante citometría de flujo, se caracterizaron las poblaciones de células mieloides en el compartimento pulmonar.

La infección se realizó con $1*10^7$ UFC de S*. aureus* tal como describe *Wang* en su modelo dual de IS inducida por sepsis utilizando un modelo de CLP seguido de una infección intranasal (Wang *et al.*, 2019). Los resultados mostraron que, tras 24 horas de la infección, los ratones KOIS presentaron una carga bacteriana significativamente mayor en el pulmón en comparación con los grupos WT y KO, evidenciando así una deficiencia en la capacidad de eliminación bacteriana (Figura 13A).

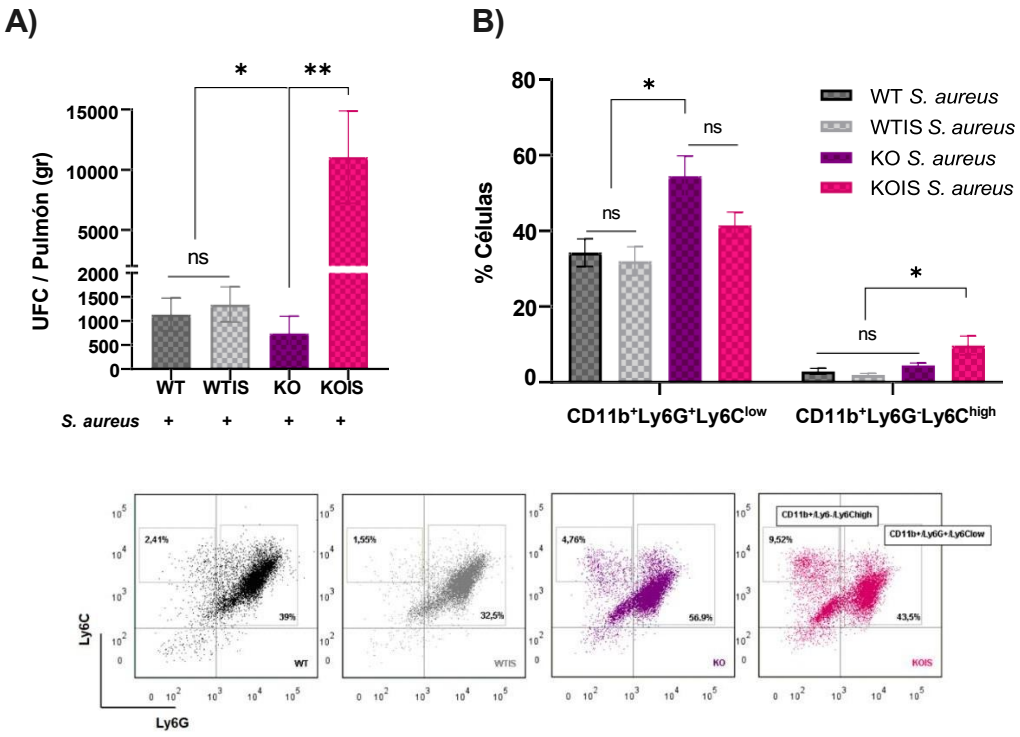


Figura 13: Infección pulmonar con *Staphylococcus aureus* en un estado de IS. Ratones WT y KO fueron inoculados durante diez días consecutivos con dosis crecientes de LPS (0,25 a 50 ug/ratón i.p.), WTIS y KOIS, en paralelo los controles fueron inoculados con PBS, WT y KO. 24 horas después de finalizar el esquema de IS se realizó una infección pulmonar con *Staphylococcus aureus* mediante instilación intranasal de $1*10^7$ UFC. Luego de 24 horas de la infección se extrajeron los pulmones y se realizó un homogenato mediante la disgregación a través de una malla metálica. **A)** Recuento de UFC en placas de agar relativizado al peso del pulmón, se expresa el número de UFC sobre el peso del pulmón en gramos, *p<0,01; **p<0,005; ANOVA de una vía post test de Tukey. **B)** Marcaciones específicas de distintas poblaciones mieloides en compartimento pulmonar que posteriormente fueron analizados por citometria de flujo. Se marcaron PMN-MDSC ($CD11b^+Ly6G^+Ly6C^{low}$) y M-MDSC ($CD11b^+Ly6G^-Ly6C^{high}$) en pulmón. Se expresa el porcentaje de cada tipo celular, *p<0,05; ANOVA de una vía post test de Tukey. En los gráficos cada barra representa la media ± SEM de n= 5 ratones por grupo, de dos repeticiones en las mismas condiciones experimentales.

Al analizar las poblaciones mieloides 24 horas después de la infección, se observó un aumento significativo de células $CD11b^+/Ly6G^+/Ly6C^{low}$ en los ratones KO en comparación con los grupos WT; sin embargo, esta población no se modificó en el contexto de IS, ya que los grupos WTIS y KOIS no mostraron diferencias con sus respectivos controles. En cambio, las células

$CD11b^{+}/Ly6G^{-}/Ly6C^{high}$ experimentaron una expansión significativa exclusivamente en el grupo KOIS, en comparación con el control KO y los grupos WT (Figura 13B).

Estos resultados indican que tras una infección bacteriana en un cuadro de IS la capacidad de *clearance* se ve alterada y podría estar vinculada con la expansión de las células $CD11b^{+}/Ly6G^{-}/Ly6C^{high}$, esto ocurre sólo en ausencia de IL-10.

- **Conclusiones parciales**

De los resultados obtenidos se desprende que, incluso en ausencia de IL-10, es posible inducir un estado IS caracterizado por niveles elevados de GC en plasma, alteraciones histológicas en la zona fasciculada de la corteza adrenal, una respuesta humoral atenuada, linfopenia y neutrofilia. Este estado de IS se asocia con un aumento en el reclutamiento de células mieloides granulocíticas ($CD11b^{+}/Ly6G^{+}/Ly6C^{low}$) en distintos compartimentos, lo que sugiere un papel potencialmente relevante en la respuesta supresora; sin embargo, más experimentos son necesarios para corroborar estos resultados. Asimismo, se observa que en un contexto de IS la capacidad de eliminación bacteriana tras una infección pulmonar se ve comprometida, acompañada de una expansión de células mieloides $CD11b^{+}/Ly6G^{-}/Ly6C^{high}$ a nivel pulmonar. Estos hallazgos aportan evidencia sólida sobre el impacto de la ausencia de IL-10 en la respuesta inmune y su relación con la susceptibilidad a infecciones en un contexto de IS; sin embargo, se requieren más estudios para demostrar de manera concluyente la relación directa entre estas poblaciones celulares y los efectos observados.

Discusión

La sepsis es una enfermedad de gran impacto en la salud pública debido a la alta tasa de morbilidad y mortalidad en pacientes hospitalizados en UCI. Las últimas estimaciones globales de incidencia y mortalidad indican que hubo 48,9 millones de casos de sepsis y 11,0 millones de muertes relacionadas con sepsis en 2017. Estas estimaciones son más del doble que el último reporte global, teniendo en cuenta esta situación crítica, la Organización Mundial de la Salud reforzó las recomendaciones para impulsar las investigaciones en el desarrollo de nuevos tratamientos y métodos de diagnóstico (OMS, 2020). En este sentido resulta de gran relevancia generar conocimiento que permita comprender la dinámica de la fisiopatología y sus agentes involucrados.

El cuadro clínico del paciente séptico implica una respuesta inmune desregulada que varía en el tiempo y se caracteriza por el predominio de una respuesta proinflamatoria exacerbada durante etapas tempranas; a medida que la sepsis progresa hacia etapas tardías, pasa a ser predominante una respuesta antiinflamatoria e inmunosupresora, que impacta directamente en la evolución del paciente (Van der Poll *et al.,* 2021). En las últimas décadas, gracias a las guías para el manejo clínico de la sepsis un porcentaje creciente de pacientes sobreviven al período inicial de respuesta inflamatoria sistémica, pero una proporción significativa de los pacientes finalmente sucumben frente a infecciones nosocomiales tardías (Otto *et al*., 2011; Oczkowski *et. al*., 2022).

La alta tasa de mortalidad de la sepsis tardía y el limitado éxito de múltiples ensayos clínicos dirigidos a modular la respuesta inmune del hospedador, indican que existe una comprensión limitada de la patología (Wu *et al*., 2024). En este sentido, muchas investigaciones han implicado a la IS como un denominador importante de la mayor susceptibilidad de los pacientes a infecciones secundarias y mortalidad tardía. Cabe señalar que, a pesar del creciente conocimiento sobre la IS en la sepsis, sigue sin estar claro qué mecanismos inician y conducen a la desviación sostenida de la homeostasis y en qué medida esto influye en el resultado clínico (Torres *et al.,* 2021b). Así, en el presente trabajo de tesis doctoral se intenta aclarar el papel de dos mediadores con propiedades antiinflamatorias- inmunosupresoras, la IL-10 y los GC, y su relación con la expansión de las células mieloides con potenciales

propiedades inmunosupresoras en distintos estadios de la sepsis. Para esto, se utilizaron modelos murinos que permiten recapitular diferentes aspectos de la dinámica de la fisiopatología en la sepsis.

Estadios tempranos de la sepsis

Entre los diversos agentes etiológicos aislados de muestras de pacientes sépticos los más comúnmente identificados continúan siendo las bacterias gramnegativas (Dyck *et al*., 2024). Estas presentan en sus membranas endotoxinas bacterianas como ser los lipopolisacáridos -LPS- los cuales tienen un rol central en el desarrollo de la enfermedad, y es por ello que se utilizan en amplios abordajes de experimentación para el estudio de cuadros inflamatorios asociados a infección. Así la estimulación con LPS en modelos murinos es capaz de inducir inicialmente una producción exacerbada de citoquinas proinflamatorias que pueden conducir a una falla multiorgánica y a la muerte, asemejándose a un shock séptico. Por otro lado, frente a exposiciones repetidas, el LPS es capaz de inducir un estado antiinflamatorio conocido como tolerancia a endotoxinas, el cual conduce al hospedador a una refractariedad temporal frente a una dosis letal de LPS. Por estas razones, la estimulación con LPS para inducir tanto un contexto inflamatorio como un estado de tolerancia representa un modelo atractivo para estudiar de forma discreta diferentes aspectos del síndrome (Wiśnik *et al*., 2017; Cavaillon, 2018).

A fin de recapitular estadios tempranos de la sepsis se llevó a cabo el modelo de shock endotóxico inducido por una única dosis de LPS, con particular énfasis en indagar sus efectos en ausencia de IL-10 utilizando para ello ratones *knock-out* de IL10 (KO) con *background* BALB/c.

Los resultados obtenidos en esta tesis demuestran que los ratones KO presentan una sensibilidad marcadamente aumentada a la endotoxina, evidenciada por una dosis letal 50 (LD_{50}) 200 veces menor en comparación con los ratones WT. Este hallazgo es consistente con estudios previos, en los que también se reporta una mayor sensibilidad en ratones KO, aunque con una dosis letal de LPS 20 veces menor que la requerida para ratones WT (Berg *et*

al., 1995). Esta discrepancia en el grado de sensibilidad podría atribuirse a diferencias en el *background* genético ya que en el estudio citado se utilizaron ratones KO C57BL/6, mientras que en el presente trabajo se emplearon ratones KO con *background* BALB/c. Diversos estudios han documentado que estas dos cepas exhiben perfiles inmunológicos distintos, lo que podría explicar la diferencia observada en la respuesta y sensibilidad al LPS (Trunova *et al*., 2011; Fornefett *et al*., 2018; Bernal *et al.,* 2021). Además, estudios que emplean estrategias de neutralización de IL-10 también muestran un aumento en la letalidad inducida por LPS, lo que refuerza el concepto de que la IL-10 desempeña un papel protector clave frente a la inflamación inducida por la endotoxina (Standiford *et al.,* 1995; Noto *et al.,* 2017).

Tras el desafío con LPS, los ratones WT exhibieron un incremento transitorio en la concentración plasmática de citoquinas proinflamatorias y antiinflamatorias. Este perfil es coherente con lo propuesto por Cavaillon y colaboradores, quienes señalan que el LPS actúa como un potente estímulo inflamatorio que activa bucles auto amplificadores mediados por monocitos/macrófagos, los cuales se autorregulan parcialmente mediante la acción de IL-10, limitando así la liberación de citoquinas proinflamatorias (Cavaillon, 2018).

En contraste, los ratones KO mostraron una respuesta exacerbada y más sostenida en los niveles plasmáticos de citoquinas proinflamatorias como TNF-α, IL12, IL-6 e IFN-γ. En ausencia de IL-10, una citoquina clave con funciones antiinflamatorias e inmunorreguladoras, el TGF-β, podría representar un mediador alternativo con capacidad de limitar la inflamación, dado que suprime la producción de TNF-α e IL-1β y promueve la liberación de receptores solubles como sTNF-R e IL-1ra (Chousterman *et al.,* 2017). Sin embargo, aunque los ratones KO mostraron un incremento de TGF-β en plasma, esta respuesta fue más tardía y no logró contrarrestar eficazmente la producción masiva de citoquinas proinflamatorias.

Por otro lado, los niveles elevados y sostenidos de TNF-α en plasma durante al menos 6 horas, evidencian claramente un rol de la IL-10 como mediador antiinflamatorio clave para controlar/modular tanto los niveles como la cinética

de esta citoquina. Estos resultados se encuentran en concordancia con otros estudios donde observaron que ratones deficientes de IL-10 tratados con un vector recombinante de adenovirus que codifica para la IL-10 humana (rAAVhIL10), presentaron una mejora en el *score* clínico de severidad, asociado a la regulación negativa en la producción de TNF-α en plasma (Yamano *et al*., 2001). Asimismo, en un modelo de inflamación de las vías respiratorias inducido por LPS, el tratamiento con IL-10 atenuó la expresión de TNF-α tanto en el tejido pulmonar como en los compartimentos de las vías aéreas (Schwab *et al*., 2025).

El TNF-α ejerce sus actividades pleiotrópicas a través de dos receptores de superficie celular, TNFRI (p55TNFR, CD120a) y TNFRII (p75TNFR, CD120b), ambos con expresión ubicua. Aunque comparten similitudes estructurales en sus dominios extracelulares, sus regiones intracelulares difieren en su capacidad de señalización: TNFRI posee un dominio intracelular de muerte que puede inducir apoptosis, que está ausente en el TNFRII. Ambos receptores pueden escindirse proteolíticamente de la membrana y liberarse como formas solubles (sTNFR), que circulan en condiciones basales y cuyos niveles aumentan en contextos inflamatorios, incluyendo la estimulación por LPS o TNF-α (Holbrook *et al.,* 2019). En el presente trabajo, se observó un incremento significativo en el porcentaje de células de tipo monocitos y polimorfonucleares de ratones KO expresando TNFRII seis horas después del desafío con LPS, incremento que no se evidenció en ratones WT. Este hallazgo sugiere que la IL-10 podría ejercer un efecto modulador no solo sobre la producción de TNF-α, sino también sobre la expresión de su receptor en la superficie celular.

En este sentido, un estudio *in vitro* en monocitos humanos tratados con IL-10 evidenció que esta citoquina induce la liberación del sTNF-RII y regula negativamente la expresión de TNF-RII en membrana celular. Así, además de inhibir la secreción de TNF-α, la IL-10 controlaría la síntesis y el recambio del receptor TNFRII, limitando su actividad biológica. El desprendimiento de los receptores, junto con la reducción aguda en su expresión de superficie, podría representar un mecanismo de desensibilización transitoria frente al TNF-α. Al mismo tiempo, las formas solubles podrían actuar como atenuadores

fisiológicos, al competir con los receptores de membrana por el ligando, disminuyendo así la actividad biológica de TNF-α (Joyce et al., 1994; Holbrook *et al.,* 2019). En este contexto, la elevada sensibilidad de los ratones KO a la endotoxina podría estar relacionada con un mayor número de interacciones funcionales entre TNF-α y sus receptores celulares. No obstante, la relevancia funcional de la expresión diferencial de TNF-RII en leucocitos de ratones KO y WT no fue completamente aclarada en este trabajo, por lo que se requerirían estudios adicionales para caracterizar su implicancia.

En conjunto, los resultados permiten sugerir que la mayor sensibilidad al LPS observada en los ratones KO podría estar vinculada no solo a una elevación en los niveles plasmáticos de TNF-α, sino también a una mayor disponibilidad de sus receptores de membrana. Alternativamente, dicha sensibilidad también podría estar favorecida por una reducción en las concentraciones de receptores solubles, los cuales normalmente contribuyen a neutralizar el TNF-α circulante y mitigar su efecto biológico. La validación de estas hipótesis requerirá ensayos futuros que integren la expresión de receptores en superficie celular con la cuantificación de sus formas solubles.

En cuanto al número de leucocitos, tras el desafío con LPS se observó una disminución significativa de monocitos y PMN en sangre periférica de ratones WT y KO, fenómeno que podría estar asociado al reclutamiento de leucocitos al sitio de inoculación de LPS. Sin embargo, en los ratones KO la reducción de PMN fue aún mayor que en los ratones WT sugiriendo así, que la IL-10 tendría algún rol en la regulación del reclutamiento de PMN. Acorde con este resultado, Cuzzocrea y sus colegas demostraron que la ausencia de IL-10 favorece una mayor migración de PMN hacia pulmón o cartílago en modelos murinos de inflamación, como lesión pulmonar o artritis respectivamente (Cuzzocrea *et al.,* 2001; Cuzzocrea *et al*., 2002). Por otro lado, considerando que la activación del receptor TNF-RI desencadena señales intracelulares asociadas a apoptosis (Holbrook *et al.,* 2019), el incremento significativo de su expresión en células compatibles con PMN observado exclusivamente en ratones KO podría contribuir a la reducción periférica de esta población celular tras el desafío con LPS.

La inflamación sistémica inducida por LPS, junto con el reclutamiento masivo de leucocitos, promueve daño tisular multiorgánico, incluyendo el hepático y renal, lo que puede evolucionar hacia shock y disfunción multiorgánica (Xu *et al.*, 2014; Kasper *et al.*, 2020). En este trabajo, se observó un incremento de marcadores bioquímicos de daño tisular en ambos grupos experimentales, aunque los niveles de AST fueron significativamente más elevados y aparecieron en etapas más tempranas en los ratones KO. Estos hallazgos se correlacionan con una respuesta inflamatoria más exacerbada en ausencia de IL-10.

Se ha propuesto que el TNF-α participa activamente en la génesis del daño hepático al inducir la producción de quemoquinas y otras citoquinas que promueven la infiltración local de neutrófilos y monocitos (Zhao *et al.*, 2020). En consonancia, el análisis histopatológico reveló un daño tisular más severo en ratones KO, evidenciado por una disminución significativa en la cantidad de células PAS+ en el hígado, lo que sugiere una menor capacidad de almacenamiento de glucógeno por los hepatocitos.

Además, se detectó un aumento en la expresión tisular de TNF-α tanto en hígado como en riñón de ratones KO desafiados con LPS. En línea con estos resultados, se ha demostrado que la IL-10 protege al hígado frente a la lesión inducida por endotoxina, al antagonizar la apoptosis mediada por citoquinas proinflamatorias y pro-apoptóticas, como TNF-α y TGF-β. La secreción de estos mediadores y la expresión de sus receptores (TNFR-II, TGF-βRI/RII) son inducidas por el LPS y negativamente reguladas por la IL-10 (Zhong *et al.,* 2006).

Al explorar la relación entre la IL-10 y los GC, se observó un aumento significativo de corticosterona tanto en ratones KO como WT después del estímulo con LPS, siendo significativamente mayor en los ratones KO. Este hallazgo podría interpretarse como un mecanismo compensatorio intrínseco frente a la ausencia de IL-10, en el cual se exacerba la producción de otro mediador antiinflamatorio con el fin de controlar la respuesta inflamatoria temprana. En esta misma línea, se detectó también un aumento de TGF-β, otro mediador antiinflamatorio que, al igual que la IL-10 participa en la inhibición del

TNF-α (Doganyigit *et al.,* 2022). Sin embargo, que los niveles de corticosterona aparezcan elevados en condiciones basales en los ratones KO, permite sugerir que la IL-10 ejerce una regulación negativa sobre los niveles de GC, tal como han mencionado otros autores (Koldzic-Zivanovic *et al*., 2006).

Por otro lado, frente al tratamiento con GC exógenos, como la DEX, se observó que el tratamiento indujo una fuerte refractariedad frente a una dosis letal de LPS en ratones WT, pero no así en ratones KO, lo que indica que la DEX en ausencia de IL-10 no puede ejercer completamente su papel antiinflamatorio/refractario frente al desafío con la endotoxina.

Este hallazgo puede considerarse desde al menos dos perspectivas. En primer lugar, desde mediados de la década de 1980 se ha establecido el rol crítico del TNF-α en la letalidad asociada a respuestas hiper-inflamatorias (Eichacker *et al.,* 1985; Tracey *et al.,* 1988). En este estudio, los ratones KO expuestos a dosis de LPS de 5 y 50 µg mostraron niveles significativamente mayores de TNF-α que los ratones WT, lo que es consistente con su mayor mortalidad. Sin embargo, los niveles elevados de TNF-α no se correlacionaron directamente con la supervivencia, ya que, a pesar de que la DEX logró reducir considerablemente su concentración en plasma, este efecto no se tradujo en un aumento de la sobrevida en ratones KO. Este resultado sugiere la posible participación de otros factores inflamatorios o mecanismos fisiopatológicos que contribuyen a la mortalidad.

Alternativamente, los ratones KO podrían presentar una mayor sensibilidad al TNF-α, posiblemente mediada por una mayor densidad de receptores de membrana (TNF-R), que facilitarían la señalización inflamatoria y superarían el efecto refractario inducido por la DEX. La ausencia de IL-10 parecería ser un factor más determinante que la sola reducción de TNF-α en la progresión hacia la muerte, aunque esta hipótesis requiere validación experimental adicional.

En este sentido, futuros estudios deberían incluir la evaluación de la expresión tisular de receptores de TNF-α, particularmente en órganos como el hígado, donde se ha informado una sobreexpresión basal de TNF-RII en ratones KO (Zhong *et al*., 2006). Asimismo, sería relevante indagar la participación del

TGF-β, un mediador con funciones duales: mientras que en células inmunes promueve efectos inmunosupresores, en tejidos como el hígado, pulmón y vasculatura puede inducir la producción de citoquinas proinflamatorias, favoreciendo así el daño tisular (Pittet *et al*., 2001; Garcia-Lazaro *et al*., 2005; Liu *et al*., 2024).

La integración de estos aspectos permitiría dilucidar el papel del TNF-α en la mortalidad observada en ratones KO y establecer si el TGF-β asume un rol compensatorio o patológico en ausencia de IL-10.

Estadios tardíos de la sepsis

En pacientes sépticos que permanecen internados por períodos prolongados en unidades de cuidados intensivos (UCI), suele desarrollarse un estado de inmunosupresión (IS) severa, que impacta negativamente en la evolución clínica. Dado que la tolerancia a endotoxinas ha sido señalada como la principal causa de la IS inespecífica en estos pacientes (López-Collazo *et al.,* 2024; Wiśnik *et al*., 2017), en esta tesis se utilizó un modelo murino de tolerancia a LPS, el cual permite recapitular características propias de estadios avanzados de la sepsis.

Trabajos previos del laboratorio han demostrado que un esquema prolongado de administración de LPS genera signos de IS más evidentes que los observados con los esquemas de tolerancia habitual, requiriendo un mayor número de inoculaciones de LPS (Rearte, Maglioco *et al*., 2010).

La característica distintiva de este modelo es la reprogramación leucocitaria que define la hiporreactividad frente a un desafío con LPS después de un primer encuentro con la endotoxina. Un marcador ampliamente aceptado que denota el establecimiento del fenómeno de tolerancia es la disminución en los niveles de TNF-α en respuesta a un segundo estímulo con LPS (Liu *et al*., 2019). Así, en este trabajo tanto ratones WT como KO mostraron una marcada disminución en los niveles de TNF-α a lo largo del esquema de inoculación con LPS, en comparación con el aumento agudo observado tras el primer estímulo. Esto refleja el establecimiento del estado refractario frente al LPS. Cabe

destacar que, si bien tras el primer desafío los ratones KO presentaron niveles significativamente más altos de TNF-α en plasma respecto a los WT, estos niveles no resultaron letales.

A pesar de que la tolerancia pudo establecerse en ausencia de IL-10, esto solo fue posible mediante el uso de dosis muy bajas de LPS durante el esquema de sensibilización, lo que permitió evitar la inducción de una respuesta inflamatoria exacerbada y letal. No obstante, la tolerancia inducida en ratones KO resultó ser extremadamente frágil, ya que solo se mantuvo ante exposiciones subsiguientes a dosis bajas. Cuando estos animales fueron expuestos a dosis equivalentes a la letal para ratones WT, el fenómeno de tolerancia se desarticuló por completo.

La refractariedad al LPS es considerada una adaptación fisiológica del hospedador orientada a limitar la inflamación excesiva durante infecciones bacterianas. Sin embargo, aunque esta respuesta contribuye a proteger contra el daño sistémico, también ha sido implicada como una causa central de la inmunosupresión en sepsis (López-Collazo *et al.,* 2024; Seeley *et al.,* 2017). En este sentido, los resultados aquí presentados muestran que los ratones KO, al finalizar el esquema de tolerancia, exhibieron marcados signos de IS: linfopenia y neutrofilia significativa, una respuesta inmune celular disminuida -evidenciada por una menor proliferación linfocitaria frente a un estímulo mitógeno- y una reducción en la respuesta humoral, expresada como una caída significativa en los títulos de anticuerpos anti-GRC. Si bien estos indicadores también se observaron en los ratones WT, su magnitud fue notablemente menor.

En conjunto, estos resultados confirman que el modelo de tolerancia/IS inducido por LPS empleado es válido para el estudio de estados de inmunosupresión. Sobre esta base, el presente trabajo se orienta a dilucidar el papel de mediadores clave en la instalación y mantenimiento de la IS, con énfasis en la participación de IL-10 y su potencial interacción funcional con los GC.

Al evaluar la participación de los GC, se observó que los ratones KOIS no solo presentaban niveles elevados de GC en plasma, sino también un

agrandamiento relativo de la zona fascicular en la corteza de la glándula suprarrenal, en comparación con los ratones WTIS. Estos hallazgos sugieren que, en ausencia de IL-10, el incremento de los niveles de GC en plasma en un contexto de IS podría estar asociado a modificaciones morfo-histológicas en la región de la glándula adrenal responsable de la producción de GC. Estos resultados se alinean con lo propuesto por con Koldzic- Zivanovic y colegas quienes indicaron que la IL-10 actúa como regulador negativo de la síntesis de GC y demostraron que el receptor 1 de la IL-10 (IL-10RI) se expresa, predominantemente, en la zona fascicular de la glándula suprarrenal (Koldzic-Zivanovic *et al.,* 2006).

Estudios previos del laboratorio han demostrado que la administración de mifepristona (RU486), un antagonista del receptor de GC, revierte la tolerancia/IS inducida por LPS, destacando un papel central de los GC en el mantenimiento del fenómeno (Rearte*,* Maglioco *et al.,* 2010). Basándose en ello, en el presente trabajo se investigó si los elevados niveles de GC observados en ratones KO podrían contribuir tanto al mantenimiento como al establecimiento de dicho fenómeno. En la fase de mantenimiento, se evidenció que en ratones WT la administración de RU486 interrumpió la tolerancia aproximadamente 24 horas después del desafío con LPS, tal como se había reportado previamente (Rearte, Maglioco *et al.*, 2010). En contraste, en ratones KO la interrupción fue significativamente más temprana, observándose a las 6 horas post-desafío.

Por otro lado, en la fase de establecimiento, a diferencia de lo reportado en ratones WT, en ratones KO se observaron signos de inflamación intensa, como temblores, diarrea, letargo y pelo erizado, a lo largo del proceso de establecimiento de la tolerancia, alcanzando una mortalidad del 40%.

Estos resultados sugieren que, en ausencia de IL-10, los GC endógenos podrían desempeñar un rol esencial tanto en la instalación como en el mantenimiento del estado de tolerancia/IS. Sin embargo, si bien se observó una desarticulación parcial del fenómeno durante la fase de establecimiento en ratones KO, no se observó una diferencia significativa ni condujo a una

mortalidad total, lo que indica la necesidad de estudios adicionales para dilucidar la interacción funcional entre la IL-10 y los GC en este contexto.

Respecto a las alteraciones a nivel celular que se dan en cuadros de IS, los resultados de esta tesis evidenciaron que los ratones IS presentaban una marcada linfopenia asociada principalmente a la disminución de linfocitos B y linfocitos TCD4+, tanto en sangre periférica como en bazo. Este patrón concuerda con lo reportado en pacientes sépticos, donde también se describe una disminución de linfocitos en sangre y tejidos linfoides (Andreu-Ballester *et al*., 2022). Simultáneamente, se observó una expansión de células mieloides con fenotipo $CD11b^{+}/Ly6G^{+}/Ly6C^{low}$ en sangre, bazo y médula ósea, en línea con hallazgos descritos en modelos experimentales de sepsis (Watanabe *et al.,* 2024).

Si bien esta tendencia celular se evidenció en ambos grupos de ratones IS, fue particularmente marcada en los ratones KOIS, donde tanto la linfopenia como la expansión mieloide fueron más severas, lo que sugiere una contribución relevante de la IL-10 en la regulación de ambos procesos. En este sentido, se ha demostrado que la IL-10 puede atenuar la apoptosis linfocitaria al inducir la expresión de Bcl-2 e interferir con la muerte celular mediada por activación (Ayala *et al*., 2001; Tschoeke *et al.,* 2008). Por lo tanto, podría sugerirse que en ausencia de IL-10, la pérdida de señales antiapoptóticas podría contribuir a una mayor disminución de linfocitos, exacerbando así el cuadro de IS.

A diferencia de lo observado en el linaje linfoide, en las células mieloides -y en particular en las células supresoras de origen mieloide (MDSC)- la evidencia científica indica que la IL-10 favorece su expansión. De hecho, tanto la citoquina proinflamatoria IL-6 como la citoquina antiinflamatoria IL-10 pueden inducir la activación de células mieloides inmaduras hacia un fenotipo MDSC, mediante la inducción de S100A9 tras la fosforilación de STAT3 (Yaseen *et al*., 2020). La IL-10, en particular, induce la activación de STAT3 y media la translocación de S100A9 desde el citosol al núcleo donde promueve la expresión de ciertos microARN (miARN-21 y miARN-181b), los cuales favorecen la estabilización del complejo STAT3-C fosforilado/EBP β. El aumento de la expresión de estos microARN da como resultado una mayor

expresión de NFI-A, factor de transcripción relacionado con la diferenciación mieloide, que conduce a la expansión de las MDSC inmunosupresoras durante la sepsis tardía. De esta manera, la IL-10 impulsa no solo la expansión de las MDSC, sino que también la activación del fenotipo inmunosupresor (Bah *et al*., 2018b; Alkhateeb *et al*., 2019).

En este contexto, es posible hipotetizar que en ausencia de IL-10, como en los ratones KO, la expansión de células mieloides observada podría estar mediada por otros factores inmunorreguladores como los glucocorticoides (GC) o la IL-6. Existen evidencias que sostienen que tanto los GC como la IL-6 pueden regular la expansión y funcionalidad de las MDSC (Zhao *et al*., 2018; Sharma *et al*., 2021). En esta tesis se demostró que los ratones KO en estado de IS presentan niveles plasmáticos de GC elevados y sostenidos a lo largo del esquema de inducción de tolerancia/IS, lo cual refuerza esta posibilidad, aunque serán necesarios estudios adicionales para esclarecer el rol específico de los GC en este contexto.

Por otra parte, entre las múltiples funciones de la IL-10, estudios pioneros demostraron que limita la capacidad de proliferación de los linfocitos frente a estímulos mitógenos. La adición de IL-10 a cultivos de linfocitos T estimulados con ConA, produce una inhibición del 70 al 90% de la proliferación. Estos efectos inhibidores están inversamente relacionados con la concentración del mitógeno y podían revertirse mediante la adición del anticuerpo monoclonal neutralizante anti-IL-10 (Ding *et al.,* 1992; Nakahata *et al.,* 1992; De Waal Malefyt et al., 1993). En concordancia con estos antecedentes, en esta tesis se observó una proliferación significativamente mayor de linfocitos en ratones KO respecto de los WT.

Sin embargo, la proliferación de linfocitos de ratones KO fue inhibida en un 14% al cocultivarse con células de médula ósea de ratones KOIS enriquecidas en células $CD11b^{+}/Ly6G^{+}/Ly6C^{low}$. A pesar de que estos resultados se obtuvieron a partir de suspensiones celulares totales y no de poblaciones purificadas, la capacidad supresora observada, junto con el perfil de marcadores de superficie celular, permite sugerir que la población celular que se expande en un contexto de IS y ausencia de IL-10 podrían asociarse a

células MDSC (Bronte *et al*., 2016; Mathias *et al.,* 2017). Sin embargo, para confirmar esta hipótesis, estudios futuros deberán evaluar si la depleción in vivo de estas células mediante anticuerpos anti-GR1 permite revertir la supresión y restaurar la capacidad proliferativa de los linfocitos.

La MDSC además de presentar efectos supresores sobre poblaciones linfoides, también modulan la capacidad de eliminación bacteriana. Diferentes modelos de infección crónica con *S. aureus* han informado el incremento de las células MDSC y su efecto sobre el *clearance* bacteriano. Así, Tebartz y colegas demostraron que al aumentar el número de MDSC mediante la transferencia adoptiva de células de ratones donantes, se produce una exacerbación de la infección por *S. aureus* en ratones que reciben MDSC, en comparación con animales que recibieron esplenocitos libres de MDSC (Tebartz *et al*., 2015), evidenciando así el impacto negativo de MDSC en el control de la infección por *S. aureus.*

En sentido opuesto la depleción dirigida de MDSC y neutrófilos utilizando el mAb 1A8 (anti-Ly6G), mejoró el *clearance* bacteriano junto con el perfil proinflamatorio intrínseco de los monocitos y macrófagos infiltrados, demostrando así, que las MDSC contribuyen de manera clave a la cronicidad de la infección facilitando la persistencia de la de *S. aureus* (Heim et al., 2014).

En esta tesis, la infección pulmonar inducida por *S. aureus* en un contexto de IS reveló que los ratones KOIS presentaron una disminución en la capacidad de eliminación bacteriana, evidenciada por el aumento significativo de unidades formadoras de colonias (UFC) en pulmón. A su vez, se observó una expansión significativa de células mieloides $CD11b^{+}/Ly6G^{-}/Ly6C^{high}$ en el tejido pulmonar de estos animales.

Este hallazgo es coherente con estudios que reportan la acumulación y persistencia de estas poblaciones en tejidos de ratones infectados con *S. Typhimurium*, donde el receptor CCR2 es clave para su migración desde la médula ósea hacia los sitios de infección (Tam *et al.,* 2014). Estas células producen óxido nítrico (NO, del inglés: *Nítric Oxide*), una molécula con propiedades antimicrobianas que, además, inhibe la función de los linfocitos T

a través de la vía iNOS. Por tanto, la expansión de estas células mieloides inmaduras productoras de NO podría representar un mecanismo común en diversas infecciones crónicas, contribuyendo al establecimiento de la IS (Tam *et al.,* 2014).

Una limitación importante del presente trabajo fue el hecho de no poder extender estos análisis a un modelo de sepsis experimental como lo es el CLP (del inglés: *Cecal Ligation Puncture*) que permite el estudio longitudinal de los mecanismos subyacentes a la sepsis.

El modelo CLP fue desarrollado hace más de 30 años y refinado de forma tal que se considera un modelo realista para la inducción de sepsis polimicrobiana. Debido a que el ciego es una fuente endógena de contaminación bacteriana, su perforación da como resultado una peritonitis bacteriana, que es seguida por la translocación de bacterias entéricas mixtas al compartimento sanguíneo. Esta bacteriemia desencadena la activación sistémica de la respuesta inflamatoria, el posterior shock séptico, la disfunción multiorgánica y, finalmente, la muerte (Drechsler *et al.,* 2021). Una de las ventajas de este modelo es su versatilidad, permite ajustar la severidad del cuadro clínico inducido según el calibre con el que se realiza la perforación del ciego y/o la longitud que se liga.

Los ratones sometidos a CLP desarrollan signos clínicos compatibles con sepsis, incluyendo hipotermia, taquicardia y taquipnea. Además, estudios previos han demostrado que los animales que mueren en las primeras fases del modelo exhiben una respuesta inflamatoria exacerbada, mientras que aquellos que fallecen en etapas tardías presentan signos de IS, como una menor producción de IL-6 y un incremento en la carga bacteriana (Xiao *et al.,* 2006; Wang, 2019).

En la presente tesis la puesta a punto del modelo CLP no pudo ser extrapolada a los ratones KO debido su elevada letalidad, aunque se realizó el ajuste del modelo generando la punción del ciego con agujas de menor calibre que las utilizadas para ratones WT, se modificó el calibre de 25G a 30G, los ratones KO sobrevivieron a la cirugía -sin pérdida de peso inadmisible ni signos de dolor- pero el seguimiento longitudinal resultó demasiado acotado. Además,

posteriormente a la cirugía del CLP en el día 3-4 cuando se evidenciaban signos de IS se realizó la infección secundaria con 1x10*7 UFC de *S. aeurus*, lo cual aumentó significativamente la letalidad haciendo que sea imposible de realizar el modelo en los ratones KO. Por lo tanto, para futuros estudios podría evaluarse la posibilidad de modular el grado de agresión quirúrgica mediante la reducción del segmento cecal a ligar o la implementación de un tratamiento antibiótico profiláctico previo a la punción, con el objetivo de disminuir la carga bacteriana liberada y de esta forma reducir la gravedad del cuadro tal que permita incorporar a futuros ensayos al grupo KO.

En conjunto, los hallazgos obtenidos en esta tesis doctoral permiten proponer que, durante las fases tempranas del proceso inflamatorio, la IL-10 actúa como un regulador clave de la inflamación aguda, particularmente a través de la modulación de los niveles y la actividad biológica del TNF-α. Si bien la IL-10 no parece ser estrictamente necesaria para establecer el fenómeno de tolerancia/IS, su ausencia conduce a una forma inestable de IS, donde los GC endógenos no logran ejercer una compensación suficiente frente a la inflamación aguda, aunque sí parecen jugar un rol relevante en el establecimiento y mantenimiento de la tolerancia/IS.

Asimismo, la IL-10 parece limitar el reclutamiento de células mieloides $CD11b^{+}/Ly6G^{+}/Ly6C^{low}$ a diferentes compartimentos, cuya expansión podría estar asociada a mecanismos inmunosupresores. Sin embargo, tras una infección pulmonar por *S. aureus*, se observó una prominente expansión de células $CD11b^{+}/Ly6G^{-}/Ly6C^{high}$, cuya participación podría estar vinculada a la alteración del *clearance* bacteriano a nivel pulmonar. En conjunto, ambas poblaciones celulares mostraron una clara expansión en ausencia de IL-10, lo que sugiere que sus efectos supresores podrían contribuir a exacerbar el estado de IS.

La imposibilidad de implementar el modelo CLP en ratones KO resalta el papel esencial de la IL-10 en el control de la respuesta inflamatoria sistémica frente a una infección polimicrobiana. Aun cuando otros mediadores antiinflamatorios estén presentes, estos no logran compensar adecuadamente su ausencia (Yi *et al*., 2022; Sun *et al.,* 2023; Jensen *et al*., 2021).

En conclusión, los resultados aquí presentados refuerzan la importancia de la acción complementaria entre la IL-10 y los GC en la regulación de la respuesta inmune durante la sepsis, particularmente a través de su influencia en la expansión de células $CD11b^{+}/Ly6G^{+}/Ly6C^{low}$. Estos hallazgos aportan elementos clave para comprender la complejidad del shock y la IS inducidos durante el síndrome séptico, y podrían servir como base para el desarrollo de estrategias terapéuticas más racionales y específicas.

El presente trabajo de tesis doctoral permite proponer que, durante las etapas iniciales de un proceso inflamatorio agudo, la IL-10 cumple un rol clave como regulador de la respuesta inmune, modulando tanto la producción como la actividad biológica del TNF-α. En este contexto, es posible especular que los niveles elevados de glucocorticoides (GC) observados en fases tempranas de la inflamación podrían ser consecuencia de la inducción de mediadores antiinflamatorios como IL-10 y TGF-β, más que responsables directos de la modulación de la cascada inflamatoria.

Asimismo, aunque la IL-10 no resulta estrictamente indispensable para el establecimiento del fenómeno de tolerancia/inmunosupresión (IS) frente a la endotoxina, su ausencia genera un cuadro de IS inestable o parcial, en el que los GC no logran ejercer un efecto compensatorio suficiente para controlar la inflamación exacerbada, aunque sí parecerían desempeñar un papel relevante en la consolidación de dicho estado inmunosupresor.

En conjunto, estos hallazgos refuerzan la noción de una acción complementaria entre IL-10 y los GC en la regulación del equilibrio inflamación/inmunosupresión durante la progresión de la sepsis, aportando elementos que podrían contribuir al diseño de estrategias terapéuticas más racionales y específicas para abordar esta compleja patología.

Bibliografía

– Abe, R. et al., (2008) ‗Up-regulation of interleukin-10 mRNA expression in peripheral leukocytes predicts poor outcome and diminished human leukocyte antigen-DR expression on monocytes in septic patients', The Journal of surgical research, 147(1), 1–8. https://doi.org/10.1016/j.jss.2007.07.009.

– Adcock, I., and Mumby, S. (2016) ‗Glucocorticoids'. In Handbook of ExperimentalPharmacology (pp. 171–196). https://doi.org/10.1007/164_2016_98.

– Adelman, M.W. et al. (2020) ‗The gut microbiome's role in the development, maintenance, and outcomes of sepsis', Critical Care. BioMed Central Ltd. Available at: https://doi.org/10.1186/s13054-020-02989-1.

– Adib-Conquy, M. et al. (2000) ‗NF-B Expression in Mononuclear Cells of Patients with Sepsis Resembles That Observed in Lipopolysaccharide Tolerance', Am J Respir Crit Care Med. Available at: www.atsjournals.org.

– Alkhateeb, T. et al. (2019) ‗S100A9 maintains myeloid-derived suppressor cells in chronic sepsis by inducing miR-21 and miR-181b', Molecular Immunology, 112, pp. 72–81. Available at: https://doi.org/10.1016/j.molimm.2019.04.019.

- Amarasinghe, H. E, et al., (2023) ‗Mapping the epigenomic landscape of human monocytes following innate immune activation reveals context-specific mechanisms driving endotoxin tolerance'. BMC Genomics. 7;24(1):595. doi: 10.1186/s12864-023-09663-0. PMID: 37805492; PMCID: PMC10559536.

- Andreu-Ballester, J. C. et al. (2022) ‗Changes of CD3+CD56+ γδ T cell number and apoptosis during hospital admission are related to mortality in septic patients'. Clinical immunology (Orlando, Fla.), 236, 108956. https://doi.org/10.1016/j.clim.2022.108956

– Angus, D.C. and van der Poll, T. (2013) ‗Severe Sepsis and Septic Shock', New England Journal of Medicine, 369(9), pp. 840–851. Available at: https://doi.org/10.1056/NEJMra1208623.

– Arora, J., Mendelson, A.A. and Fox-Robichaud, A. (2023) ‗Sepsis: network pathophysiology and implications for early diagnosis', American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology. American Physiological Society, pp. R613–R624. Available at: https://doi.org/10.1152/AJPREGU.00003.2023.

- Avendaño-Ortiz, J. et al., (2018) ‗PD-L1 Overexpression During Endotoxin Tolerance Impairs the Adaptive Immune Response in Septic Patients via HIF1α'. J Infect Dis. 17;217(3):393-404. doi: 10.1093/infdis/jix279. PMID: 28973671.

— Ayala, A. et al. (2001) ‗IL-10 mediation of activation-induced Th1 cell apoptosis and lymphoid dysfunction in polymicrobial sepsis', Cytokine, 14(1), pp. 37–48. Available at: https://doi.org/10.1006/cyto.2001.0848.

— Bagheri, Y. et al. (2019) ‗IL-10 induces TGF-β secretion, TGF-β receptor II upregulation, and IgA secretion in B cells'. European cytokine network, 30(3), 107–113. https://doi.org/10.1684/ecn.2019.0434

— Bah, I. et al. (2018a) ‗IL-10 induces an immune repressor pathway in sepsis by promoting S100A9 nuclear localization and MDSC development', Cellular Immunology, 332, pp. 32–38. Available at: https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2018.07.003

— Bah, I. et al. (2018b) ‗IL-10 induces an immune repressor pathway in sepsis by promoting S100A9 nuclear localization and MDSC development', Cellular Immunology, 332, pp. 32–38. Available at: https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2018.07.003.

- Bemelmans, M. H. A., Van Tits, L. J. H. and Buurman, W. A. (2017). ‗Tumor Necrosis Factor: Function, Release and Clearance'. Critical reviews in immunology, 37(2-6), 249–259. https://doi.org/10.1615/CritRevImmunol.v37.i2-6.50.

- Bangsgaard, E. O., Hjorth, P. G. et al., (2017) ‗Integrated Inflammatory Stress (ITIS) Model'. Bulletin of mathematical biology, 79(7), 1487–1509. https://doi.org/10.1007/s11538-017-0293-2

— Beishuizen A and Thijs LG (2003) ‗Endotoxin and the hypothalamo-pituitary- adrenal (HPA) axis'. J Endotoxin Res. 9(1):3-24. doi: 10.1179/096805103125001298. PMID: 12691614.

— Berg DJ, et al. (1995) ‗Interleukin-10 is a central regulator of the response to LPS in murine models of endotoxic shock and the Shwartzman reaction but not endotoxin tolerance'. J Clin Invest. 96(5):2339-47. doi: 10.1172/JCI118290. PMID: 7593621; PMCID: PMC185885.

— Bernal, A.M. et al. (2021) ‗Differential Outcome between BALB/c and C57BL/6 mice after Escherichia coli O157:H7 infection is associated with a dissimilar tolerance mechanism', Infection and Immunity, 89(5). Available at: https://doi.org/10.1128/IAI.00031-21.

— Biswas, S.K. and Lopez-Collazo, E. (2009) ‗Endotoxin tolerance: new mechanisms, molecules and clinical significance', Trends in Immunology, pp. 475–487. Available at: https://doi.org/10.1016/j.it.2009.07.009.

— Bone, R.C. et al. (1992) ‗Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis', in Chest, pp. 1644–1655. Available at: https://doi.org/10.1378/chest.101.6.1644.

– Boomer JS et al. (2011) _Immunosuppression in patients who die of sepsis and multiple organ failure‘. JAMA, 306(23):2594-605. doi: 10.1001/jama.2011.1829. PMID: 22187279; PMCID: PMC3361243.

– Boomer, J.S., Green, J.M. and Hotchkiss, R.S. (2014) _The changing immune system in sepsis is individualized immuno-modulatory therapy the answer?‘, Virulence. Taylor and Francis Inc., pp. 45–56. Available at: https://doi.org/10.4161/viru.26516.

– Bornstein, S.R.et al. (2004) _Toll-like receptor 2 and Toll-like receptor 4 expression in human adrenals‘, Hormone and metabolic research, 36(7), 470–473. https://doi.org/10.1055/s-2004-825750.

– Bronte, V. and Zanovello, P. (2005) _Regulation of immune responses by L- arginine metabolism‘, Nature Reviews Immunology, pp. 641–654. Available at: https://doi.org/10.1038/nri1668.

– Bronte, V. et al. (2016) _Recommendations for myeloid-derived suppressor cell nomenclature and characterization standards‘, Nature Communications. Nature Publishing Group. Available at: https://doi.org/10.1038/ncomms12150.

– Cain, D.W. and Cidlowski, J.A. (2017) _Immune regulation by glucocorticoids‘, Nature Reviews Immunology. Nature Publishing Group, pp. 233–247. Available at: https://doi.org/10.1038/nri.2017.1.

– Caraballo, C. and Jaimes, F. (2019) _Organ Dysfunction in Sepsis: An Ominous Trajectory From Infection To Death‘, Yale Journal of Biology and Medicine.

– Carbone L. (2012) _Pain management standards in the eighth edition of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals‘. Journal of the American Association for Laboratory Animal Science: JAALAS, 51(3), 322–328.

– Cauwels, A. et al. (2014) _Extracellular ATP drives systemic inflammation, tissue damage and mortality‘, Cell Death and Disease, 5(3). Available at: https://doi.org/10.1038/cddis.2014.70.

– Cavaillon, J.M. (2018) _Exotoxins and endotoxins: Inducers of inflammatory cytokines‘, Toxicon, 149, pp. 45–53. Available at: https://doi.org/10.1016/J.TOXICON.2017.10.016.

– Cavaillon, J.M. and Adib-Conquy, M. (2006a) _Bench-to-bedside review: Endotoxin tolerance as a model of leukocyte reprogramming in sepsis‘, Critical Care. Available at: https://doi.org/10.1186/cc5055.

– Cerqueira, C., Manfroi, B., and Fillatreau, S. (2019) _IL-10-producing regulatory B cells and plasmocytes: Molecular mechanisms and disease

relevance‘. Seminars in immunology, 44, 101323. https://doi.org/10.1016/j.smim.2019.101323.

– Cerra FB (1985) ‗The systemic septic response: multiple systems organ failure‘, Crit Care Clin, 1(3):591-607. PMID: 3916795.

– Chapman, K., Holmes, M., &Seckl, J. (2013) ‗11B-Hydroxysteroid Dehydrogenases Intracellular Gate-Keepers of Tissue Glucocorticoid Action‘. PhysiologicalReviews, 93(3), 1139–1206. https://doi.org/10.1152/physrev.00020.2012.

– Chen, Z. et al. (2021) ‗Review: The Emerging Role of Neutrophil Extracellular Traps in Sepsis and Sepsis-Associated Thrombosis‘, Frontiers in Cellular and Infection Microbiology. Frontiers Media S.A. Available at: https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.653228.

- Chousterman, B. G., Swirski, F. K., and Weber, G. F. (2017) ‗Cytokine storm and sepsis disease pathogenesis‘. Seminars in immunopathology, 39(5), 517–528. https://doi.org/10.1007/s00281-017-0639-8

– Conaway, E. A et al (2017) ‗Inhibition of Inflammatory Gene Transcription by IL-10 Is Associated with Rapid Suppression of Lipopolysaccharide-Induced Enhancer Activation‘. The Journal of Immunology, 198(7), 2906–2915. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1601781.

– Copeland, S. et al. (2005) ‗Acute inflammatory response to endotoxin in mice and humans‘, Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, 12(1), pp. 60–67. Available at: https://doi.org/10.1128/CDLI.12.1.60-67.2005.

– Cronin L. et al. (1995) ‗Corticosteroid treatment for sepsis: a critical appraisal and meta-analysis of the literature‘. Crit Care Med, 23(8):1430-9. doi: 10.1097/00003246-199508000-00019. PMID: 7634816.

– Cruz-Topete, D. and Cidlowski, J.A. (2014) ‗One hormone, two actions: Anti- And pro-inflammatory effects of glucocorticoids‘, NeuroImmunoModulation, 22, pp. 20–32. Available at: https://doi.org/10.1159/000362724.

– Cuenca, A.G. and Moldawer, L.L. (2012) ‗Myeloid-derived suppressor cells in sepsis: Friend or foe?‘, Intensive Care Medicine, pp. 928–930. Available at: https://doi.org/10.1007/s00134-012-2575-3.

– Cuzzocrea S. et al. (2001) ‗Absence of endogeneous interleukin-10 enhances the evolution of murine type-II collagen-induced arthritis‘. Eur Cytokine Netw, 12(4):568-80. PMID: 11781183.

– Cuzzocrea S. et al. (2002) ‗Absence of endogenous interleukin-10 enhances the evolution of acute lung injury‘. Eur Cytokine Netw, 13(3):285-97. PMID: 12231472.

– Da Silva Correia, J. et al. (2001) ‗Lipopolysaccharide is in close proximity to each of the proteins in its membrane receptor complex. Transfer from CD14 to TLR4 and MD-2', Journal of Biological Chemistry, 276(24), pp. 21129–21135. https://doi.org/10.1074/jbc.M009164200.

– Dai, J. et al. (2017) ‗Intracellular S100A9 promotes myeloid-derived suppressor cells during late sepsis', Frontiers in Immunology, 8(NOV). https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01565.

– Damiani, E., et al., (2015) ‗Effect of performance improvement programs on compliance with sepsis bundles and mortality: a systematic review and meta-analysis of observational studies'. PloS one, 10(5), e0125827. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0125827

– Darden, D.B. et al. (2021) ‗Biomarker Evidence of the Persistent Inflammation, Immunosuppression and Catabolism Syndrome (PICS) in Chronic Critical Illness (CCI) After Surgical Sepsis', Annals of surgery, 274(4), pp. 664–673. doi.org/10.1097/SLA.0000000000005067.

– De Waal M. R; Yssel H and De Vries JE (1993) ‗Direct effects of IL-10 on subsets of human CD4+ T cell clones and resting T cells. Specific inhibition of IL-2 production and proliferation'. J Immunol, 1;150(11):4754-65. PMID: 7684412.

– Delano, M.J and Ward, P.A. (2016) ‗The immune system's role in sepsis progression, resolution, and long-term outcome'. Immunol Rev. 274(1):330-353. doi: 10.1111/imr.12499. PMID: 27782333; PMCID: PMC5111634.

– Delano, M.J. et al. (2007) ‗MyD88-dependent expansion of an immature GR-1 +CD11b+ population induces T cell suppression and Th2 polarization in sepsis', Journal of Experimental Medicine, 204(6), pp. 1463–1474. https://doi.org/10.1084/jem.20062602.

– Dellinger, R.P. et al. (2004) ‗Surviving Sepsis Campaign guidelines for management of severe sepsis and septic shock', Critical Care Medicine, pp. 858–873. https:// doi.org/10.1097/01.CCM.0000117317.18092.E4.

– Deng, C. et al. (2022) ‗Targeting HMGB1 for the treatment of sepsis and sepsis- induced organ injury', Acta Pharmacologica Sinica. Springer Nature, pp. 520–528. doi.org/10.1038/s41401-021-00676-7.

– Denning, N.L. et al. (2019) ‗Damps and nets in sepsis', Frontiers in Immunology. Frontiers Media S.A. doi.org/10.3389/fimmu.2019.02536.

– Dias, D. et al. (2007) ‗Early dexamethasone treatment for septic shock patients: a prospective randomized clinical trial', Sao Paulo Med J.

– Ding L and Shevach EM (1992) _IL-10 inhibits mitogen-induced T cell proliferation by selectively inhibiting macrophage costimulatory function‘, J Immunol. 15;148(10):3133-9. PMID: 1578140.

– Doganyigit, Z., Eroglu, E. and Akyuz, E. (2022). _Inflammatory mediators of cytokines and chemokines in sepsis: From bench to bedside‘. Human & experimental toxicology, 41, 9603271221078871. https://doi.org/10.1177/09603271221078871.

– Dong, X. et al. (2023) _INTRINSIC/EXTRINSIC APOPTOSIS AND PYROPTOSIS CONTRIBUTE TO THE SELECTIVE DEPLETION OF B CELL SUBSETS IN SEPTIC SHOCK PATIENTS‘. Shock (Augusta, Ga.), 60(3), 345-353. https://doi.org/10.1097/SHK.0000000000002174.

– Drechsler, S and Osuchowski, M. (2021) _Cecal Ligation and Puncture‘. Methods in molecular biology (Clifton, N.J.), 2321, 1-8. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1488-4_1.

– Drewry, A. M. et al. (2016) _Comparison of monocyte human leukocyte antigen-DR expression and stimulated tumor necrosis factor alpha production as outcome predictors in severe sepsis: a prospective observational study‘. Critical care (London, England), 20(1), 334. https://doi.org/10.1186/s13054-016-1505-0

- Dyck, B. et al. (2024) _The Impact of Pathogens on Sepsis Prevalence and Outcome‘. Pathogens (Basel, Switzerland), 13(1), 89. https://doi.org/10.3390/pathogens13010089

– Ehrchen, J. M., Roth, J., &Barczyk-Kahlert, K. (2019) _More Than Suppression: Glucocorticoid Action on Monocytes and Macrophages‘. Frontiers in immunology, 10, 2028. https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02028.

– Eichacker PQ. et al (1991) _TNF but not IL-1 in dogs causes lethal lung injury and multiple organ dysfunction similar to human sepsis‘. J Appl Physiol,71(5):1979-89. doi: 10.1152/jappl.1991.71.5 1979. PMID: 1761500.

– Evans, L., et al., (2021) _Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of sepsis and septic shock 2021‘. Intensive care medicine, 47(11), 1181–1247. https://doi.org/10.1007/s00134-021-06506-y.

– Farhana A. and Khan YS. (2024) _Biochemistry, Lipopolysaccharide‘. Treasure Island (FL): StatPearls. PMID: 32119301.

– Fattahi, F. (2018) _Role of complement C5a and histones in septic cardiomyopathy‘. Mol Immunol. 102:32-41. doi: 10.1016/j.molimm.2018.06.006. Epub 2018 Jun 18. PMID: 29914696; PMCID: PMC6139045.

– Fattahi, F., Zetoune, F.S. and Ward, P.A. (2020) ‗Complement as a Major Inducer of Harmful Events in Infectious Sepsis', Shock. Lippincott Williams and Wilkins, pp. 595–605.https://doi.org/10.1097/SHK.0000000000001531.

– Fiorentino, D. F., Bond, M. W. and Mosmann, T. R. (1989) ‗Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones'. The Journal of experimental medicine, 170(6), 2081–2095. https://doi.org/10.1084/jem.170.6.208.

– Fornefett, J. et al. (2018) ‗Comparative analysis of humoral immune responses and pathologies of BALB/c and C57BL/6 wildtype mice experimentally infected with a highly virulent Rodentibacterpneumotropicus (Pasteurella pneumotropica) strain', BMC Microbiology, 18(1). Available at: https://doi.org/10.1186/s12866-018-1186-8.

– Foster SL. and Medzhitov R. (2009) ‗Gene-specific control of the TLR-induced inflammatory response', Clin Immunol, 130:7-15.

– Franchimont, D. et al. (1999) ‗Tumor Necrosis Factor Decreases, and Interleukin-10 Increases, the Sensitivity of Human Monocytes to Dexamethasone: Potential Regulation of the Glucocorticoid Receptor', J Clin Endocrinol Metab. Available at: https://academic.oup.com/jcem/article/84/8/2834/2864429.

– Franchimont, D. et al. (2000) ‗Inhibition of Th1 Immune Response by Glucocorticoids: Dexamethasone Selectively Inhibits IL-12-Induced Stat4 Phosphorylation in T Lymphocytes 1', The Journal of Immunology. Available at: http://journals.aai.org/jimmunol/article-pdf/164/4/1768/1498567/1768.pdf.

– Franchimont, D. et al. (2002) ‗Glucocorticoids and inflammation revisited: The state of the art - NIH Clinical Staff Conference', Neuro Immuno Modulation, pp. 247–260. Available at: https://doi.org/10.1159/000069969.

– Fudulu, D. P, (2021) ‗Co-culture of monocytes and zona fasciculata adrenal cells: An in vitro model to study the immune-adrenal cross-talk'. Mol Cell Endocrinol. 2021 Apr 15;526:111195. doi: 10.1016/j.mce.2021.111195. Epub 2021 Feb 9. PMID: 33571577; PMCID: PMC8024787).

– Funk, D.J., Parrillo, J.E. and Kumar, A. (2009) ‗Sepsis and Septic Shock: A History', Critical Care Clinics, pp. 83–101. Available at: https://doi.org/10.1016/j.ccc.2008.12.003.

– Garcia-Lazaro, J.F. et al. (2005) ‗Hepatic over-expression of TGF-beta1 promotes LPS-induced inflammatory cytokine secretion by liver cells and endotoxemic shock', Immunology Letters, 101(2), pp. 217–222. Available at: https://doi.org/10.1016/j.imlet.2005.06.003.

– Gastl, G. A., Abrams, J. S., Nanus, D. M., Oosterkamp, R., Silver, J., Liu, F., Chen, M., Albino, A. P., & Bander, N. H. (1993) ‗Interleukin-10 production by human carcinoma cell lines and its relationship to interleukin-6 expression'. International journal of cancer, 55(1), 96-101. https://doi.org/10.1002/ijc.2910550118.

– Gazzar, M. El et al. (2009) ‗Chromatin-Specific Remodeling by HMGB1 and Linker Histone H1 Silences Proinflammatory Genes during Endotoxin Tolerance', Molecular and Cellular Biology, 29(7), pp. 1959–1971. Available at: https://doi.org/10.1128/mcb.01862-08.

– Geng J. G. (2001) ‗Directional migration of leukocytes: their pathological roles in inflammation and strategies for development of anti-inflammatory therapies'. Cell research, 11(2), 85–88. https://doi.org/10.1038/sj.cr.7290071

– Gérard, C. (1993) ‗Interleukin 10 reduces the release of tumor necrosis factor and prevents lethality in experimental endotoxemia'. J Exp Med.177(2):547-50. doi: 10.1084/jem.177.2.547. PMID: 8426124; PMCID: PMC2190913.

– Geroulanos, S. and Douka, E.T. (2006) ‗Historical perspective of the word ―sepsis‖ [1]', Intensive Care Medicine, p. 2077. Available at: https://doi.org/10.1007/s00134-006-0392-2.

– Giani, J.F. et al. (2011) ‗Angiotensin-(1-7) reduces proteinuria and diminishes structural damage in renal tissue of stroke-prone spontaneously hypertensive rats'. Available at: https://doi.org/10.1152/ajprenal.00278.2010.-An.

– Girkontaite, I., et al. (2007) ‗Apoptotic cells selectively suppress the Th1 cytokine interferon gamma in stimulated human peripheral blood mononuclear cells and shift the Th1/Th2 balance towards Th2'. Autoimmunity, 40(4), 327-330. https://doi.org/10.1080/08916930701356846.

– González, L. A. et al. (2021) ‗Characterization of the Anti-Inflammatory Capacity of IL-10-Producing Neutrophils in Response to Streptococcus pneumoniae Infection'. Frontiers in immunology, 12, 638917. https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.638917;

– Gonzalez, O., Fraile, J., &Garcia, R. (2017) ‗Fisiologia de las glandulas suprarrenales'. Programa de Formacion Medica Continua Acreditado, 8(21), 1097-1101. Retrieved fromhttp://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S030454120070206X.

– Gotts, J.E. and Matthay, M.A. (2016) ‗Sepsis: Pathophysiology and clinical management', BMJ (Online). BMJ Publishing Group. Available at: https://doi.org/10.1136/bmj.i1585.

– Guignant, C. et al. (2011) ‗Programmed death-1 levels correlate with increased mortality, nosocomial infection and immune dysfunctions in septic shock patients', Critical Care, 15(2). Available at: https://doi.org/10.1186/cc10112.

– Guo, Z., Zhao, Y., Zhang, Z., and Li, Y. (2021) ‗Interleukin-10-Mediated Lymphopenia Caused by Acute Infection with Foot-and-Mouth Disease Virus in Mice'. Viruses, 13(12), 2358. https://doi.org/10.3390/v13122358

– Güven, M and Gültekin, H. (2021) ‗Could serum total cortisol level at admission predict mortality due to coronavirus disease 2019 in the intensive care unit? A prospective study'. Sao Paulo medical journal = Revista paulista de medicina, 139(4), 398–404. https://doi.org/10.1590/1516-3180.2020.0722.R1.2302021.

– Hammond, G. L. (2016) ‗Plasma steroid-binding proteins: Primary gatekeepers of steroid hormone action'. Journal of Endocrinology, 230(1), R13–R25. https://doi.org/10.1530/JOE 16-0070.

– Heim, C.E. et al. (2014) ‗Myeloid-Derived Suppressor Cells Contribute to Staphylococcus aureus Orthopedic Biofilm Infection', The Journal of Immunology, 192(8), pp. 3778–3792. Available at: https://doi.org/10.4049/jimmunol.1303408.

- Holbrook, J., Lara-Reyna, S., Jarosz-Griffiths, H. and McDermott, M. (2019) ‗Tumour necrosis factor signalling in health and disease'. F1000Research, 8, F1000 Faculty Rev-111. https://doi.org/10.12688/f1000research.17023.1

– Hommes, T.J., Wiersinga, W.J., van der Poll, T. (2009) ‗The Host Response to Sepsis'. In: Vincent, JL. (eds) Yearbook of Intensive Care and Emergency Medicine. Yearbook of Intensive Care and Emergency Medicine, vol 2009. Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-540-92276-6_4.

– Hotchkiss, R.S. and Karl, I.E. (2003) ‗The Pathophysiology and Treatment of Sepsis'. Available at: www.nejm.org.

– Hotchkiss, R. S., (2001) ‗Sepsis-induced apoptosis causes progressive profound depletion of B and CD4+ T lymphocytes in humans'. Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950), 166 (11), 6952–6963. Doi: 10.4049/jimmunol.166.11.6952 .

- Hotchkiss, R.S. et al (1999) ‗Apoptotic cell death in patients with sepsis, shock, and multiple organ dysfunction', Crit Care Med, 27(7):1230-51. doi: 10.1097/00003246-199907000-00002. PMID: 10446814.

– Hotchkiss, R.S. et al. (2016) ‗Sepsis and septic shock', Nature Reviews Disease Primers. Nature Publishing Group.doi.org/10.1038/nrdp.2016.45.

– Howes A., Gabryšová L. and O'Garra A. (2014) ‗Role of IL-10 and the IL-10 Receptor in Immune Responses', Reference Module in Biomedical Sciences, Elsevier, ISBN 9780128012383. Available at: https://doi.org/10.1016/B978-0- 12-801238-3.00014-3.

- Huang, H. et al. (2015) ‗High circulating CD39(+) regulatory T cells predict poor survival for sepsis patients'. International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases, 30, 57–63. https://doi.org/10.1016/j.ijid.2014.11.006.

– Iba, T. et al. (2021) ‗Recent advances in the research and management of sepsis-associated DIC', International Journal of Hematology. Springer Japan, pp. 24–33. Available at: https://doi.org/10.1007/s12185-020-03053-y.

– Imlay, H and Limaye, A. P. (2020) ‗Current Understanding of Cytomegalovirus Reactivation in Critical Illness'. J Infect Dis. 2020 Mar 5;221(Suppl 1):S94-S102. doi: 10.1093/infdis/jiz638. PMID: 32134490; PMCID: PMC7057786.

– Iyer, S. S. and Cheng, G. G. (2012). ‗Role of interleukin 10 transcriptional regulation in inflammation and autoimmune disease'. Critical Reviews in Immunology, 32(1), 23–63. https://doi.org/10.1615/critrevimmunol.v32.i1.30.

– Janols, H. et al. (2014) ‗A high frequency of MDSCs in sepsis patients, with the granulocytic subtype dominating in gram-positive cases', Journal of Leukocyte Biology, 96(5), pp. 685–693. Available at: https://doi.org/10.1189/jlb.5hi0214- 074r.

– Jensen, I. J. et al. (2021) ‗NK Cell-Derived IL-10 Supports Host Survival during Sepsis'. Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950), 206(6), 1171–1180. https://doi.org/10.4049/jimmunol.2001131.

– Joyce, D.A. et al. (1994) ‗Two inhibitors of pro-inflammatory cytokine release, interleukin-10 and interleukin-4, have contrasting effects on release of soluble p75 tumor necrosis factor receptor by cultured monocytes', Eur J Immunol, 24(11):2699-705. doi: 10.1002/eji.1830241119. PMID: 7957562.

– Kalechman, Y. et al. (2002) ‗Anti-IL-10 Therapeutic Strategy Using the Immunomodulator AS101 in Protecting Mice from Sepsis-Induced Death: Dependence on Timing of Immunomodulating Intervention 1', The Journal of Immunology. Available at: http://journals.aai.org/jimmunol/article-pdf/169/1/384/1150151/384.pdf.

– Kasper, P. et al (2020) ‗Hepatic dysfunction in sepsis' Leberfunktionsstörungen bei Sepsis. Med Klin Intensivmed Notfmed.115(7):609-619. German. doi: 10.1007/s00063-020-00707-x. Epub 2020 Jul 28. PMID: 32725325.

– Keller-Wood, M. (2015). ‗Hypothalamic-pituitary-adrenal axis-feedback control', Comprehensive Physiology, 5(3), 1161–1182. https://doi.org/10.1002/cphy.c140065.

- Kolaczkowska, E. and Kubes, P. (2013) ‗Neutrophil recruitment and function in health and inflammation'. Nature reviews. Immunology, 13(3), 159–175. https://doi.org/10.1038/nri3399

– Koldzic-Zivanovic, N. et al. (2006) ‗Regulation of adrenal glucocorticoid synthesis by interleukin-10: A preponderance of IL-10 receptor in the adrenal zona fasciculata', Brain, Behavior, and Immunity, 20(5), pp. 460–468. Available at: https://doi.org/10.1016/j.bbi.2005.09.003.

– Kyriazopoulou, E. and Giamarellos-Bourboulis, E.J. (2021) ‗Monitoring immunomodulation in patients with sepsis', Expert Review of Molecular Diagnostics. Taylor and Francis Ltd., pp. 17–29. Available at: https://doi.org/10.1080/14737159.2020.1851199.

– Landoni, V.I. et al. (2016) ‗Immature myeloid Gr-1+ CD11b+ cells from lipopolysaccharide-immunosuppressed mice acquire inhibitory activity in the bone marrow and migrate to lymph nodes to exert their suppressive function', Clinical Science, 130(4), pp. 259–271. Available at: https://doi.org/10.1042/CS20150653.

– Lawrence,T. et al. (2001) ‗Possible new role for NF-kappaB in the resolution of inflammation', Nat Med, 7(12):1291-7. doi: 10.1038/nm1201 1291. PMID: 11726968.

– Le Tulzo Y, Pangault C, Amiot L, et al. (2004) ‗Monocyte human leukocyte antigen-DR transcriptional downregulation by cortisol during septic shock'. Am J Respir Crit Care Med. 169:1144-1151.

– Leijte, G.P, et al. (2020) 'Monocytic HLA-DR expression kinetics in septic shock patients with different pathogens, sites of infection and adverse outcomes'. Crit Care. 20;24(1):110. doi: 10.1186/s13054-020-2830-x. PMID: 32192532; PMCID: PMC7082984.

– Lemieux, S.M. and Levine, A.R. (2019) ‗Low-dose corticosteroids in septic shock: Has the pendulum shifted?', American Journal of Health-System Pharmacy, 76(8), pp. 493–500. Available at: https://doi.org/10.1093/ajhp/zxz017.

– Leng, F., Gu, Z., Pan, S., et al (2024) ‗Novel cortisol trajectory sub-phenotypes in sepsis', Critical care. London, England, 28(1),290. https://doi.org/10.1186/s13054-024-05071-2.

– Levi, M. and Van der Poll, T. (2017) ‗Coagulation and sepsis', Thrombosis Research. Elsevier Ltd, pp. 38–44. Available at: https://doi.org/10.1016/j.thromres.2016.11.007.

– Levy, M.M. et al. (2003) ‗2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference', Intensive Care Medicine. Springer Verlag, pp. 530–538. Available at: https://doi.org/10.1007/s00134-003-1662-x.

– Lewis, A.J., Lee, J.S. and Rosengart, M.R. (2018) ‗Translational sepsis research: Spanning the divide', Critical Care Medicine, 46(9), pp. 1497–1505. Available at: https://doi.org/10.1097/CCM.0000000000003271.

– Lewis, A.J., Seymour, C.W. and Rosengart, M.R. (2016) ‗Current Murine Models of Sepsis', Surgical Infections, 17(4), pp. 385–393. Available at: https://doi.org/10.1089/sur.2016.021.

- Li, Q. et al. (2023) ‗Integrated analysis of multi-omics data reveals T cell exhaustion in sepsis'. Front Immunol. 3;14:1110070. doi: 10.3389/fimmu.2023.1110070. PMID: 37077915; PMCID: PMC10108839.

– Li, X. et al. (2017) ‗Interleukin-10/lymphocyte ratio predicts mortality in severe septic patients', PLoS ONE, 12(6). Available at: https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179050.

- Li, Y. ety al., (2023) ‗PKM2/STAT1-mediated PD-L1 upregulation on neutrophils during sepsis promotes neutrophil organ accumulation by serving an anti-apoptotic role'. Journal of inflammation (London, England), 20(1), 16. https://doi.org/10.1186/s12950-023-00341-2

– Liberman, A. C. et al. (2018) ‗Regulatory and Mechanistic Actions of Glucocorticoids on T and Inflammatory Cells'. Frontiers in endocrinology, 9, 235. https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00235.

– Liu, D., Cao, S., Zhou, Y., & Xiong, Y. (2019). Recent advances in endotoxin tolerance. Journal of Cellular bbochemistry, 120(1), 56–70. https://doi.org/10.1002/jcb.27547

– Liu, Z., et al. (2024). Heparin-binding protein and sepsis-induced coagulopathy: Modulation of coagulation and fibrinolysis via the TGF-β signalling pathway. Thrombosis research, 244, 109176. https://doi.org/10.1016/j.thromres.2024.109176

- López-Collazo E, and Del Fresno C. (2024) ‗Endotoxin tolerance and trained immunity: breaking down immunological memory barriers'. Front

Immunol. 29;15:1393283. doi: 10.3389/fimmu.2024.1393283. PMID: 38742111; PMCID: PMC11089161.

– Lu, Y.C., Yeh, W.C. and Ohashi, P.S. (2008) ‗LPS/TLR4 signal transduction pathway', Cytokine, pp. 145–151.https://doi.org/10.1016/j.cyto.2008.01.006.

– Lupu, F. et al. (2014) ‗Crosstalk between the coagulation and complement systems in sepsis', Thrombosis Research, 133(SUPPL. 1). https://doi.org/10.1016/j.thromres.2014.03.014.

– Madsen, K., and Jijon, H. (2003) ‗IL-10 and IL-2 Knockout Mice. In Cytokine Knockouts' (pp. 237 251). https://doi.org/10.1007/978-1-59259-405-4_14.

– Mannino, M. H. (2015) ‗The paradoxical role of IL-10 in immunity and cancer'. Cancer Letters, 367(2), 103–107. https://doi.org/10.1016/j.canlet.2015.07.009.

– Marchant, A. et al. (1995) ‗Clinical and Biological Significance of Interleukin-10 Plasma Levels in Patients with Septic Shock', Journal of Clinical Immunology.

– Martire-Greco, D. et al. (2014)‗All-trans-retinoic acid improves immunocompetence in a murine model of lipopolysaccharide-induced immunosuppression', Clinical science (London, England : 1979), 126(5), pp. 355–365. Available at: https://doi.org/10.1042/CS20130236.

– Mathias, B. et al. (2017) ‗Human myeloid-derived suppressor cells are associated with chronic immune suppression after severe sepsis/septic shock', Annals of Surgery, 265(4), pp. 827–834. Available at: https://doi.org/10.1097/SLA.0000000000001783.

– McKelvey, M., Uddin, M. B., Palani, S., Shao, S., and Sun, K. (2024) ‗IL-10 Counteracts IFN-γ to Alleviate Acute Lung Injury in a Viral-Bacterial Superinfection Model'. American journal of respiratory cell and molecular biology, 71(1), 110–120. https://doi.org/10.1165/rcmb.2023-0437OC

– Mikolka, P. et al. (2019) ‗Effect of different dosages of dexamethasone therapy on lung function and inflammation in an early phase of acute respiratory distress syndrome model', Physiological Research, 68, pp. S253–S263. Available at: https://doi.org/10.33549/physiolres.934364.

– Mira, J.C. et al. (2017) ‗Persistent Inflammation, Immunosuppression and Catabolism Syndrome', Critical Care Clinics. W.B. Saunders, pp. 245–258. doi.org/10.1016/j.ccc.2016.12.001.

– Moore, K. W. et al. (1993) ‗Interleukin-10'. Annual review of immunology, 11, 165–190. https://doi.org/10.1146/annurev.iy.11.040193.001121.

– Moore, K. W. et al. (2001) ‗Interleukin -10 and the Interleukin -10 receptor', Molecular and Cellular Biology, 1(1), 683–765. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11244051.

– Mosser, D. M. Z. X. and Zhang, X. (2008) ‗Interleukin-10: new perspectives on an old cytokine'. Immunological 065X.2008.00706.x Reviews, 226, 205–218. https://doi.org/10.1111/j.1600.

– Muenzer, J.T. et al. (2010) ‗Characterization and modulation of the immunosuppressive phase of sepsis', Infection and Immunity, 78(4), pp. 1582–1592. Available at: https://doi.org/10.1128/IAI.01213-09.

– Munford, R.S. and Pugin, J. (2001) ‗Critical Care Perspective Normal Responses to Injury Prevent Systemic Inflammation and Can Be Immunosuppressive', Am J Respir Crit Care Med. Available at: www.atsjournals.org.

– Munoz, C. et al. (1991) ‗Dysregulation of in vitro cytokine production by monocytes during sepsis'. J Clin Invest. 88(5):1747-54. doi: 10.1172/JCI115493. PMID: 1939659; PMCID: PMC295719.

– Murphey, E.D. and Sherwood, E.R. (2006) ‗Bacterial clearance and mortality are not improved by a combination of IL-10 neutralization and IFN-γ administration in a murine model of post-CLP immunosuppression', Shock, 26(4), pp. 417–424. Available at: https://doi.org/10.1097/01.shk.0000226343.70904.4f.

– Nakahata, T. and Tsuji, K. (1992) '[Function, molecular structure and gene expression regulation of interleukin-10 (IL-10)]' Nihon rinsho. Japanese journal of clinical medicine, 50(8), 1827–1832.PMID: 1433975.

– Nemzek, J.A. et al. (2004) ‗Humane endpoints in shock research.', Shock (Augusta, Ga.), 21(1), pp. 17–25. Available at: https://doi.org/10.1097/01.shk.0000101667.49265.fd.

- Noto, M.J. et al. (2017) ‗RAGE-Mediated Suppression of Interleukin-10 Results in Enhanced Mortality in a Murine Model of Acinetobacter baumannii Sepsis'. Infect Immun. 23;85(3):e00954-16. doi: 10.1128/IAI.00954-16. PMID: 28052995; PMCID: PMC5328494.

- Oczkowski, S. et al. (2022) ‗Surviving Sepsis Campaign Guidelines 2021: highlights for the practicing clinician'. Pol Arch Intern Med. 22;132(7-8):16290. doi: 10.20452/pamw.16290. Epub 2022 Jul 6. PMID: 35791800.

– Oft, M. (2019). ‗Immune regulation and cytotoxic T cell activation of IL-10 agonists - Preclinical and clinical experience'. Seminars in immunology, 44, 101325. https://doi.org/10.1016/j.smim.2019.101325.

– Ono, S., Tsujimoto, H., Hiraki, S., & Aosasa, S. (2018). Mechanisms of sepsis-induced immunosuppression and immunological modification therapies for sepsis. Annals of gastroenterological surgery, 2(5), 351–358. https://doi.org/10.1002/ags3.12194

– Opal, S.M. and Van der Poll, T. (2015) ‗Endothelial barrier dysfunction in septic shock', Journal of Internal Medicine. Blackwell Publishing Ltd, pp. 277–293. Available at: https://doi.org/10.1111/joim.12331.

– Organización Mundial de la Salud. World Health Organization's first global report on sepsis; 2020. La OMS pide una acción global contra la sepsis, causa de 1 de cada 5 muertes en el mundo. https://www.who.int/es/news/item/08-09- 2020-who-calls-for-global-action-on-sepsis---cause-of-1-in-5-deaths-worldwide.

– Otto, G.P. et al. (2011) ‗The late phase of sepsis is characterized by an increased microbiological burden and death rate', Critical Care, 15(4). Available at: https://doi.org/10.1186/cc10332.

– Ouyang, W. and O'Garra, A. (2019) ‗IL-10 Family Cytokines IL-10 and IL-22: from Basic Science to Clinical Translation'. Immunity, 50(4), 871–891. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.03.020.

– Pajkrt, D. et al. (1997) ‗Attenuation of proinflammatory response by recombinant human IL-10 in human endotoxemia: effect of timing of recombinant human IL- 10 administration', J Immunol, 15;158(8):3971-7. PMID: 9103468.

– Panettieri, R. A., et al. (2019). ‗Non genomic Effects of Glucocorticoids: An Updated View'. Trends in Pharmacological Sciences, 40(1), 38–49. https://doi.org/10.1016/j.tips.2018.11.002.

– Patel, S. (2018) ‗Danger-Associated Molecular Patterns (DAMPs): the Derivatives and Triggers of Inflammation', Current Allergy and Asthma Reports. Current Medicine Group LLC 1. Available at: https://doi.org/10.1007/s11882-018-0817-3.

– Patil, N. K. et al. (2017) ‗Targeting Immune Cell Checkpoints during Sepsis'. International journal of molecular sciences, 18(11), 2413. https://doi.org/10.3390/ijms18112413.

– Pinheiro da Silva, F. and Nizet, V. (2009) ‗Cell death during sepsis: integration of disintegration in the inflammatory response to overwhelming

infection‘. Apoptosis: an international journal on programmed cell death, 14(4), 509–521. https://doi.org/10.1007/s10495-009-0320-3

- Peñaloza, H. F., Noguera, L. P., Riedel, C. A., and Bueno, S. M. (2018). ‗Expanding the Current Knowledge About the Role of Interleukin-10 to Major Concerning Bacteria‘. *Frontiers in microbiology*, *9*, 2047. https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02047.

- Pittet, J. F. et al. (2001) ‗TGF-beta is a critical mediator of acute lung injury‘. The Journal of clinical investigation, 107(12), 1537–1544. https://doi.org/10.1172/JCI11963.

– Płóciennikowska, A. et al. (2015) ‗Co-operation of TLR4 and raft proteins in LPS-induced pro-inflammatory signaling‘, Cellular and Molecular Life Sciences, 72(3), pp. 557–581. Available at: https://doi.org/10.1007/s00018-014-1762-5.

– Prescott, H. C. and Ostermann, M. (2023) ‗What is new and different in the 2021 Surviving Sepsis Campaign guidelines‘. Was ist neu und was istanders in den SSC (Surviving Sepsis Campaign)-Leitlinien. MedizinischeKlinik, Intensivmedizin und Notfallmedizin, 118(Suppl 2), 75–79. https://doi.org/10.1007/s00063-023-01028-5.

– Prescott, H. C. et al. (2016). ‗Late mortality after sepsis: propensity matched cohort study‘. BMJ (Clinical research ed.), 353, i2375. https://doi.org/10.1136/bmj.i2375.

– Prigent, H., Maxime, V. and Annane, D. (2004) ‗Science review: Mechanisms of impaired adrenal function in sepsis and molecular actions of glucocorticoids‘, Critical Care, pp. 243–252. Available at: https://doi.org/10.1186/cc2878.

– Prochetto, E. et al. (2022) ‗Myeloid-derived suppressor cells and vaccination against pathogens‘, Frontiers in Cellular and Infection Microbiology. Frontiers Media S.A. Available at: https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.1003781.

– Qiang, X. et al. (2013) ‗Cold-inducible RNA-binding protein (CIRP) triggers inflammatory responses in hemorrhagic shock and sepsis‘, Nature Medicine, 19(11), pp. 1489–1495. Available at: https://doi.org/10.1038/nm.3368.

– Raetz, C.R.H. and Whitfield, C. (2002) ‗Lipopolysaccharide endotoxins‘, Annual Review of Biochemistry, pp. 635–700. Available at: https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.71.110601.135414.

– Ramrez, F. (1998) ‗Glucocorticoids Induce a Th2 Response In Vitro‘, Developmental Immunology.

– Raymond, S.L. et al. (2017) ‗Microbial recognition and danger signals in sepsis and trauma', Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease. Elsevier B.V., pp. 2564–2573. Available at: https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2017.01.013.

– Rearte, B. et al. (2014) ‗Dehydroepiandrosterone and metyrapone partially restore the adaptive humoral and cellular immune response in endotoxin immunosuppressed mice', Innate Immunity, 20(6). Available at: https://doi.org/10.1177/1753425913502243.

– Rearte, B. Landoni,V. et al. (2010) ‗Differential effects of glucocorticoids in the establishment and maintenance of endotoxin tolerance', Clinical and Experimental Immunology, 159(2). Available at: https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2009.04052.x.

– Rearte, B., Maglioco, A. et al. (2010) ‗Mifepristone (RU486) restores humoral and T cell-mediated immune response in endotoxin immunosuppressed mice', Clinical and Experimental Immunology, 162(3). Available at: https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2010.04262.x.

– Reilly, B. et al. (2022) ‗Necroptosis-Mediated eCIRP Release in Sepsis', Journal of Inflammation Research, 15, pp. 4047–4059. Available at: https://doi.org/10.2147/JIR.S370615.

– Rennick, D., Davidson, N. and Berg, D. (1995) ‗Interleukin-10 gene knock-out mice: a model of chronic inflammation'. Clinical Immunology and Immunopathology, 76(3 PART 2), 174–178. https://doi.org/10.1016/S0090-

– Rigato O. and Salomao R (2003) ‗Impaired production of interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha but not of interleukin 10 in whole blood of patients with sepsis', Shock, 19(2):113-6. doi: 10.1097/00024382-200302000-00004. PMID: 12578117.

- Rivas, M., Motes, A., et al. (2023) ‗Characteristics and outcomes of patients with sepsis who had cortisol level measurements or received hydrocortisone during their intensive care unit management: A retrospective single center study'. SAGE open medicine, 11, 20503121221146907. https://doi.org/10.1177/20503121221146907

– Ronchetti, S. et al. (2018) ‗How Glucocorticoids Affect the Neutrophil Life'. International journal of molecular sciences, 19(12), 4090. https://doi.org/10.3390/ijms19124090.

– Rudd, K.E. et al. (2020) ‗Global, regional, and national sepsis incidence and mortality, 1990–2017: analysis for the Global Burden of Disease Study', The Lancet, 395(10219), pp. 200–211. Available at: https://doi.org/10.1016/S0140- 6736(19)32989-7.

– Rubio, I., et al. (2019) ‗Current gaps in sepsis immunology: new opportunities for translational research'. The Lancet. Infectious diseases, 19(12), e422–e436. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(19)30567-5

– Sabat, R., et al. (2010) ‗Biology of Cytokine and Growth Factor' Reviews, 21(5), 331–344. https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2010.09.002.

- Sakr, Y. et al. (2018) ‗Sepsis in Intensive Care Unit Patients: Worldwide Data From the Intensive Care over Nations Audit'. Open forum infectious diseases, 5(12), ofy313. https://doi.org/10.1093/ofid/ofy313

– Saraiva, M. and O'Garra, A. (2010) ‗The regulation of IL-10 production by immune cells', Nature Reviews Immunology, 10(3), pp. 170–181. Available at: https://doi.org/10.1038/nri2711.

– Saraiva, M., et al. (2020). ‗Biology and therapeutic potential of interleukin-10'. Journal of ExperimentalMedicine, 217(1), 1 19. https://doi.org/10.1084/jem_20190418.

– Sayeed M. M. (2004). ‗Delay of neutrophil apoptosis can exacerbate inflammation in sepsis patients: cellular mechanisms'. Critical care medicine, 32(7), 1604–1606. https://doi.org/10.1097/01.ccm.0000130997.85379.0f

– Schefold, J.C. (2010)‗Measurement of monocytic HLA-DR (mHLA-DR) expression in patients with severe sepsis and septic shock: Assessment of immune organ failure', Intensive Care Medicine, pp. 1810–1812. Available at: https://doi.org/10.1007/s00134-010-1965-7.

– Schrijver, I.T., Théroude, C. and Roger, T. (2019) ‗Myeloid derived suppressor cells sepsis', Frontiers in Immunology. Frontiers Media S.A. Available at: https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00327.

– Schulte, W., Bernhagen, J. and Bucala, R. (2013) ‗Cytokines in sepsis: Potent immunoregulators and potential therapeutic targets - An updated view', Mediators of Inflammation, 2013. Available at: https://doi.org/10.1155/2013/165974.

– Seeley, J.J. and Ghosh, S. (2017) ‗Molecular mechanisms of innate memory and tolerance to LPS', Journal of Leukocyte Biology, 101(1), pp. 107–119. Available at: https://doi.org/10.1189/jlb.3mr0316-118rr.

- Shalova, I. N. et al., (2015) ‗Human monocytes undergo functional re-programming during sepsis mediated by hypoxia-inducible factor-1α'. Immunity. 17;42(3):484-98. doi: 10.1016/j.immuni.2015.02.001. Epub 2015 Mar 3. PMID: 25746953.

– Shankar-Hari, M. et al. (2016) ‗Evidence for a causal link between sepsis and long-term mortality: A systematic review of epidemiologic studies', Critical Care, 20(1). Available at: https://doi.org/10.1186/s13054-016-1276-7.

- Shankar-Hari, M., Fish, M. and Azoulay, E. (2020) ‗Should we consider blocking the inhibitory immune checkpoint molecules for treating T cell exhaustion in sepsis?'. Intensive Care Med. 46(1):119-121. doi: 10.1007/s00134-019-05814-8. Epub 2019 Oct 28. PMID: 31659386.

– Shapouri-Moghaddam, A., et al. (2018). ‗Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease'. Journal of https://doi.org/10.1002/jcp.26429 Cellular Physiology, 233(9), 6425–6440.

– Sharma, V. et al. (2021) ‗IL-6 is associated with expansion of myeloid-derived suppressor cells and enhanced immunosuppression in pancreatic adenocarcinoma patients', Scandinavian Journal of Immunology, 94(6). Available at: https://doi.org/10.1111/sji.13107.

- Shubin, N. J., Monaghan, S. F., and Ayala, A. (2011) ‗Anti-inflammatory mechanisms of sepsis´. Contributions to microbiology, 17, 108–124. https://doi.org/10.1159/000324024.

- Schwab, A. D. et al., (2025) ‗Lung-delivered IL-10 mitigates Lung inflammation induced by repeated endotoxin exposures in male mice'. Physiological reports, 13(4), e70253. https://doi.org/10.14814/phy2.70253

– Singer, M. et al. (2016) ‗The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (sepsis-3)', JAMA - Journal of the American Medical Association. Available at: https://doi.org/10.1001/jama.2016.0287.

– Sosa, S., Danilowicz, K and Rizzo, L. F. L. (2021) ‗Adrenal axis in critical illness'. Medicina, 81(1), 69–75.

– Soto-Tinoco, E., Guerrero-Vargas, N. N., and Buijs, R. M. (2016) ‗Interaction between the hypothalamus and the immune system'. Experimental physiology, 101(12), 1463–1471. https://doi.org/10.1113/EP085560.

– Sun, Z. et al. (2023) ‗B cell-derived IL-10 promotes the resolution of lipopolysaccharide-induced acute lung injury'. Cell death & disease, 14(7), 418. https://doi.org/10.1038/s41419-023-05954-2.

– Tam, J.W. et al. (2014) ‗CD11b+ Ly6Chi Ly6G- immature myeloid cells recruited in response to Salmonella enterica serovar typhimurium infection exhibit protective and immunosuppressive properties', Infection and Immunity, 82(6), pp. 2606–2614. https://doi.org/10.1128/IAI.01590-13.

– Tan T, et al., (2020) ‗Association between high serum total cortisol concentrations and mortality from COVID-19'. Lancet Diabetes Endocrinol.

8(8):659-660. doi: 10.1016/S2213-8587(20)30216-3. Epub 2020 Jun 18. PMID: 32563278; PMCID: PMC7302794.

– Taneja, R. et al. (2004) ‗Delayed neutrophil apoptosis in sepsis is associated with maintenance of mitochondrial transmembrane potential and reduced caspase-9 activity', Critical Care Medicine, 32(7), pp. 1460–1469. https://doi.org/10.1097/01.CCM.0000129975.26905.77.

– Tebartz, C. et al. (2015) ‗A Major Role for Myeloid-Derived Suppressor Cells and a Minor Role for Regulatory T Cells in Immunosuppression during Staphylococcus aureus Infection', The Journal of Immunology, 194(3), pp. 1100–1111. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1400196.

– Toblli, J.E. et al. (2010) ‗Comparison of the renal, cardiovascular and hepatic toxicity data of original intravenous iron compounds', Nephrology Dialysis Transplantation, 25(11), pp. 3631–3640. Available at: https://doi.org/10.1093/ndt/gfq260.

– Torres, L.K., Pickkers, P. and Van Der Poll, T. (2021a) ‗Sepsis-Induced Immunosuppression', Annual Review of Physiology [Preprint]. Available at: https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-061121.

– Tracey, K.J., Lowry, S.F. and Cerami, A. (1988) ‗Cachectin: A Hormone that Triggers Acute Shock and Chronic Cachexia', The Journal Of Infectious Diseases. Available at: http://jid.oxfordjournals.org/.

– Trunova, G. V. et al. (2011) ‗Morphofunctional characteristic of the immune system in BALB/c and C57BL/6 mice'. Bulletin of experimental biology and medicine, 151(1), 99–102. https://doi.org/10.1007/s10517-011-1268-1

– Tschoeke, S.K. et al. (2008) ‗Endogenous IL-10 regulates sepsis-induced thymic apoptosis and improves survival in septic IL-10 null mice', Scandinavian Journal of Immunology, 68(6), pp. 565–571. Available at: https://doi.org/10.1111/j.1365-3083.2008.02176.x.

– Uhel, F. et al. (2017) ‗Early expansion of circulating granulocytic myeloid-derived suppressor cells predicts development of nosocomial infections in patients with sepsis', American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, 196(3), pp. 315–327. Available at: https://doi.org/10.1164/rccm.201606-1143OC.

– Unsinger J, McDonough JS, Shultz LD, Ferguson TA, Hotchkiss RS. Sepsis-induced human lymphocyte apoptosis and cytokine production in "humanized" mice. J Leukoc Biol. 2009 Aug;86(2):219-27. doi: 10.1189/jlb.1008615. Epub 2009 Apr 15. PMID: 19369639; PMCID: PMC2726769.

– Unsinger, J. et al. (2010) ‗Sepsis-Induced Apoptosis Leads to Active Suppression of Delayed-Type Hypersensitivity by CD8+ Regulatory T Cells through a TRAIL-Dependent Mechanism', The Journal of Immunology, 184(12), pp. 6766–6772.://doi.org/10.4049/jimmunol.0904054.

– Vachharajani, V and McCall, C.E. (2019) ‗Epigenetic and metabolic programming of innate immunity in sepsis'. Innate Immun. 25(5):267-279. doi: 10.1177/1753425919842320. Epub 2019 Apr 18. PMID: 30997862; PMCID: PMC6830903

– Vakharia, K. and Hinson, J.P. (2005) ‗Lipopolysaccharide directly stimulates cortisol secretion by human adrenal cells by a cyclooxygenase-dependent mechanism'. Endocrinology, 146(3), 1398–1402. https://doi.org/10.1210/en.2004-0882.

– Vaki, I. et al. (2010) ‗An early circulating factor in severe sepsis modulates apoptosis of monocytes and lymphocytes', Journal of Leukocyte Biology, 89(3), pp. 343–349. Available at: https://doi.org/10.1189/jlb.0410232.

– Van der Poll T. (2017) ‗Myeloid-derived Suppressor Cells in Sepsis'. Am J Respir Crit Care Med, 1;196(3):256-258. doi: 10.1164/rccm.201701-0046ED. PMID: 28762789.

– Van der Poll, T., Shankar-Hari, M. and Wiersinga, W.J. (2021) ‗The immunology of sepsis', Immunity. Cell Press, pp. 2450–2464. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2021.10.012.

– Van Vught, L.A. et al. (2017) ‗The host response in patients with sepsis developing intensive care unit-acquired secondary infections', American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, 196(4), pp. 458–470. Available at: https://doi.org/10.1164/rccm.201606-1225OC.

– Vandewalle, J. and Libert, C. (2020) ‗Glucocorticoids in Sepsis: To Be or Not to Be', Frontiers in Immunology. Frontiers Media S.A. Available at: https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01318.

– Venet F and Monneret G. (2018) ‗Advances in the understanding and treatment of sepsis-induced immunosuppression'. Nat Rev Nephrol. 14(2):121-137. doi: 10.1038/nrneph.2017.165. Epub 2017 Dec 11. PMID: 29225343.

– Walker, J. J., and Romanò, N. (2022) ‗Fast dynamics in the HPA axis: Insight from mathematical and experimental studies'. Current opinion in endocrine and metabolic research, 27, 100403. https://doi.org/10.1016/j.coemr.2022.100403.

– Walter, M. R. (2014) ‗The molecular basis of IL-10 function: From receptor structure to the onset of signaling'. Current Topics in Microbiology and Immunology, 380, 191–212. https://doi.org/10.1007/978-3-662-43492-5_9

– Wang X, et al. (2019) ‗Targeting IL-10 Family Cytokines for the Treatment of Human Diseases'. Cold Spring Harb Perspect Biol. 1;11(2):a028548. doi: 10.1101/cshperspect.a028548. PMID: 29038121; PMCID: PMC6360861.

– Wang, N. et al. (2022) ‗Of mice and men: Laboratory murine models for recapitulating the immunosuppression of human sepsis', Frontiers in Immunology. Frontiers Media S.A. Available at: https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.956448.

– Wang, Q. et al. (2023) ‗S100A8/A9: An emerging player in sepsis and sepsis- induced organ injury', Biomedicine and Pharmacotherapy. Elsevier Masson s.r.l. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2023.115674.

– Wang, Z. et al. (2019) ‗Design of Cecal Ligation and Puncture and Intranasal Infection Dual Model of Sepsis-Induced Immunosuppression'. J Vis Exp, 15;(148):10.3791/59386. doi: 10.3791/59386. PMID: 31259890; PMCID: PMC6640128.

– Wang, Z. et al. (2020) ‗Methylprednisolone alleviates multiple sclerosis by expanding myeloid-derived suppressor cells via glucocorticoid receptor β and S100A8/9 up-regulation', Journal of Cellular and Molecular Medicine, 24(23), pp. 13703–13714. doi.org/10.1111/jcmm.15928.

– Watanabe, H. et al. (2024) ‗Single cell RNA-seq reveals cellular and transcriptional heterogeneity in the splenic CD11b+Ly6Chigh monocyte population expanded in sepsis-surviving mice'. Molecular medicine (Cambridge, Mass.), 30(1), 202. https://doi.org/10.1186/s10020-024-00970-0.

– Webster, J.I. and Sternberg, E.M. (2004) Review ‗Role of the hypothalamic- pituitary-adrenal axis, glucocorticoids and glucocorticoid receptors in toxic sequelae of exposure to bacterial and viral products'. Journal of Endocrinology. Available at: www.annualreviews.org.

– Wiersinga, W.J. and Van Der Poll, T. (2022) ‗Immunopathophysiology of human sepsis'. Available at: http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/.

– Wilbers R.H.P et al., (2017) ‗Re-evaluation of IL-10 signaling reveals novel insights on the contribution of the intracellular domain of the IL-10R2 chain'. PLoS One. 2017 Oct 10;12(10):e0186317. doi: 10.1371/journal.pone.0186317. PMID: 29016674; PMCID: PMC5634637.

– Wilhelms, S.B. et al. (2020) ‗Causes of late mortality among ICU-treated patients with sepsis', Acta Anaesthesiologica Scandinavica, 64(7), pp. 961–966. Available at: https://doi.org/10.1111/aas.13592.

– Wiśnik, E. (2017) ‗Tolerance of monocytes and macrophages in response to bacterial endotoxin'. Postepy Hig Med Dosw (Online). 7;71(0):176-

185. doi: 10.5604/01.3001.0010.3802. PMID: 28345525. West MA and Heagy W. (2002) _Endotoxin tolerance: A review‘, Crit Care Med, 30(1 Supp):S64-S73. PMID: 11891406.

– Wiśnik, E. et al. (2017) _Tolerance of monocytes and macrophages in response to bacterial endotoxin‘. Postepyhigienyimedycynydoswiadczalnej (Online), 71(0), 176–185. https://doi.org/10.5604/01.3001.0010.3802

– Wolk, K. et al. (2000) _Impaired antigen presentation by human monocytes during endotoxin tolerance‘. Blood, 1;96(1):218-23. PMID: 10891454.

– Wu, Y. et al. (2024) _Immunotherapy in the context of sepsis-induced immunological dysregulation‘. Front Immunol. 21;15:1391395. doi: 10.3389/fimmu.2024.1391395. PMID: 38835773; PMCID: PMC11148279.

– Xiao, H., Siddiqui, J., and Remick, D. G. (2006) _Mechanisms of mortality in early and late sepsis‘. Infection and immunity, 74(9), 5227–5235. https://doi.org/10.1128/IAI.01220-05

– Xiao, W. et al. (2011) _A genomic storm in critically injured humans‘, Journal of Experimental Medicine, 208(13), pp. 2581–2590. https://doi.org/10.1084/jem.20111354.

– Xu, C. et al (2014) _TNF-mediated damage to glomerular endothelium is an important determinant of acute kidney injury in sepsis‘. Kidney Int. 85(1):72-81. doi: 10.1038/ki.2013.286. Epub 2013 Jul 31. PMID: 23903370; PMCID: PMC3834073.

– Xu, J. et al. (2009) _Extracellular histones are major mediators of death in sepsis‘, Nature Medicine, 15(11), pp. 1318–1321. Available at: https://doi.org/10.1038/nm.2053.

– Yamano, S. et al. (2001) _Protection from experimental endotoxemia by a recombinant adeno-associated virus encoding interleukin 10‘, Journal of Gene Medicine, 3(5), pp. 450–457. Available at: https://doi.org/10.1002/jgm.213.

– Yao, R. Q. et al. (2023) _Single-cell transcriptome profiling of sepsis identifies HLA-DR low S100A high monocytes with immunosuppressive function‘. Military Medical Research, 10(1), 27. https://doi.org/10.1186/s40779-023-00462-y.

– Yaseen, M.M. et al. (2020) _Mechanisms of immune suppression by myeloid- derived suppressor cells: The role of interleukin-10 as a key immunoregulatory cytokine‘, Open Biology. Royal Society Publishing. Available at: https://doi.org/10.1098/rsob.200111.

– Yi, L. et al. (2022) ‗Overexpression of interleukin-10 in engineered macrophages protects endothelial cells against LPS-induced injury in vitro'. FEBS open bio, 12(3), 605–615. https://doi.org/10.1002/2211-5463.13365.

– Zhang, K. et al. (2012) ‗Endogenous glucocorticoids promote the expansion of myeloid-derived suppressor cells in a murine model of trauma', International Journal of Molecular Medicine, 30(2), pp. 277–282. Available at: https://doi.org/10.3892/ijmm.2012.1014.

– Zhang, W. et al. (2023) ‗MDSCs in sepsis-induced immunosuppression and its potential therapeutic targets', Cytokine and Growth Factor Reviews. Elsevier Ltd, pp. 90–103. Available at: https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2022.07.007.

– Zhang, W., et al. (2022) ‗The diagnostic utility of IL-10, IL-17, and PCT in patients with sepsis infection'. Frontiers in public health, 10, 923457. https://doi.org/10.3389/fpubh.2022.923457

– Zhang, W., Fang, X., Gao, C., Song, C., He, Y., Zhou, T., Yang, X., Shang, Y., & Xu, J. (2023). ‗MDSCs in sepsis-induced immunosuppression and its potential therapeutic targets'. Cytokine & growth factor reviews, 69, 90–103. https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2022.07.007.

– Zhao, S. et al (2020) ‗The concentration of tumor necrosis factor-α determines its protective or damaging effect on liver injury by regulating Yap activity'. Cell Death Dis. 27;11(1):70. doi: 10.1038/s41419-020-2264-z. PMID: 31988281; PMCID: PMC6985193.

– Zhao, Y. et al. (2018) ‗Dexamethasone-induced myeloid-derived suppressor cells prolong allo cardiac graft survival through iNOS- and glucocorticoid receptor-dependent mechanism', Frontiers in Immunology, 9(FEB). Available at: https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00282.

– Zhong, J. et al. (2006) ‗Lipopolysaccharide-induced liver apoptosis is increased in interleukin-10 knockout mice', Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease, 1762(4), pp. 468–477. Available at: https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2005.12.012.

– Zhou, M., Aziz, M. and Wang, P. (2021) ‗Damage-Associated Molecular Patterns As Double-Edged Swords in Sepsis', Antioxidants and Redox Signaling. Mary Ann Liebert Inc., pp. 1308–1323. Available at: https://doi.org/10.1089/ars.2021.0008.

– Zhou, M.; Aziz, M and Wang, P. (2021) ‗Damage-Associated Molecular Patterns As Double-Edged Swords in Sepsis'. Antioxid Redox Signal. 20;35(15):1308-1323. doi: 10.1089/ars.2021.0008. Epub 2021 Mar 30. PMID: 33587003; PMCID: PMC8817718.

- Zhou, Y. Y., and Sun, B. W. (2022) ‗Recent advances in neutrophil chemotaxis abnormalities during sepsis'. Chinese journal of traumatology = Zhonghua chuang shang za zhi, 25(6), 317-324. https://doi.org/10.1016/j.cjtee.2022.06.002.

– Zigmond E, et al., (2014) 'Macrophage-restricted interleukin-10 receptor deficiency, but not IL-10 deficiency, causes severe spontaneous colitis'. Immunity. 2014 May 15;40(5):720-33. doi: 10.1016/j.immuni.2014.03.012. Epub 2014 May 1. PMID: 24792913.

Firma del doctorando:

Todero María Florencia

Firma del director: _____

Rearte Bárbara