

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA

División de Ciencias Biológicas y de la Salud



Efecto de la administración de dosis subletales de LPS por la vía oral, en la sobrevida y producción de citocinas durante el desarrollo de sepsis polimicrobiana inducida por ligadura y punción de ciego.

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
PRESENTA:**

RICARDO MARQUEZ VELASCO

**Director de Tesis:
DR. RAFAEL BOJALIL PARRA**

**Asesores:
DR. ROGELIO HERNANDEZ PANDO
DR. RAFAEL SAAVEDRA DURÁN**

El Doctorado en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Padrón de Posgrados de Excelencia del CONACYT y cuenta con apoyo del mismo Consejo con el convenio PFP-20-93.

El jurado designado por la Comisión del Doctorado en Ciencias Biológicas de la UAM (Unidades Cuajimalpa, Iztapalapa y Xochimilco) aprobó la Tesis que presentó:

RICARDO MARQUEZ VELASCO

El día 25 de Enero de 2011

Sinodales:

Dr. Rafael Bojalil Parra (Presidente)

Dr. Rogelio Hernández Pando (Secretario)

Dra. Dulce Adriana Mata Espinosa (Vocal)

Dr. Rafael Saavedra Durán (Vocal)

Dr. Lenin Pavón Romero (Vocal)

COMITÉ TUTORIAL

Dr. Rafael Bojalil Parra

Dr. Rogelio Hernández Pando

Dr. Rafael Saavedra Durán

SINODALES

Dra. Dulce Adriana Mata Espinosa

Dr. Lenin Pavón Romero

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Inmunología del Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”.

Dedicatorias

A Lupita, Astrid y Alan por el apoyo, amor y comprensión que siempre me han mostrado hacia mi persona y mi trabajo. Por ser parte de mi

A mis padres y hermanos quienes han sido testigos de los proyectos y metas a lo largo de mi vida. Por creer en mi gracias...

A mi comité tutorial, Dr. Rafael Bojalil por ser mi maestro y amigo. Al Dr. Hernández Pando por su paciencia, apoyo y enseñanzas a lo largo de este proceso. Al Dr. Rafael Saavedra por sus consejos. Al Dr. Lenin Pavón por sus consejos. A la Dra. Dulce Adriana Mata por sus críticas siempre constructivas, y por su paciencia para la elaboración de ésta tesis. A todos ellos gracias por su tiempo. Dra. Reyna Fierro por su apoyo....

A mis amigos Luis, Fausto por sus consejos y la presión. A Lorena y Rashidi. A Iván, Lucia, Yepci y Jazmín por su tiempo en laboratorio y por confiar en mí su formación profesional y el desarrollo de sus tesis.

A Dios por permitirme conocer un poco de lo maravilloso de la vida, en éste lugar y en éste momento...

A toda mi familia y aquellos que han sido importantes y que por falta de espacio no puedo mencionarlos, mil gracias.

Agradecimientos

Al Departamento de Inmunología del Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”, por las facilidades y recursos para realizar éste proyecto.

A Laboratorios Silanes S. A. de C. V. y en especial al Dr. Jorge Paniagua Solís, por facilitarnos los fragmentos F(ab)₂ anti-TNF y anti-IFN- γ y el financiamiento parcial para el desarrollo de éste estudio.

Resumen

El modelo de ligadura y punción de ciego (CLP) se utiliza para estudiar mecanismos fisiopatológicos de daño en sepsis. En el modelo de choque endotóxico, la administración de dosis subletales de lipopolisacárido (LPS), protege contra dosis letales posteriores; sin embargo, éste efecto se desconoce en el modelo de CLP. En este estudio se exploró el efecto de la administración de dosis subletales de LPS por la vía oral (O), en la supervivencia y producción de citocinas de animales con sepsis polimicrobiana. Durante la primera fase del estudio, ratones Balb/c machos fueron agrupados en a) sham, b) controles, c) tratados con 5 dosis subletales de LPS (50 µg/100 µl) dos veces por semana vía intraperitoneal (IP) o d) tratados vía O. Sólo los grupos control y tratados con LPS vías IP y O fueron retados con la CLP. Se evaluó supervivencia, positividad de hemocultivos, análisis microbiológico de heces, concentraciones séricas de TNF, IFN- γ , IL-6 e IL-10, expresión de TNF en hígado y pulmón, además del porcentaje de células de Kupffer en hígado y de edema en pulmón, y la presencia de inmunoglobulinas anti-LPS. En la segunda fase, ratones Balb/c fueron agrupados en a) sham, b) controles, tratados profilácticamente con c) 0.01, d) 0.1, e) 1 o f) 10 mg/kg de fragmentos F(ab)₂ anti-TNF; éste mismo protocolo fue probado con fragmentos F(ab)₂ anti-IFN γ . En estos grupos se evaluó la supervivencia y producción sérica de TNF, IL-1, IL-6, IFN- γ e IL-10. Una vez definida la dosis protectora para cada anticuerpo, su administración se inició en diferentes tiempos para definir su papel terapéutico. Los resultados de la primera fase mostraron que solo la CLP ocasionó una infección polimicrobiana, y que el tratamiento con LPS

vía O protegió vs el grupo C (87% vs 50%)($p < 0.05$). La protección se asoció con reducción de IFN- γ vs C ($p < 0.05$) y aumento de IL-10 4h después de la cirugía, reducción del tiempo de expresión de TNF hasta las 4h en hígado y retraso de la expresión a partir de las 4h en pulmón del grupo O vs la expresión observada en C (desde la 1.5-24h). El tratamiento con LPS vía O también redujo el porcentaje de células de Kupffer en hígado (27.5 vs 37.7) y % de edema en pulmón (12.51 vs 26.6) vs C ($p < 0.05$). Finalmente en el grupo O se observó un predominio de IgM vs los grupos C e IP ($p < 0.05$). En la segunda fase del estudio, el tratamiento con fragmentos F(ab)₂ anti-TNF protegió en dosis de 1 mg/kg vs C (69% vs 29%; $p < 0.05$). La protección se asoció a la coexistencia de IL-1 β e IL-10 durante las primeras 24h de estudio, además de niveles elevados de IL-6 a las 48, disminuyó IL-1 β y aumentó IL-10. Finalmente observó que el tratamiento con 1 mg/kg de anti-TNF, protegió solo cuando se inició -2h, -30min o 30min de la CLP. Por su parte, la administración de fragmentos F(ab)₂ anti-IFN- γ aumentó la supervivencia en dosis de 0.01 mg/kg (78%) vs 33% documentado en C ($p < 0.05$), lo que se asoció con la coexistencia de IL-1 β e IL-10 durante las primeras 24h de estudio, 48h después disminuyó IL-1 β y aumentó IL-10, en tanto que la IL-6 se mantuvo elevada durante todo el estudio. El efecto terapéutico del anti-IFN- γ pudo constatarse cuando se administró -2 o 24h después de la CLP, ya que aumentó la supervivencia en 88 y 94% respectivamente vs 54% observada en C ($p < 0.05$). Se concluye que el tratamiento con dosis subletales de LPS vía oral protegió significativamente en el modelo murino de sepsis inducida por CLP.

Palabras clave. CLP, sepsis, tolerancia, coexistencia

Abstract

Cecal ligation and puncture model (CLP) is used to investigate mechanisms of tissue injury in sepsis. In endotoxic shock model, administration of sublethal doses of lipopolysaccharide (LPS), protects against subsequent lethal doses; however, this effect is unknown in CLP model. This study was aimed to explore the effect of administration of sublethal doses of LPS by oral route (O), on the survival and cytokine milieu in animals with polymicrobial sepsis. In a first phase male mice Balb/c were grouped into a) sham, b) controls, c) treated with 5 sublethal doses of LPS (50 µg/100 µl) twice a week by intraperitoneal route (IP) or d) treated by O route; the control group and those treated with LPS O and IP routes were challenged with CLP. We evaluated survival, positive blood cultures, microbiological testing of stool, serum concentrations of TNF, IFN-γ, IL-6 and IL-10, TNF expression in liver and lung, as well as percentage of Kupffer cells in liver and lung edema, and presence of anti-LPS immunoglobulins. In the second phase, Balb / c mice were divided into a) sham, b) controls, treated prophylactically with c) 0.01, d) 0.1, e) 1 of) 10 mg / kg of F (ab) 2 anti-TNF fragments, this protocol was also tested with F (ab) 2 anti-IFN- γ fragments. In these groups we evaluated the survival and production of serum TNF, IL-1, IL-6, IFN-γ and IL-10. After the protective dose for each antibody, was defined, its administration was initiated at different times.

The results of the first phase showed that LPS treatment significantly protected via O in comparison with C group (87% vs 50%; p0.05). This

protection was associated with reduced IFN- γ vs C ($p < 0.05$) and increased IL-10 4h after surgery. The TNF expression was abolished at 4h in liver, while it initiates at 4h and continues until 48h in lung of group O vs expression observed in C (1.5-24h). LPS treatment by O route also reduced the percentage of Kupffer cells in liver (27.5 vs. 37.7) and percentage of lung edema (12.51 vs 26.6) vs C ($p < 0.05$). Finally, in the O group showed a predominance of IgM vs C and IP groups ($p < 0.05$).

In the second phase of the study, treatment with F (ab) 2 anti-TNF fragments protected in doses of 1 mg/kg vs C (69 vs 29%; $p < 0.05$). This protection was associated with the coexistence of IL-1 β and IL-10 during the first 24 hours of study, and high levels of IL-6; 48 after CLP, IL-1 β decreased and IL-10 increased. Finally, we found that treatment with 1 mg /kg of anti-TNF protected only when it was began prior (-2h, -30min) or 30min after from the CLP. Administration of F (ab) 2 fragments anti-IFN- γ protected at doses of 0.01 mg/kg (78% survival) vs C (33%) ($p < 0.05$), which was associated with coexistence of IL-1 β and IL-10 during the first 24 hours of study, decreased IL-1 β and increased IL-10 48h after of CLP, while IL-6 remained elevated throughout the study. Therapeutic effect of anti-IFN- γ was tested when his administration started -2 or 24h after CLP, increased survival at 88 and 94% respectively vs 54% observed in C ($p < 0.05$). We conclude that the treatment with sublethal doses of LPS by oral route significantly protects in the sepsis murine model induced by CLP.

Keywords. CLP, sepsis, tolerance, coexistence

| <u>Indice</u> | <u>Página</u> |
|-----------------------------------|----------------------|
| Indice de figuras y tablas | 13 |
| Abreviaturas | 15 |
| Antecedentes | 18 |
| Justificación | 46 |
| Hipótesis | 47 |
| Hipótesis | 48 |
| Metodología | 49 |
| Resultados | 57 |
| Discusión | 73 |
| Conclusiones | 82 |
| Bibliografía | 83 |
| Artículos publicados | 98 |

| Indice de figuras y tablas | Páginas |
|---|----------------|
| Figura 1. Vías de activación de macrófagos por LPS | 24 |
| Figura 2. Mecanismos de daño en sepsis | 31 |
| Figura 3. Estallido respiratorio | 33 |
| Figura 4. Activación de la cascada de la coagulación en sepsis | 34 |
| Figura 5. Producción de óxido nítrico en sepsis | 36 |
| Figura 6. Mecanismos de tolerancia inmunológica | 40 |
| Figura 7. Animales tratados dosis subletales de LPS | 57 |
| Tabla 1 Citocinas en suero de animales tratados con LPS. | 58 |
| Figura 8. Expresión de TNF en órganos blanco | 59 |
| Figura 9. Porcentaje de células de Kupffer en hígado de animales con sepsis inducida por CLP | 60 |
| Figura 10. Porcentaje de edema pulmonar presente en animales con sepsis inducida por CLP | 61 |
| Tabla 2. Tiempo de positividad de los hemocultivos de ratones con CLP. | 62 |
| Tabla 3. Análisis microbiano de animales con CLP | 63 |
| Figura 11. Producción de anticuerpos anti-LPS | 64 |
| Figura 12. Administración profiláctica de anti-TNF | 65 |
| Figura 13. Citocinas séricas en animales con CLP tratados con anti-TNF profiláctico | 67 |
| Figura 14. Administración terapéutica de anti-TNF | 68 |
| Figura 15. Administración profiláctica de | |

anti-IFN- γ **69**

Figura 16. Citocinas séricas en animales con sepsis inducida por CLP tratados con anti-IFN- γ **71**

Figura 17. Administración terapéutica de anti-IFN- γ **72**

Abreviaturas

ACTH. Hormona adrenocorticotrófica

ADH. Hormona antidiurética

BS. Choque bacteriano

C. Control

c/u. Cada uno

C5. Proteína C5 del complemento

CARS. Síndrome de respuesta anti-inflamatoria compensatoria

CD14s. CD14 soluble

CLP. Ligadura y punción de ciego

DIC. Coagulación intravascular diseminada

DNA. Acido desoxiribonucleico

ES. Choque endotóxico

EtxB. Enterotoxina B

ExS. Choque enterotóxico

Hg. Mercurio

HGMB1. High-mobility group box 1

hr. Hora

hrs. Horas

IFN. Interferón

IL. Interleucina

IP. Intraperitoneal

IRAK. Receptor de IL-1 asociado a cinasa

IRF. Factor regulador de interferón

IFN. Interferón

iNOS. Óxido nítrico sintetasa inducible

iv. Intravenoso

JNK. Jun cinasa

Kg. Kilogramo

LBP. Proteína de unión al lipopolisacárido

LD. Dosis letal

LPS. Lipopolisacárido

LTA. Acido lipoteicoicoación de macrófagos

mg. Miligramos

µg. Microgramos

ml. Mililitro

µl. Microlitro

MHC. Molécula principal de histocompatibilidad

MIF. Inhibidor de la migración de macrófagos

mm. Milímetros

mRNA. RNA mensajero

MyD88. Proteina mieloides para la diferenciación

NF. Factor nuclear

NK. Natural Killer

NO. Oxido nítrico

NOD1. Dominio del reclutamiento de caspasa 4

NS. No significativo

O. Oral

PaCO₂. Presión parcial de CO₂ en sangre

PGE₂. Prostaglandina E₂

PepG. Peptidoglucanos

Pg. Picogramo

PKC. Proteína Cinasa C

PKR. Proteína cinasa dependiente de RNA

PMN. Polimorfonucleares

RNA. Acido ribonucleico

RPM. Revoluciones por minuto

rTNF. Receptor para TNF

S. Grupo sham (simulado)

SIRS. Síndrome de respuesta inflamatoria sistémica

SHIP. Proteinas con dominio SH2 y función inositol fosfatasa

SO. Superóxido

SS. Choque séptico

TF. Factor tisular

TGF. Factor de crecimiento transformante

TIR. Dominio homólogo del receptor Toll/IL-1

TIRAP. Proteína adaptadora que contiene dominios TIR

TLR. Receptor tipo toll

TNF. Factor de necrosis tumoral

Tollip. Proteína que interactúa con Toll

TRAF6. Receptor para factor de necrosis tumoral asociado a factor 6

Antecedentes

La sepsis representa la causa más frecuente de morbi-mortalidad en las unidades de cuidados intensivos post-quirúrgicas. El cuadro clínico de la sepsis también es desarrollado por pacientes politraumatizados y quemados, por lo que es común encontrar en la literatura el término de “síndrome séptico”; sin embargo por definición la sepsis implica la presencia de un foco infeccioso que desencadena los mecanismos y sintomatología característicos de la enfermedad.

En los años 90's su incidencia se estimó en alrededor de 400,000 casos anuales en los Estados Unidos, 50% de los cuales evolucionaron a choque séptico (**SS**), ocasionando la muerte de unas 100,000 personas [Parrillo J y col, 1990]. En un estudio más reciente en el mismo país, Angus y colaboradores (**2001**) reportaron un aumento en la incidencia de la enfermedad, estimando en 751,000 los casos anuales de sepsis grave y una mortalidad de alrededor de 215,000 personas [Angus DC y col, 2001]. El evidente aumento de casos y decesos se atribuye en gran medida a la utilización de procedimientos médicos invasivos y la resistencia que han desarrollado diversos patógenos contra antibióticos, debido a su uso indiscriminado [Remick DG, 2001]. Angus y colaboradores también calcularon en unos USD\$ 22,100 el promedio del costo/caso, lo que representa un gasto total de alrededor de usd\$ 16.7 mil millones anuales.

Entre los años 1979-1989, la sepsis se asociaba predominantemente con infecciones por bacterias Gram (-), sin embargo en el año 2000 un estudio mostró que el 52.1 % de los casos se asociaron con infecciones por bacterias Gram (+),

37.6% por Gram (-), y tan sólo el 4.7% con infecciones polimicrobianas, mientras que el 4.6% fueron causadas por hongos [Carrigan SD y col, 2004].

Actualmente los trastornos desarrollados por los pacientes sépticos se pueden observar a nivel hemodinámico, inmunológico, metabólico y endocrinológico, sin embargo históricamente la primera descripción documentada se realizó en el año 360 aC por Hipócrates, en la cual señaló que “...*el paciente se encuentra enfermo y consumido. Presenta la nariz puntiaguda y las sienes hundidas, los ojos sumidos, marcados y apagados. La cara expresa temor, la lengua es acartonada, la piel es brillante. El paciente evita todo movimiento y la respiración es lenta y profunda. La pared abdominal está rígida con los músculos en guardia, no se escuchan ruidos intestinales. El pulso es rápido y superficial. La presencia de una masa dura en el hipocondrio es un signo de mal pronóstico, si abarca toda el área. La presencia de tal masa al inicio de la fiebre es un indicador de muerte inminente*” [Tjardes T y Neugebauer E, 2002]. Avicenna por su parte, observó que la septicemia era usualmente acompañada por fiebre (980-1037 dC), sin embargo fue hasta el siglo XVIII cuando Louis Pasteur asoció la descomposición de sustancias con la presencia de bacterias e Ignaz Semmelweis observó el importante efecto de la higiene en la disminución de la mortalidad de mujeres durante el parto. Hugo Schottmüller es responsable de los fundamentos para la definición moderna de sepsis y fue el primero en describir que la presencia de la infección era un componente fundamental de la enfermedad. Décadas después, las ideas de Lewis Thomas revolucionaron la comprensión de la sepsis al divulgar la teoría de que “...*ésta es la respuesta hacia el huésped... que hace la enfermedad*”. Finalmente Roger Bone y colegas definieron la sepsis como el

síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS) que ocurre durante infección [Rittisch D y col, 2008]. De hecho fue hasta finales del siglo pasado (años 90s) cuando se celebró la primera conferencia de consenso, organizada por “the American College of Chest Physicians and the Society of Critical Care Medicine” [Levi MM y col, 2003], en la que se definieron los criterios para las 4 etapas de la enfermedad. En ésta se estableció:

- 1) *El Síndrome de la Respuesta Inflamatoria Sistémica (SIRS)* se caracteriza por dos o más de los siguientes criterios:
 - Temperatura $> 38^{\circ}$ o $< 36^{\circ}$ C,
 - Frecuencia cardíaca > 90 latidos/min
 - Frecuencia respiratoria > 20 respiraciones/min (o PaCO₂ < 32 mm de Hg)
 - Conteo leucocitario > 12000 células/ μ l o < 4000 células/ μ l (o $> 10\%$ en forma de banda).
- 2) *Sepsis*: Se define como la identificación de un foco infeccioso asociado a dos o más criterios de SIRS.
- 3) *Sepsis grave*: Cuando el paciente manifiesta signos de sepsis más disfunción orgánica, hipotensión o hipoperfusión, acidosis láctica, oliguria o encefalopatía.
- 4) *Choque séptico*: Se define como hipotensión inducida por sepsis más hipoperfusión sin respuesta a una adecuada resucitación con fluidos extracorpóreos.

Esta clasificación presumiblemente es utilizada en todas las unidades de cuidados intensivos.

Fisiopatología de la sepsis

Los modelos animales han sido fundamentales para identificar los mecanismos responsables de la patogénesis del proceso séptico, entre estos destacan los de choque endotóxico (ES), choque enterotóxico (ExS), choque bacteriano (BS) y el de ligadura y punción de ciego (CLP). En los primeros tres, la sepsis es inducida mediante la administración intravenosa (IV) de lipopolisacárido (LPS) [Moreira AL y col, 2005], enterotoxina B (EtxB)[Ionin B y col, 2008] o bacterias vivas [Cross AS y col, 1993]. Estas estrategias sirven para identificar mecanismos tempranos de sepsis, ya que se utilizan antígenos puros o cultivos bacterianos bien caracterizados. Además es posible estimular con diferentes dosis letales (LD); no obstante su principal desventaja (excepto cuando se administran LD₁₀₀), es que los antígenos están presentes en circulación poco tiempo y se depuran rápidamente. En tanto que el modelo de CLP, el proceso séptico es inducido por una infección polimicrobiana, en la que se desconoce la cantidad de bacterias y antígenos que se liberan del ciego, el número de bacterias que ingresan a circulación y el tiempo que permanecen en el organismo. Estas características ubican este modelo como uno de los más complejos y agresivos, y que además reproduce confiablemente diversos mecanismos desarrollados durante la sepsis humana [Witcherman KA y col, 1980].

Independientemente del modelo, los antígenos bacterianos son fundamentales para iniciar el proceso inflamatorio durante la infección, por ejemplo en el caso de infecciones Gram (-), el lipopolisacárido (LPS) presente en la pared bacteriana ingresa a la circulación, interacciona con la proteína de unión del LPS (LBP) producida en hígado y por polimorfonucleares (PMN) (Figura 1), y aumenta la afinidad de CD14 por LPS. La interacción de LPS+LBP con CD14, libera a la LBP, por lo que el complejo LPS-CD14 interacciona con los receptores tipo Toll 4 (TLR4) presentes en la superficie de macrófagos, PMN y células dendríticas principalmente. De manera independiente el CD14 soluble (CD14s) puede unirse al LPS circulante y formar el complejo LPS-CD14s, activando células endoteliales que no presentan CD14 en superficie, pero sí un receptor para CD14s [Agnese DM y col, 2002. Bochud PY and Calandra T, 2003]. Además el LPS también puede unirse a CD14 de membrana sin la interacción con LBP, sin embargo esta activación requiere de mayores cantidades de endotoxina. Al interaccionar el complejo (LPS-CD14) con TLR4 (receptores tipo Toll)(Figura 1), se induce la formación del complejo TLR4–MD-2, y aunque ésta se acepta como la vía principal de activación por LPS, se han identificado otras vías alternativas en macrófagos como la dependiente de receptores carroñeros (scavenger), CD11b/CD18 y canales iónicos. Intracelularmente, la señalización continúa con la interacción del dominio intracelular del TLR, TIR (dominio homólogo del receptor Toll/IL-1), a IRAK (receptor de IL-1 asociado a cinasa), este es un proceso facilitado por 2 adaptadores, MyD88 (proteína mieloides para la diferenciación 88) y TIRAP (proteína adaptadora que contiene dominios TIR; también conocido como el adaptador asociado a MyD88 o Mal), e inhibido por una tercera proteína Tollip

(proteína que interactúa con Toll). Es importante señalar que puede haber una vía MyD88 independiente que envía señales vía TIRAP/Mal a través de una proteína cinasa dependiente de RNA (PKR) y del factor regulador del interferón (IRF)-3. Recientemente se ha propuesto que las células pueden responder al LPS mediante receptores intracelulares denominados proteínas NOD (Dominios de oligomerización de nucleótidos). NOD1 (dominio del reclutamiento de caspasa 4), fue identificado originalmente sobre las bases de homología estructural del regulador de la apoptosis. Las proteínas NOD tienen algunas similitudes con genes de resistencia en plantas que se relacionan con el reconocimiento de patógenos, así como TLRs y genes R, los genes NOD codifican regiones ricas de leucina. La expresión de NOD1 y NOD2 confieren capacidad de respuesta al LPS pero no al ácido lipoteicoico presente en bacterias Gram (+). Los mecanismos por los cuales NOD es capaz de reconocer a LPS en citosol son desconocidos [Cohen J, 2002]. Por su parte, la activación de TLR4 facilita el reclutamiento de IRAK1 y TRAF6, lo que genera la activación de JNK y NF- κ B y de esta manera se induce la expresión de genes de citocinas inflamatorias (Figura 1) [Cohen J, 2002]. Sin embargo, el LPS también induce la activación de JNK y NF- κ B en ratones MyD88^{-/-}, indicando que existe una vía de señalización MyD88-independiente, la cual es responsable de expresión de genes de interferón y maduración de células dendríticas. Otra vía MyD88-independiente en la que intervienen dominios TIR, conocida como TIRAP/Mal, se ha asociado con la inducción de la maduración de células dendríticas al ser estimuladas con LPS [Cuschieri J y col, 2006].

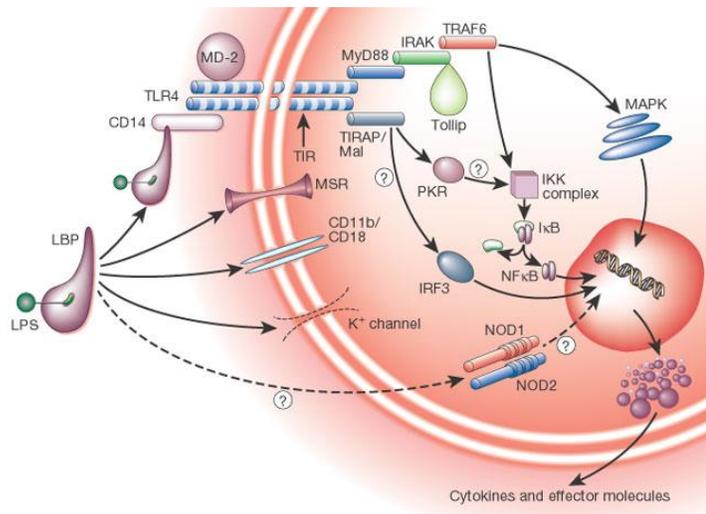


Figura 1. Vías de activación de macrófagos por LPS. La primera depende de la formación del complejo LPS-CD14, este complejo estimula receptores tipo toll 4 que a su vez inicia la transducción de señales por MyD88 para inducir la producción de mediadores inflamatorios. Otras de las vías activadas podrían depender de receptores carroñeros, integrinas CD11b/CD18, canales iónicos e incluso la activación de NOD1 y NOD2, esta última es poco conocida. Imagen publicada por Cofey MJ y col, 2000.

Como resultado de la activación, las células producen rápidamente citocinas como TNF, IL-1 β , IL-6, IFN- γ , IL-8, IL-10 e IL-12 [Tetta C y col, 2005], promoviendo inicialmente el desarrollo del proceso inflamatorio y su amplificación, facilitando el arribo de monocitos/macrófagos y PMN desde circulación hacia los órganos blanco, además de las concentraciones séricas de citocinas pro- y anti-inflamatorias y de eicosanoides derivados del ácido araquidónico [Cofey MJ y col, 2000], muchos de los cuales inducen vasodilatación.

Respuesta inmune en sepsis

En condiciones fisiológicas la respuesta pro-inflamatoria es regulada por mediadores anti-inflamatorios, lo que permite mantener una respuesta contra el o los patógenos y controlar procesos infecciosos. Sin embargo cuando el proceso inflamatorio es exacerbado, como sucede durante el “síndrome de la respuesta inflamatoria sistémica” (SIRS) en sepsis [Bone R, 1997], aumentan importantemente las concentraciones séricas de TNF, IL-1, IL-6 e IL-8, observándose un pico de éstas entre 1.5-3h posteriores al reto por CLP en ratones. Como respuesta al SIRS se genera el síndrome de la respuesta anti-inflamatoria compensatoria (CARS), de la misma magnitud pero con efectos antagónicos, resultando en el desarrollo de inmunoparálisis. Esta segunda fase se caracteriza por la presencia de altos niveles de mediadores anti-inflamatorios entre los que destaca IL-10, TGF- β , de receptores antagónicos como el de IL-1 y receptores solubles para TNF. En el modelo murino de CLP, esta etapa se observa alrededor de las 3h posteriores al reto y el pico a las 24h.

En pacientes, es difícil estudiar incipientemente el proceso séptico y el desarrollo natural del proceso inflamatorio en la enfermedad; no obstante se proponen tres teorías basadas en estudios transversales y que tratan de explicarlo: la primera sugiere que el SIRS es el primero en aparecer y posteriormente el CARS (teoría serial), mientras que la teoría paralela sugiere que ambas respuestas se desarrollan simultáneamente [Tetta C y col, 2005], la tercera propone que el CARS podría manifestarse primero y posteriormente el SIRS.

Citocinas pro-inflamatorias

En la actualidad se sabe que citocinas como TNF, IFN- γ , IL-1, IL-8 e IL-12 pertenecen a un grupo de mediadores considerados pro-inflamatorios, que contribuyen importantemente en la patogénesis de la sepsis. El TNF merece una mención especial ya que fue una de las primeras citocinas detectadas en el suero y plasma de pacientes sépticos [Pinsky MR, 1993], hallazgo que fue corroborado en animales retados con dosis subletales de LPS o de bacterias vivas [Tracey KJ y Cerami A, 1993]. Su papel como mediador de la patogénesis de la enfermedad, fue probado al administrarlo en forma recombinante lo que indujo hipotermia, piloerección, aletargamiento, caquexia, y daño a nivel tisular en intestino, hígado, pulmón y riñón de conejos o ratas [Tracey KJ y col, 1986]. También indujo la sobre-expresión de iNOS y altas concentraciones de óxido nítrico (NO) por células endoteliales, PMN y macrófagos [Fink MP y col, 1996], generando vasodilatación, disminución de la resistencia vascular periférica, aumento de la permeabilidad vascular y como consecuencia la pérdida de líquidos hacia el tercer espacio, desarrollo de edema, hipotensión y hemoconcentración, fenómenos que en conjunto aumentan la probabilidad de muerte. El TNF también induce la expresión de moléculas de adhesión sobre células endoteliales, lo que facilita la adherencia de neutrófilos al endotelio y su migración hacia zonas de inflamación [Aird WC, 2003]. Por otro lado, favorece la producción de factor tisular y la activación de la cascada de la coagulación, mecanismos importantes para el desarrollo de la coagulación intravascular diseminada [Kruger D, 2006], responsable de la isquemia en órganos blanco como intestino, hígado, riñón y pulmón, mecanismos

que en suma, contribuyen con la inducción de una mala distribución sanguínea, hipoxia y daño tisular. Por otro lado, el TNF es capaz de inducir directa o indirectamente la producción de otros mediadores como son IL-1, IL-8, IL-12; esta última combinada con TNF favorece la producción de IFN- γ [Heinzel F y col, 1994].

Por otro lado, la IL-1 también se ha detectado elevada en el suero de pacientes sépticos [Blackwell TS y Cristman JW, 1996. Bone R, 1997]. Su administración mimetiza muchas actividades biológicas del TNF; incluso la combinación de ambas citocinas (IL-1+TNF) sinergiza sus efectos independientes [Dinarello Ch, 1997]. Además, en células endoteliales cultivadas *in vitro*, estimuladas con LPS o rTNF y tratadas con anticuerpos anti-IL-1, se inhibe la producción de factor tisular cuyo efecto es pro-coagulante, lo que sugiere que la IL-1 podría jugar un papel importante en la regulación de la coagulación [Heyderman RS et al, 1995].

La IL-6 por su parte se ha documentado elevada en pacientes sépticos e inclusive los niveles se han asociado de forma directa con la gravedad de los pacientes [Doughnac A y col, 2003]. No obstante el tratamiento experimental de ratones con anticuerpos anti-IL-6, reguló negativamente la expresión de receptores para C5 y protegió significativamente en sepsis inducida por CLP [Riedemann NC y col, 2004].

La IL-8 es otro mediador inflamatorio, cuyos niveles se incrementan en pacientes con sepsis, los niveles sanguíneos elevados también se han asociado con desarrollo de choque séptico y falla orgánica múltiple en humanos [Feuerstein

G et al, 1994. Damas P et al, 1997]. Su función principal es de quimioatrayente de neutrófilos (PMN) lo que induce la migración celular a sitios de inflamación [Blackwell TS and Cristman JW, 1996], "*in vitro*" además induce la degranulación de estas células [Martich G D et al, 1991. Feuerstein G et al, 1994]. Una vez activados, los PMN producen radicales libres y especies reactivas de oxígeno, que en condiciones fisiológicas facilitan la eliminación de patógenos, pero en concentraciones exacerbadas resultan en daño tisular [Verhoef J et al, 1995. Zeni F et al 1995. Standiford T J et al, 1995].

Existen evidencias de que otras citocinas como IFN- γ , e IL-12 también son mediadores importantes en la patogénesis del proceso séptico, por ejemplo la primera activa mecanismos encargados de la sobreproducción de óxido nítrico en macrófagos y PMN [Sohn EJ, 2007], mientras que ratones *knock out* para el receptor de IFN- γ resisten dosis 100 veces mayores de LPS, que los animales silvestres [Car B et al, 1994]. Por otra parte se ha reportado el aumento sérico de este mediador después de la administración de LPS a humanos o de *E. coli* a primates [Lainé P y col, 2005], mientras que su administración en forma recombinante a bovinos resulta en el aumento de la gravedad del proceso séptico. Por otro lado la IL-12 de macrófagos estimula la producción de IFN- γ por linfocitos Th1, que a su vez activan a fagocitos estimulando el estallido respiratorio e iNOS [Gately MK y col, 1998] induciendo especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno como el NO.

Citocinas anti-inflamatorias

Como se mencionó previamente el CARS resultante del SIRS, se caracteriza por la presencia de altas concentraciones de mediadores anti-inflamatorios, principalmente IL-10, que inhibe la expresión y síntesis de TNF, IL-1 e IFN- γ [Remick DG, 2001], y su presencia se asocia con protección durante el proceso séptico. Las primeras evidencias en este sentido surgieron en los años 90s, cuando Howard M (1993) administró profilácticamente IL-10 recombinante a ratones retados posteriormente con LD₉₀ de LPS; esta estrategia disminuyó significativamente los niveles de TNF mientras que el tratamiento con anticuerpos anti-IL-10 revirtió la protección. Este resultado fue constatado por un estudio paralelo pero independiente realizado por Gérard C y col (1993). En tanto que el pre-tratamiento de células mononucleares periféricas humanas cultivadas "*in vitro*" con IL-10 o bajas dosis de LPS, generó una importante disminución de la producción de TNF al estimularlas posteriormente con dosis altas de LPS [Chernoff AE y col, 1995]. Rogy MA y col (1995) por su parte, reportaron que la transfección de genes humanos de IL-10 y el receptor de TNF p55 en plásmidos vía intraperitoneal e intra-traqueal, resultó en la expresión de estos genes y protección de los animales retados con dosis letales de endotoxina. Además, la administración profiláctica de IL-10 "*in vivo*" también protegió a animales retados con dosis altas de enterotoxina B [Bean AG y col, 1993] y animales con sepsis inducida por CLP mostrando eficacia protectora terapéutica cuando fue administrada 6 h después de inducir la sepsis. Alternativamente se ha propuesto que esta citocina también puede regular negativamente la cascada de la

coagulación, muy probablemente vía la inhibición de la expresión del factor tisular [Pajkrt D y col, 1997], mecanismo que fue demostrado previamente “*in vitro*” [Ramani M y col, 1993]. Estas evidencias fortalecen el papel protector de IL-10 en sepsis, no obstante otros estudios reportan resultados contrastantes, por ejemplo las células de sangre periférica humana de pacientes con trauma y/o los esplenocitos de ratones utilizados en un modelo de quemaduras, produjeron mayores niveles de IL-10 “*in vitro*” que sus respectivos controles, lo que se asoció con un mayor número de casos de sepsis y un aumento en la susceptibilidad a infecciones respectivamente, mientras que el tratamiento con anticuerpos anti-IL-10, 24h después del reto, aumentó la sobrevivencia de los ratones [Lyons A et al, 1997]. En otro estudio utilizando con un modelo murino, se obtuvieron evidencias de que al ocasionar una quemadura importante, los niveles de IL-10 influyeron negativamente en la producción de citocinas pro-inflamatorias [Kelly JL et al, 1999]. Por otro lado, se ha reportado que ratones con sepsis inducida por CLP y posteriormente co-infectados vía intra-traqueal con *Pseudomonas aeruginosa*, produjeron altos niveles de IL-10 y bajos de IL-12; sin embargo, cuando se administraron anticuerpos anti-IL-10 justo antes del reto con la bacteria, se observó un aumento de la sobrevivencia y depuración de la bacteria [Steinhauser M et al, 1999]. Esta susceptibilidad a infecciones puede explicarse por el desarrollo de inmunoparálisis que afecta principalmente macrófagos, monocitos, linfocitos y granulocitos de pacientes sépticos. In vitro se observa que al ser estimulados con antígenos bacterianos, producen bajos niveles de citocinas pro-inflamatorias, además de presentar una baja capacidad fagocítica [van der Pool T, 2001], disminución en la adhesión y expresión de receptores de superficie. En estas

condiciones, los pacientes sépticos son más susceptibles a infecciones nosocomiales oportunistas [Volk HD y col, 2000].

Principales mecanismos de daño tisular

Adicionalmente a las alteraciones inmunológicas, se han identificado diferentes mecanismos de daño durante el proceso séptico (Figura 2), entre los más importantes se encuentran:

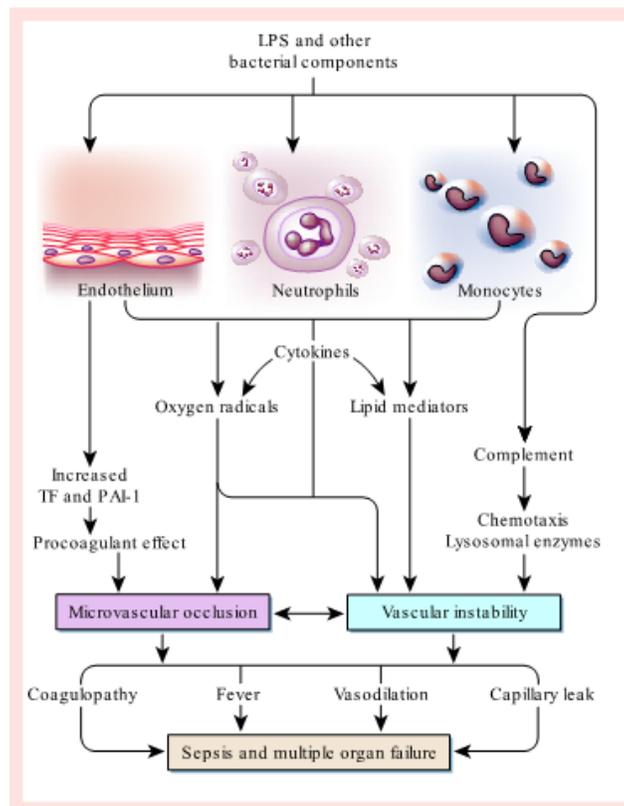


Figura 2. Mecanismos de daño en sepsis. El LPS y otros antígenos bacterianos activan células endoteliales, PMN y monocitos, las primeras producen factor tisular (TF) con actividad pro-coagulante. Los PMN y monocitos producen citocinas como TNF e IL-1 que inducen la producción de radicales de oxígeno, metabolitos del ácido araquidónico, óxido nítrico y mediadores pro-coagulantes. Como resultado en sepsis se manifiestan coagulopatía en forma de coagulación intravascular diseminada, fiebre o hipotermia, vasodilatación y disminución de resistencia vascular, mecanismos que contribuyen con el desarrollo de falla orgánica múltiple. Imagen tomada de Internet.

1) El estallido respiratorio (Figura 3), es un fenómeno observado en fagocitos al ser activados por IFN- γ y TNF, y durante el cual se observa un aumento en el consumo de oxígeno y glucosa y la producción elevada de anión superóxido (SO), radicales hidroxilo y peróxido de hidrógeno. Entre las enzimas que participan en este proceso se encuentran la NADPH oxidasa, superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa, hexoquinasa, G-6-P deshidrogenasa, lactonasa y descarboxilasa. Los mecanismos de daño microbiano se basan en peroxidación de lípidos de membrana, descarboxilación y desaminación de proteínas, labilización de proteínas estructurales y enzimáticas, halogenación e inactivación de proteínas, despurinación de ácidos nucleicos, fragmentación de DNA y RNA, inactivación de enzimas e interferencias metabólicas, etc. Como consecuencia de las concentraciones elevadas de IFN- γ y TNF, se incrementa la producción de SO, peróxido de hidrógeno y radicales hidroxilo, y por otro lado se inhiben los mecanismos anti-oxidantes. En condiciones de isquemia, la xantina oxidasa cataliza la formación de ácido úrico y la coproducción de SO cuya liberación resulta en el reclutamiento, activación y adherencia de neutrófilos a células endoteliales, estimulando la formación de más xantina oxidasa en endotelio y la subsecuente producción de SO.

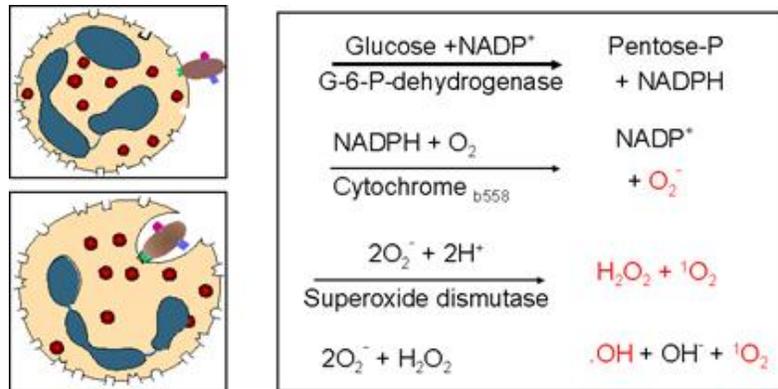


Figura 3. Estallido respiratorio. En presencia de IFN- γ y TNF, se observa un aumento en el consumo de oxígeno y glucosa y la activación de citocromo b558 y superóxido dismutasa, responsables de la producción de superóxido, peróxido de hidrógeno y radicales hidroxilo, mediadores que ocasionan daño inespecífico tanto a patógenos como tejidos. Tomado de la página web <http://pathmicro.med.sc.edu>

Durante la sepsis los PMN pueden observarse en órganos blanco de choque como son hígado, pulmón, riñón e intestino, en los que se liberan estos radicales produciendo daño directo e inespecífico, lo que contribuye con el desarrollo de disfunción orgánica. Finalmente, estos productos amplifican el proceso inflamatorio estimulando la expresión de genes de citocinas pro-inflamatorias, factores de crecimiento, quimiocinas, moléculas de adhesión, enzimas, inmunoreceptores y proteínas de fase aguda, lo que podría contribuir con del desarrollo del SIRS. [Macdonald J y col, 2003].

2) Coagulación intravascular diseminada (DIC). En condiciones fisiológicas la generación de trombina es fundamental para el mantenimiento de la homeostasis de la coagulación, ya que por un lado favorece la formación del coágulo mediante la conversión de fibrinógeno en fibrina y por otro lado, activa la proteína C con propiedades anticoagulantes [Toh ChH y col,

2003](Figura 4). Sin embargo, mecanismos que actúan de manera independiente o combinada como: a) la producción de factor tisular por leucocitos como respuesta a antígenos bacterianos como endotoxinas, b) la hemólisis y la liberación de lípidos y fosfolípidos hacia la circulación, y c) la activación local de factores de la coagulación como resultado de desórdenes vasculares [Kruger D, 2006], inducen un ambiente pro-inflamatorio y pro-coagulante.

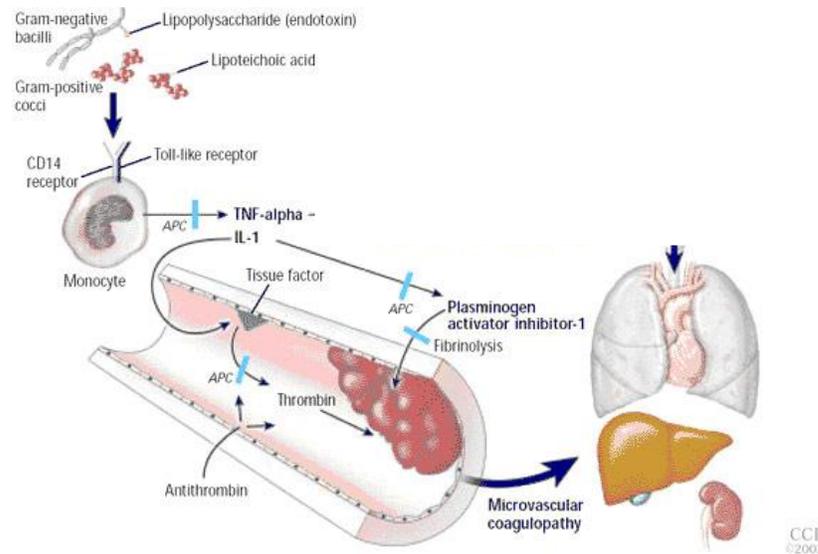


Figura 4. Activación de la cascada de la coagulación en sepsis. La activación de fagocitos por antígenos bacterianos en sepsis, induce la producción de citocinas como TNF e IL-1, estas por un lado inducen la producción de factor tisular por células de endotelio induciendo la formación de trombina, por otro lado inducen la producción del inhibidor-1 del activador del plasminógeno, como resultado se forma la fibrina y el desarrollo de coagulación intravascular diseminada, éste mecanismo contribuye con el desarrollo de falla orgánica múltiple. Imagen tomada de la página web [www. Clevelandclinicmeded.com](http://www.Clevelandclinicmeded.com)

Durante la DIC la inflamación y coagulación interactúan de forma bidireccional, por un lado la trombina puede activar las rutas pro-inflamatorias que incluyen la producción de TNF, IL-1 β e IL-5, además de

C5a, que a su vez pueden activar la cascada de coagulación [Rittirsch D y col, 2008], debido a que este ambiente pro-inflamatorio induce la producción de factor tisular por células mononucleares, endotelio y fibroblastos. La DIC también inhibe la fibrinólisis mediante el aumento de los niveles del inhibidor del activador de plasminógeno I y del inhibidor de la trombina activadora de la fibrinólisis, lo que evita la eliminación de fibrina, aunado a la disminución de factores que se encargan de regular la generación de trombina, como son antitrombina III, proteína C, y el inhibidor de la vía del factor tisular. En etapas tempranas de DIC, se pueden observar depósitos microvasculares de fibrina, que más adelante formarán microtrombos, que como consecuencia disminuirán el reabastecimiento de oxígeno y nutrientes a tejidos intestinal, hepático, renal y pulmonar, ocasionando un estado de isquemia y muerte celular [ten Cate H, 2004]; este mecanismo contribuye importantemente en el desarrollo de falla multiorgánica. La DIC es muy frecuente y se calcula que entre el 10-20% de pacientes con sepsis por bacterias Gram (-) muestran evidencias de este trastorno.

- Hipoperfusión ocasionada por la sobreproducción de óxido nítrico (NO). El ON tiene la función principal de mantener el tono vascular y el adecuado flujo sanguíneo. En condiciones fisiológicas, es producido principalmente por la óxido nítrico sintetasa endotelial y neuronal; no obstante, sus metabolitos interaccionan con una gran número de grupos químicos presentes en muchas moléculas ocasionando rompimientos moleculares.

Fisiológicamente, se piensa que este es uno de los principales mecanismos microbicidas celulares, ya que sus intermediarios pueden interaccionar con componentes moleculares de microorganismos, modificando su estructura y funcionalidad [Rojas-Espinoza O, 2004]. Sin embargo en situaciones de “daño” por infección, traumatismo, quemaduras, etc, los niveles de NO aumentan importantemente por la activación de la óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS) como respuesta a TNF e IFN- γ producidos por macrófagos, neutrófilos y NK [Kuhl SJ y Rosen H, 1998](Figura 5).

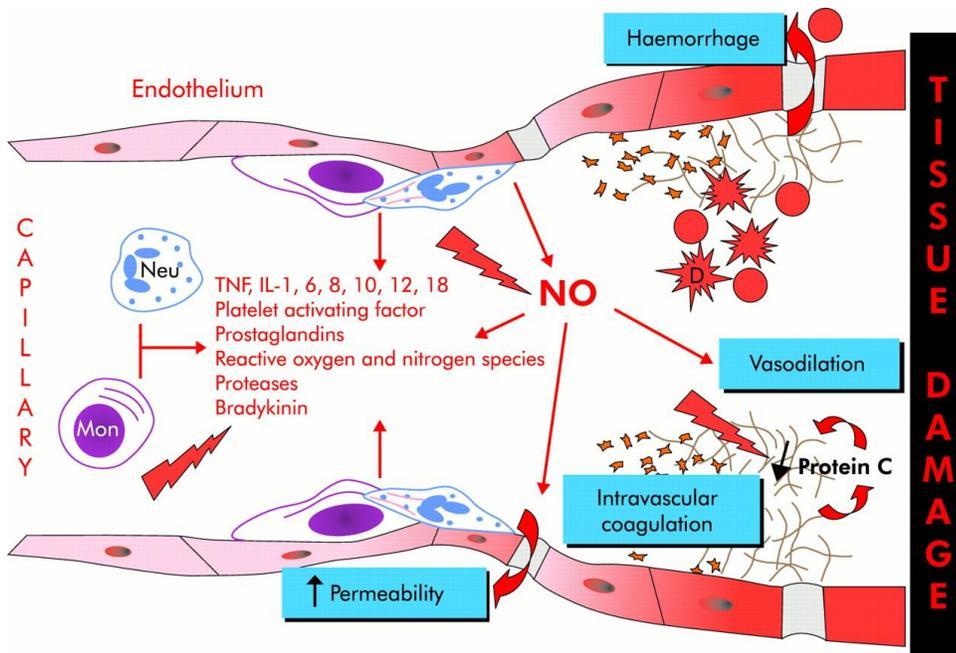


Figura 5. Producción de óxido nítrico en sepsis. Como respuesta a TNF e IFN- γ , la óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS) se activa, incrementando los niveles de óxido nítrico, en estas condiciones los enfermos desarrollan disminución de la resistencia vascular periférica y aumento de la permeabilidad vascular.

En estas condiciones los enfermos desarrollan disminución de la resistencia vascular periférica y aumento de la permeabilidad vascular. Otros mediadores

que contribuyen con este mecanismo son algunos metabolitos del ácido araquidónico sintetizados vía la ciclooxygenasa, como las prostaglandinas, entre las que destaca la PGE2 [Osuka K y col, 1997], gracias a su efecto vasodilatador, estos facilitan la pérdida de líquidos hacia el tercer espacio, afectando negativamente el volumen sanguíneo, oxigenación y nutrición celular, que en conjunto facilitan el desarrollo de hipoxia tisular. Se han identificado mecanismos que tratan de compensar la condición de hipotensión del paciente séptico, entre los que destacan la producción de hormona antidiurética (ADH), que se produce como respuesta al estímulo del nervio aferente en el sitio de daño, lo que aumenta la osmolaridad plasmática que es detectada por osmoreceptores hipotalámicos. Otra vía es la estimulación del nervio aferente vía receptores atriales como respuesta a la disminución del volumen sanguíneo, o vía barorreceptores aórticos y carótidos como respuesta a la disminución de la presión; en estas condiciones también se induce la producción de ADH, cuya principal función es promover la retención de agua libre por células del túbulo renal distal. Por otro lado, la renina se produce en estados de hipovolemia o disminución del flujo renal; ésta se transforma de angiotensina circulante a angiotensina I y la enzima convertidora de angiotensina transforma angiotensina I en angiotensina II, ésta última es un potente vasoconstrictor de arteriolas y estimula la secreción de aldosterona de corteza adrenal. Otras moléculas importantes son las inductoras de aldosterona como la ACTH y ADH en estados de hiponatremia e hipercalcemia. La aldosterona induce la reabsorción de iones sodio y estimula la excreción de hidrógeno y iones de potasio en orina. La secreción de ADH y

aldosterona se observa entre las 48-72h posteriores al estado séptico, resultado en la retención de líquidos y disminución de volumen urinario, por lo que la orina está concentrada (Zanotti-Cavazzoni S y Dellinger RP, 2006). No obstante, estos mecanismos son insuficientes para el restablecimiento de la presión arterial, por lo que se recomienda la administración de soluciones extracorpóreas.

- Otros mediadores. La cascada del complemento es activada durante etapas tempranas de la sepsis, generando altas concentraciones de la anafilotoxina C5a. Este mediador actúa en combinación con la cascada de la coagulación, activación de TLR4 y producción de citocinas como el factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF) y HMGB1 (High-mobility group box1) , amplificando el proceso inflamatorio en sepsis. MIF por su parte es un mediador que se ha encontrado en la fase aguda del proceso séptico y sus niveles se asocian con gravedad, es inducida por TNF, IFN- γ y C5a, que a su vez genera la activación de macrófagos y linfocitos T, y sobre-expresión de TLR4 en fagocitos. Se ha reportado que MIF antagoniza los efectos anti-inflamatorios de los esteroides, mientras que su neutralización atenúa el proceso inflamatorio y aumenta la supervivencia en sepsis experimental. Por su parte, HMGB1 fue inicialmente descrito como un factor de transcripción, pero actualmente se considera una citocina pro-inflamatoria. Este se expresa en todas las células nucleadas y su fuente principal en inflamación son macrófagos, monocitos y neutrófilos. Durante la sepsis se produce sistemáticamente y aunque sus niveles plasmáticos no siempre correlacionan

con la gravedad, su neutralización aumenta la sobrevida en endotoxemia y sepsis experimental. Finalmente la IL-17A induce la producción de citocinas como IL-1 β , IL-6 y TNF, además de facilitar la comunicación entre linfocitos y fagocitos. La neutralización de este mediador 12h después de inducir sepsis, aumenta la sobrevida de ratones; mientras que su neutralización se asocia con disminución de los niveles de citocinas pro-inflamatorias, no obstante estos hallazgos se han realizado en modelos experimentales [Rittirsch D et al, 2008].

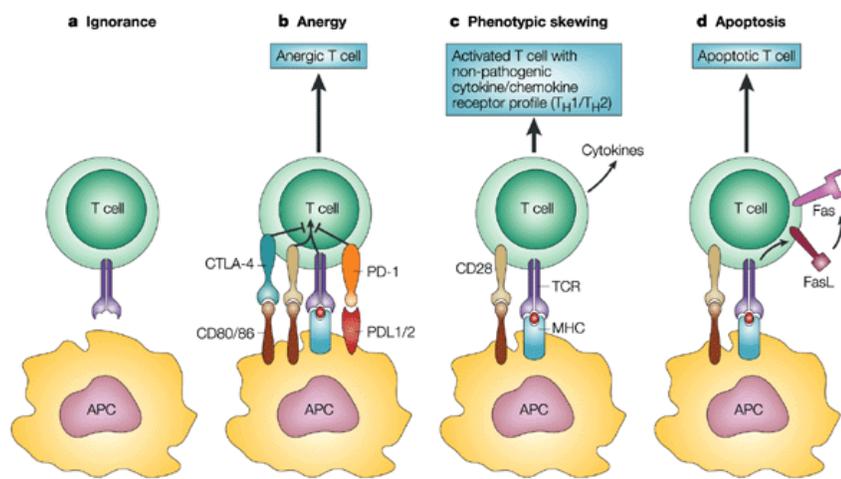
Regulación o polarización de la respuesta inmune en sepsis

Por un lado se ha propuesto que la respuesta pro-inflamatoria exacerbada en sepsis resulta en el daño tisular y contribuye con la disfunción orgánica, por lo que se sugiere el desarrollo de estrategias que favorezcan la respuesta anti-inflamatoria y de esta manera atenuar el daño en tejidos [Lamy M y Deby-Dupont G, 1995]. La otra postura apoya que la respuesta anti-inflamatoria podría generar inmunoparálisis con el consecuente establecimiento de infecciones, la promoción de un perfil pro-inflamatorio en este caso, podría activar mecanismos bactericidas. Desde nuestro particular punto de vista, ambas posturas se cumplen durante el desarrollo natural del SIRS y el CARS, de modo que la polarización de la respuesta inmune (RI) no parece ser la mejor alternativa para la protección en sepsis, por el contrario polarizar la respuesta podría potenciar mecanismos deletéreos y acelerar el daño en esta enfermedad. Por lo tanto, pensamos que una alternativa terapéutica debe de enfocarse en regular las respuestas pro- y anti-

inflamatorias y no depletarlas, buscando con esto atenuar y mantener las respuestas cercanas a lo fisiológico.

Tolerancia

Se denomina tolerancia a la hiporespuesta inmunológica contra un antígeno. En linfocitos ésta se logra mediante mecanismos como anergia, deleción clonal, cambios del balance de citocinas y la intervención de células T reguladoras [Ferrara JL, 2000]. Brevemente, en el primero de los casos, las células T reconocen antígenos mediante su receptor (TCR) en contexto de moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC), no obstante como resultado de una inadecuada interacción entre CD28 de linfocitos T y B7 de células presentadoras de antígenos (APC), los linfocitos no se activan adecuadamente resultando en células anérgicas (Figura 6).



Nature Reviews | Immunology

Figura 6. Mecanismos de tolerancia inmunológica. En ésta figura además del proceso de a) ignorancia inmunológica hacia antígenos propios por mecanismos de tolerancia central, se observan tres mecanismos fundamentales para el mantenimiento de tolerancia, en b) la anergia clonal que depende de una adecuada interacción de receptores entre células presentadoras de antígenos y linfocitos T, c) el balance de citocinas y d) la deleción clonal por apoptosis como resultado de la expresión de Fas-ligando de Fas.

Por otro lado, durante la delección clonal, las células estimuladas con grandes concentraciones de antígeno son fuertemente activadas, lo que induce la presencia de altos niveles de Fas (CD95) y su ligando (FasL o CD95L). La interacción entre Fas y FasL en la superficie de las células T en proliferación, activa la cascada de las caspasas ocasionando apoptosis y con esto delección de estas clonas [Voll RE y col, 1997].

Por su parte, un balance de citocinas caracterizado por IL-4, IL-10 y TGF- β se ha asociado con el desarrollo de tolerancia; en presencia de IL-4 se pueden reclutar linfocitos B y activarse de manera T independiente, sin desarrollar características de APC profesionales. En estas condiciones se inhibe la producción de IL-1, TNF e IL-8 y éste mecanismo se ha asociado con el desarrollo de enfermedades autoinmunes. La IL-10 por su parte, inhibe la expresión de MHC clase II, de CD80 y CD86 sobre células presentadoras de antígeno y la producción de IL-1, IL-6, IL-8 y TNF. En tanto que TGF- β inhibe la expresión de receptores para IL-12 e IL-2, regulando negativamente la expresión de MHC clase II sobre macrófagos. Por último, los linfocitos T reguladores como CD4+CD25+FoxP3+ (Treg), Tr1 y Th3, predominantemente suprimen la inmunidad dependiente de células T, mediante mecanismos que requieren el contacto célula-célula, probablemente involucrando moléculas como CTLA4 y/o TGF- β unido a membrana y/o la secreción de IL-10 y TGF- β [St Clair EM y col, 2007]. Se ha demostrado que los linfocitos CD4+CD25+FoxP3+ son fundamentales para el control de enfermedades autoinmunes y procesos alérgicos, de modo que individuos deficientes para la expresión de FoxP3 desarrollan fenómenos

autoinmunes. En tanto que Tr1 y Th3 , además de otros subgrupos de células Treg, suprimen la actividad de linfocitos T mediante la secreción de IL-10 y TGF- β . Por su parte, las células NKT caracterizadas por ser CD4-CD8-TCR $\alpha\beta$ +, previenen el desarrollo de diabetes al ser transferidas a ratones NOD, fenómeno que parece depender de la producción de IL-4 e IL-10 [Hammond KJL y col, 1998].

Tolerancia al LPS

A diferencia de los mecanismos anteriores, la tolerancia al LPS presenta características particulares. En los primeros estudios en que se administró la vacuna tifoidea, se reportó que indujo fiebre, sin embargo su administración repetida, la atenuó paulatinamente [Heyman, 1945]. El aislamiento de la molécula “pirógena” a partir de cultivos bacteriano, permitió evaluar su efecto específico. Se observó que su administración intravenosa (iv), generó además hipotensión, hipoglucemia, coagulopatía e incluso en dosis altas la muerte de los animales experimentales; no obstante de nuevo se observó que su administración repetida atenuó la sintomatología. Diversos estudios corroboraron que el LPS aislado podía generar tolerancia después de uno o varios días de exposición. Simultáneamente Favorite y Morgan (1942), exploraron la producción temprana de anticuerpos dirigidos a los pirógenos, descartando que este mecanismo fuera responsable de la desensibilización, sin embargo, tiempo después Greisman y colaboradores (1965) establecieron la existencia de dos fases de tolerancia, una temprana dependiente de macrófagos y la tardía mediada por anticuerpos. No obstante estos hallazgos, diversas evidencias sugieren que los mecanismos inducidos

durante la desensibilización al LPS, son distintos; en este contexto en 1993 Mengozzi M y Ghezzi P realizaron una revisión bibliográfica y analizaron varios estudios en los que se administraron dosis subletales de LPS de manera única o repetida y por las vías IP o intravenoso (IV), observándose una asociación entre la tolerancia y la disminución de las concentraciones séricas de TNF e IL-6. En otros estudios se ha probado además una disminución de IL-1, IFN- γ e IL-12 y aumento de IL-10 [Varma TK y col, 2005]. Por otro lado, estudios "in vitro" con monocitos humanos desensibilizados con LPS, mostraron que durante este proceso aumento de la producción de IL-10 y TGF- β [Radow F y col, 1995]. Por otro lado, estudios en la mucosa oral que está expuesta continuamente a grandes cantidades de bacterias y antígenos, han mostrado que los receptores tipo Toll podrían jugar un papel preponderante para el desarrollo de tolerancia [Muthukuru M y col, 2005], ya que macrófagos/monocitos de ratón pre-expuestos a bajas concentraciones de LPS, muestran una reducción de la expresión de TLR4 (Receptor Tipo Toll 4) [Nomura F y col, 2000] y de MHC clase II, sin embargo estos cambios parecen ser independientes al efecto de IL-10 o TGF- β [Moreno C y col, 2004].

Otros fenómenos observados durante el proceso de tolerancia son la reducción de su capacidad de adhesión de neutrófilos al endotelio en varios órganos [Lush CW et al, 2000] y la reducción de la fiebre, este último mediado parcialmente por ON, ya que animales knock-out para iNOS tratados repetidamente con LPS o tratados con inhibidores de iNOS, desarrollan fiebre al ser retados con dosis mayores de LPS [Dias MB y col, 2005].

Molecularmente, uno de los blancos durante la tolerancia al LPS es IRAK1. Se ha propuesto que éste es ubiquitinado y degradado después de la estimulación celular con LPS o IL-1 β . Por otro lado, se ha descrito que la estimulación con LPS induce una redistribución de balsas de lípidos sobre la membrana celular y forma macrodominios, como resultado, la fluidez de la membrana cambia y se observa la migración de receptores, como TLR4 que interacciona con CD14, además se activa la PKC ζ ; sin embargo en estado de tolerancia, se atenúa la redistribución y formación de macrodominios y la activación de PKC ζ [Cuschieri J y col, 2006]. Por otro lado, se ha observado que las proteínas con dominios SH2 y función de inositol fosfatasa (SHIP), actúan como potentes inhibidores de la vía NF κ B, este efecto inhibitor se lleva a cabo principalmente a través de la hidrólisis por la fosfatidilinositol 3 cinasa que genera PI-3, 4-P2 a partir de PI-3, 4, 5-P3 [Sly LM y col, 2004]. Este mecanismo ha sido corroborado mediante la utilización de macrófagos SHIP $^{-/-}$ que no desarrollan tolerancia contra LPS al ser estimulados “in vitro”, y por el contrario se observa aumento de los niveles de SHIP en macrófagos expuestos a dosis subletales de LPS, asociado con menor fosforilación de Stat1, Akt y Erk1/2. Este mecanismo es importante, ya que la reducción de la fosforilación de Stat1 se asocia con reducción en la producción de citocinas proinflamatorias, mecanismo que al parecer puede ser mediado por TGF- β . Finalmente, células de la línea THP-1 tolerizadas con LPS e incubadas con inhibidores de proteasas, incrementan la síntesis de mRNA para IL-1 β , por lo que se ha propuesto que la síntesis y actividad proteínas represoras lábiles, se incrementan como resultado de la tolerancia [LaRue KEA y McCall CE, 1994].

Modulación del perfil de citocinas en sepsis

La modulación del balance de citocinas ha influido importantemente en el desenlace de modelos de sepsis, por ejemplo, se ha reportado que la administración de anticuerpos anti-TNF ha protegido en los modelos de ChE (Howard M, 1993 y Mengozzi M y Ghezzi P, 1993), pero no en el modelo de sepsis inducida por CLP (van Der Pool T et al, 1995). En tanto que el tratamiento con citocinas recombinantes como IL-10, también mejora la sobrevivencia de los animales con ChE [Gérard C y col, 1993], mientras que el tratamiento con anti-IL-10 aumenta la mortalidad, resultado que se asoció con aumento de los niveles de TNF [van der Pool T y col, 1995. Standiford T y col, 1995] y que ha permitido establecer la importancia protectora de IL-10 endógena en este modelo.

Por otro lado, la sepsis inducida por CLP con una aguja calibre 18G, generó la producción de bajos niveles de $TNF\alpha$ e IL-10 lo que se asoció con una alta mortalidad de ratones, mientras que la punción del ciego con una aguja calibre 25G, indujo un aumento de los niveles de IL-10 y disminución de los de $TNF\alpha$, resultando en una baja mortalidad [Walley K y col, 1996]. Adicionalmente, la administración de anticuerpos anti- $TNF\alpha$ o anti-IL-10 en animales con CLP, se ha asociado con aumento de la mortalidad [Echtenacher B y col, 2001]. Estos resultados sustentan que el abatimiento de ambas respuestas pro- y anti-inflamatoria podrían resultar en aumento de la susceptibilidad de animales con sepsis por CLP.

Justificación

Durante el proceso séptico, se activan mecanismos de daño que influyen en el deterioro fisiológico de los pacientes. Muchos de estos mecanismos son resultado de la polarización de la respuesta inmune hacia el SIRS o CARS. Paradójicamente, la gran mayoría de estudios con animales o incluso humanos, proponen estrategias con el objetivo de neutralizar totalmente las citocinas circulantes, subestimando sin duda su papel protector natural y por otro lado, los mecanismos de daño que podrían ser activados o incluso potenciados con la intervención. Considerando que durante un proceso inflamatorio “fisiológico” es fundamental su regulación, proponemos en primer lugar evaluar la tolerancia al LPS como una posible estrategia para proteger en sepsis inducida por CLP, identificar citocinas asociadas con protección y posteriormente, evaluar el efecto de anti-citocinas en dosis que busquen regular sus niveles y no eliminarlas de la circulación.

Hipótesis

"El LPS administrado por la vía oral, modificará el balance inflamatorio, así como el desarrollo y desenlace de la sepsis inducida por ligadura y punción de ciego (CLP)".

Objetivo general

- Explorar el efecto de la administración de dosis subletales de LPS por la vía oral, en la supervivencia y producción de citocinas de animales con sepsis polimicrobiana.

Objetivos particulares

- Evaluar el efecto profiláctico de dosis subletales de LPS administradas por las vías oral e intraperitoneal en sepsis inducida por CLP.
- Identificar modificaciones en el balance inflamatorio, inducidas por el tratamiento con LPS.
- Identificar posibles balances inflamatorios asociados con resistencia y/o susceptibilidad en sepsis.
- Intervenir con diferentes dosis de anti-citocinas específicas y definir su efecto profiláctico en el modelo de CLP.
- Definir el balance inflamatorio generado por tratamientos protectores con anti-citocinas.
- Probar terapéuticamente tratamientos profilácticos protectores.

Metodología

Etapa 1. Evaluación del efecto profiláctico del LPS vía oral en animales con sepsis inducida por CLP.

Tratamientos. Ratones Balb/c machos de 8-12 semanas de edad fueron mantenidos en condiciones estándar de bioterio y agrupados en 1) grupo IP, tratado intraperitonealmente con LPS; 2) grupo O, tratado oralmente con LPS; 3) grupo C, a estos animales se les administraron 100 μ l de RPMI sin suplementar (vehículo en el que se diluyó el LPS) vía intraperitoneal (IP) u O y 4) grupo sham, sin un pretratamiento con LPS. El pre-tratamiento con LPS se realizó administrando 50 μ g de endotoxina diluidos en 100 μ l de RPMI, dos veces por semana y hasta completar 5 dosis, Una semana después de terminar los tratamientos se les indujo sepsis mediante ligadura y punción de ciego.

Modelo de Ligadura y punción de ciego (CLP). Los animales fueron anestesiados con 25 mg/kg de pentobarbital sódico administrado vía IP. Bajo condiciones de esterilidad en campana de flujo laminar se les realizó una incisión de 1-2 cm de longitud en la línea media del abdomen, el ciego fue expuesto y ligado en su base con una sutura de seda negra 4-0 sin ocluirlo, se puncionó dos veces con aguja calibre 21G y se exprimió para ocasionar la salida de heces. El ciego se colocó nuevamente en cavidad peritoneal y la incisión se suturó en dos

capas (muscular y dérmica) con seda negra 4-0, a los animales se les administró intraperitonealmente 0.5 ml de solución salina para resucitarlos. El grupo Sham fue sometido a una laparotomía apegada al procedimiento quirúrgico anterior, con la excepción de que el ciego no se ligó ni puncionó. La sobrevida en cada grupo fue evaluada diariamente y durante 2 semanas. Este estudio fue sometido y aprobado por el comité de bioética del Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”.

Hemocultivos. 24 hrs después de la CLP, algunos animales fueron sacrificados para realizarles hemocultivos. Brevemente, la bacteremia fue documentada mediante la obtención de sangre por punción cardiaca en condiciones de esterilidad. 200 μ l de sangre fueron sembrados en Bac Tec Peds Plus/F culture flasks (Becton Dickinson). Estos se incubaron durante 7 días y la positividad fue detectada por el sistema automatizado Bactec system (Becton Dickinson). Por último, los patógenos específicos fueron identificados con baterías bacteriológicas específicas.

Obtención de sueros. Algunos animales de cada grupo fueron anestesiados con una sobredosis de pentobarbital sódico vía peritoneal a las 0, 1.5, 4, 24 y 48 hrs posteriores a la cirugía. Se les obtuvo la sangre mediante punción cardiaca con jeringa de insulina nueva y desechable. La sangre se dejó coagular en tubos eppendorf a 4°C y se centrifugó a 3000 rpm/ 15 min a 4°C, los sueros se

colocaron en tubos eppendorf nuevos y se almacenaron a -75°C hasta la evaluación de citocinas.

Obtención de órganos: 48h después de la inducción de la sepsis, se aislaron pulmones e hígados de algunos animales de cada grupo. Los pulmones fueron perfundidos con formaldehído al 10%, inyectándolo por la tráquea y los hígados se colocaron inmersos en formaldehído al 10%. Los órganos fijados se pasaron por alcohol etílico con diferentes purezas iniciando con 70%, 90% y absoluto, en cada uno de los alcoholes se incubaron los órganos por 1h. A continuación se pasaron por 3 incubaciones con xilol 1h c/u, después se pasaron por 3 parafinas a 60°C durante 1h c/u, los tejidos se incluyeron en parafina y por último se les realizaron cortes de 3-5 micras. Los cortes se colocaron en laminillas previamente silanizadas y los tejidos fueron desparafinados a 60°C durante 20min, se les realizaron 2 lavados con xilol con una duración de 2-3min c/u, después se les realizó un baño en una solución xilol-alcohol (vol:vol), se continuó con un baño en alcohol absoluto, uno de alcohol al 96%, otro de alcohol al 70% y finalmente uno con agua destilada. La laminilla se colocó en hematoxilina durante 7min, se lavó al chorro de agua para enjuagarla, después se pasó por baño en alcohol ácido e inmediatamente se enjuagó con agua corriente. El viraje de color se realizó con un baño en carbonato de litio, para proseguir con un baño con agua destilada y otro baño en alcohol al 96, la laminilla se sumergió 5-6 veces en eosina y se pasó a alcohol absoluto en el que se realizaron 3 baños, nuevamente se colocó en xilol 2 min y se pasó a un nuevo xilol. El corte fue cubierto con un cubreobjetos previa colocación de 1 gota de resina hepóxica.

Análisis histológico. A partir de los cortes de pulmón teñidos con hematoxilina-eosina, se determinó el porcentaje del área ocupada por material proteico precipitado en la superficie de la pared alveolar (membranas hialinas) que indica edema pulmonar con daño alveolar difuso, esto fue determinado al azar en cinco áreas por pulmón utilizando un aumento 400X usando un equipo Zidas Zeiss image analyser (Carl Zeiss Ltd, Herts, UK). Por otro lado en cortes de hígado teñidos de la misma forma, se identificó por morfología el número de células de Kupffer (células basofílicas elongadas) localizadas en la superficie del lumen sinusoidal, se determinaron en cinco áreas tomadas al azar, utilizando un aumento de 200X.

Determinación de citocinas por ELISA. La evaluación de TNF, IFN- γ e IL-10 en suero se realizó mediante la técnica de ELISA en Sandwich respetando el protocolo sugerido por Pharmingen.

Amplificación de mRNA mediante PCR punto final. Otro lote de animales que incluyó a todos los grupos experimentales, fueron sacrificados a las 1.5, 4, 24 o 48 hr después de la CLP, los hígados y pulmones fueron aislados y congelados inmediatamente a -75°C . 100 mg de cada tejido fueron homogenizados en 1 ml de Trizol (Gibco, Rockville, MD). El RNA total fue obtenido cumpliendo las instrucciones sugeridas por el fabricante y finalmente disuelto en agua con 0.01% de dietilpirocarbonato. Un μg de RNA total fue marcado con oligo (dT) 12-18 y

utilizando la enzima reversa transcriptasa, fue transcrito a DNA complementario (cDNA). Se colocó 1 µl del transcrito por cada reacción y se evaluó la expresión génica utilizando los siguientes pares de primers: Para β-actina, sense 5' TGGAATCCTGTG GCATCCATGAAAC, anti sense 5' TAAAACCGCAGCTCAGTAACAGTCCG. TNF sense 5' GTTCTATGGCCCAGACCCTCACA, anti sense 5' TCCCAGGTATATGGG TTCATACC. Primers específicos fueron agregados a 1 µg de cDNA . El programa utilizado para amplificar β-actina consistió en 1 incubación por 5 min a 94° y posteriormente 34 ciclos, cada ciclo consistió en incubaciones de 1 min a 94°, 1 min a 60°C y 1 min a 72°C; al final de los ciclos la reacción pasó por un período de elongación de 5 min a 72°C. Para el TNF la incubación inicial fue de 94°C por 4 min y después 29 ciclos, cada uno consistió de incubaciones a 94°C por 1 min, 62°C por 1 min y 72°C por 1 min; al final de los ciclos la reacción pasó por una elongación de 5 min a 72°C. Después de la amplificación, las muestras fueron separadas en un gel de agarosa al 2%, conteniendo bromuro de etidio (0.3 mg/ml), las bandas fueron visualizadas y fotografiadas con luz UV. La expresión de TNF fue normalizada comparándola con la expresión relativa de β-actina.

Detección de anticuerpos anti-LPS. La presencia de anticuerpos anti-LPS fue evaluada mediante el método de ELISA modificado del procedimiento original descrito por Pollack M et al (1983), que brevemente consistió en sensibilizar placas Maxisorb (NUNC) con 100 µl de LPS (25µg/ml) por pozo, diluido en el buffer de unión (15mM Na₂CO₃, 3 mM NaN₃, pH 9.5) y la placa se incubó toda la

noche a 4°C. Los sueros que se probaron fueron obtenidos de animales con 24h de sepsis, estos fueron diluidos 1:64 en el buffer diluyente contenido en el “*Mouse Typing* sub-isotyping kit” (Bio-Rad) y 100 µl por pozo del suero diluido fueron adicionados a las placas. Los isotipos IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 and IgM fueron determinados agregando 100 µl por pozo del anticuerpo biotinilado de conejo anti-ratón, cumpliendo con las instrucciones sugeridas por el fabricante.

Análisis estadístico. Las comparaciones entre las curvas de supervivencia fueron realizadas usando Mantel- Haenszel logrank test. Las diferencias de citocinas entre grupos fueron analizadas usando una prueba de Kruskal-Wallis, y en aquellas que se encontraron diferencias se compararon los grupos con una prueba de Mann-Whitney. Los datos fueron analizados con el software Prism 4.0 (Graphpad). Las diferencias se consideraron significativas cuando $p < 0.05$.

Etapa 2. Tratamiento con anticuerpos anti-citocinas

Tratamiento profiláctico. Durante tres experimentos independientes, los animales (Harlan, México) recibieron fragmentos $F(ab')_2$ anti-TNF o anti-IFN- γ vía ip diluidos en 100 µl de solución salina estéril, el tratamiento se inició 2h antes de la inducción de la sepsis por CLP y se continuó cada 24h hasta completar 5 dosis totales. Para probar cada anticuerpo, los animales se agruparon en a) tratados con 0.01 mg/kg, b) con 0.1 mg/kg, c) con 1 mg/kg, o con d) 10 mg/kg. Los grupos sham (S) y control (C) recibieron solución salina fisiológica IP con el mismo

esquema. Posteriormente a los animales se les indujo sepsis por CLP (excepto al grupo sham), apegándonos al procedimiento mencionado previamente y denominado “modelo de ligadura y punción de ciego”.

Citocinas en suero. Para evaluar las citocinas séricas en esta etapa, algunos animales de cada grupo fueron anestesiados con una sobredosis de pentobarbital sódico vía IP. La sangre fue obtenida por punción cardiaca a las 3, 24 y 48 h después de la CLP. La sangre se colocó en tubos ependorf de 0.6 ml y fue centrifugada a 3000 RPM durante 15 min a 4°C. Los niveles de TNF, IL-1 β , IL-10, TNFR1 y TNFR2 fueron determinados utilizando el método de ELISA en sándwich, usando el kit comercial duoSet system (R&D Systems; Minneapolis, MN) respetando el protocolo propuesto por el fabricante.

Tratamiento terapéutico. Una vez identificada la dosis profiláctica protectora, se evaluó su posible papel terapéutico usando anticuerpos anti-TNF o anti-IFN- γ . Con este objetivo se les indujo sepsis por CLP a un lote de animales agrupados en a) tratados con anti-citocina -2h, b) -30min, c) +30min, d) +2h y e) +24h del momento de inducir sepsis, acorde con el protocolo utilizado durante los tratamientos profilácticos. Los tratamientos se administraron cada 24h hasta completar un total de 5 dosis y la sobrevida se evaluó diariamente a lo largo de dos semanas.

Análisis estadístico. Las curvas de sobrevida fueron comparadas usando una prueba de log-rank Mantel-Haenzel. Las diferencias entre grupos fueron

realizadas usando una prueba de Kruskal-Wallis, y en aquéllas que se encontraron diferencias se compararon los grupos con una prueba de Mann-Whitney. Los datos fueron analizados con el software Prism 4.0 (GraphPad). Las diferencias se consideraron significativas cuando $p < 0.05$.

Resultados

Efecto profiláctico de dosis subletales de LPS por diferentes vías

Sobrevida. El papel protector del LPS, inicialmente fue explorado administrándolo en dosis subletales por las vías intraperitoneal (IP) y oral (O) de manera profiláctica y posteriormente a estos animales se les indujo sepsis por CLP. En este experimento se documentó que el 100% de animales del grupo sham (S) sobrevivieron (Figura 7), en tanto que los animales tratados con dosis subletales de LPS vía O mostraron una supervivencia significativamente mayor ($p < 0.05$) vs el grupo C (87% vs 50%) 96h después de la inducción de la sepsis, mientras que en el grupo tratado IP fue solo del 65% (ns) vs el grupo C.

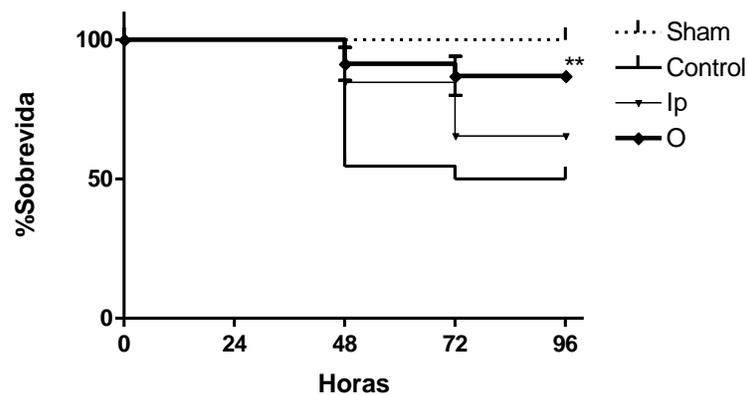


Figura 7. Animales tratados dosis subletales de LPS La supervivencia representada en la gráfica corresponde a tres experimentos independientes; donde la n para cada grupo fue de C=22, IP=26 y O=23. Las comparaciones estadísticas fueron realizadas con una prueba long Rank de Mantel-Henzel. La diferencia de $**p < 0.01$ se encontró entre C vs O.

Citocinas séricas. Una vez que se identificó la vía O como protectora, se evaluaron los niveles séricos de TNF, IFN- γ e IL-10; la detección de la primera fue inconsistente en los grupos, en tanto que el IFN- γ se detectó elevado 4h después de la CLP en los grupos C e IP y significativamente disminuido en el grupo O ($p < 0.05$) vs C (Tabla 1), mientras que la IL-10 se detectó elevada en todos los grupos, y aunque ésta mostró niveles mayores (alrededor de 6 veces) en animales del grupo O vs C, las diferencias no fueron significativas. En suero de animales normales no fueron detectadas éstas citocinas.

| Grupo | IFN-γ | IL-10 |
|----------------|--------------------------------|----------------|
| Sham | 0 (0-89) | 85 (55-216) |
| Control | 70 (0-547) | 335 (0-2376) |
| IP | 117 (70-145) | 194 (168-1685) |
| O | 0 (0-68) * | 1997 (73-4104) |

Tabla 1. Citocinas en suero de animales tratados con LPS (4h). Concentraciones séricas de IFN- γ e IL-10 inducidas por un procedimiento quirúrgico no séptico (sham) o por CLP. La n fue de alrededor de 5-6 animales por grupo. Las comparaciones estadísticas entre grupos fueron realizadas usando una prueba de Kruskal-Wallis, y en aquellas que se encontraron diferencias se compararon los grupos con una prueba de Mann-Whitney. Se consideraron diferencias significativas cuando la * $p < 0.05$.

Expresión de TNF en órganos blanco. Debido a la inconsistencia en la detección de TNF sérico, se decidió evaluar su expresión en dos órganos blanco del choque. En hígados del grupo O, el TNF fue expresado por un corto período

(hasta las 4h), mientras en IP se observó hasta las 48h y en C hasta las 24h (Figura 8a). En pulmones de animales O, la expresión de TNF se retrasó hasta las 4h comparado con IP y C en los que se expresó desde la 1.5h posterior a la inducción de la sepsis (Figura 8b).

Inflamación en órganos blanco. Por otro lado se exploró el grado de inflamación tomando como indicadores tisulares el porcentaje de células de Kupffer en hígado y porcentaje de edema pulmonar. La figura 9 muestra en el grupo O una baja proporción de células de Kupffer comparado con los grupos C ($27.5 \pm 2\%$ vs $37.75 \pm 2.21\%$) ($p < 0.05$) e IP ($39 \pm 3\%$) ($p < 0.05$). No se observaron diferencias entre los grupos S vs O ($31.8 \pm 2.5\%$), ni entre IP vs C (Figura 9e). Por otro lado, mientras que en pulmón de S no se observó edema (Figura 10), en C la extensión de membranas hialinas fue del $26.67 \pm 7.92\%$, en el grupo O se redujo ($12.51 \pm 16.5\%$) ($p < 0.05$), mientras que en IP se observó edema similar al observado en C (Figura 10e).

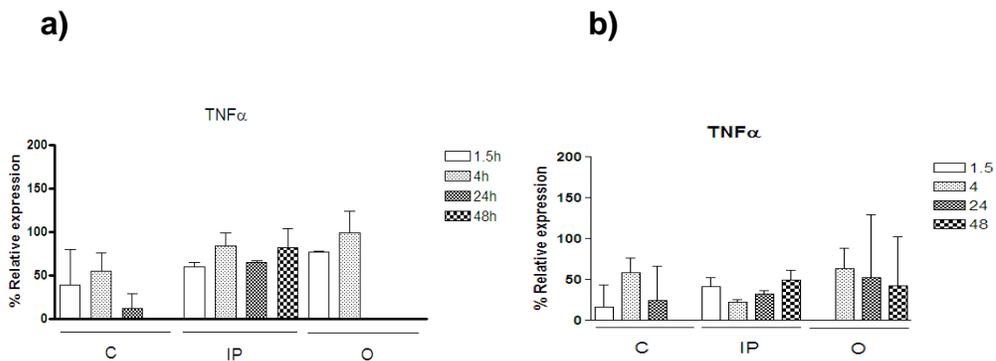


Figura 8. Expresión de TNF en órganos blanco. La expresión relativa de TNF se realizó por RTPCR a partir de mRNA obtenido de a) hígado y b) pulmón de animales de los grupos C, IP y O. La figura representa dos experimentos independientes, con una n=8. Las figuras presentan las medias \pm desviación estándar.

Figura 9. Porcentaje de células de Kupffer en hígado de animales con sepsis inducida por CLP

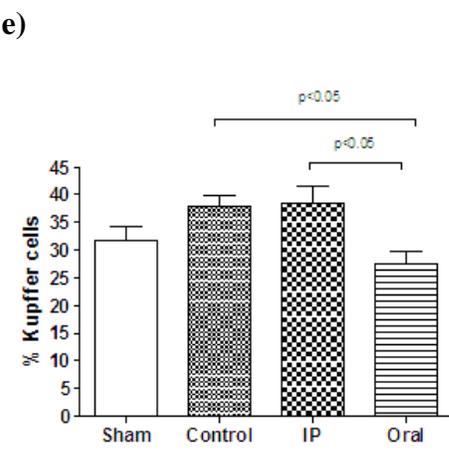
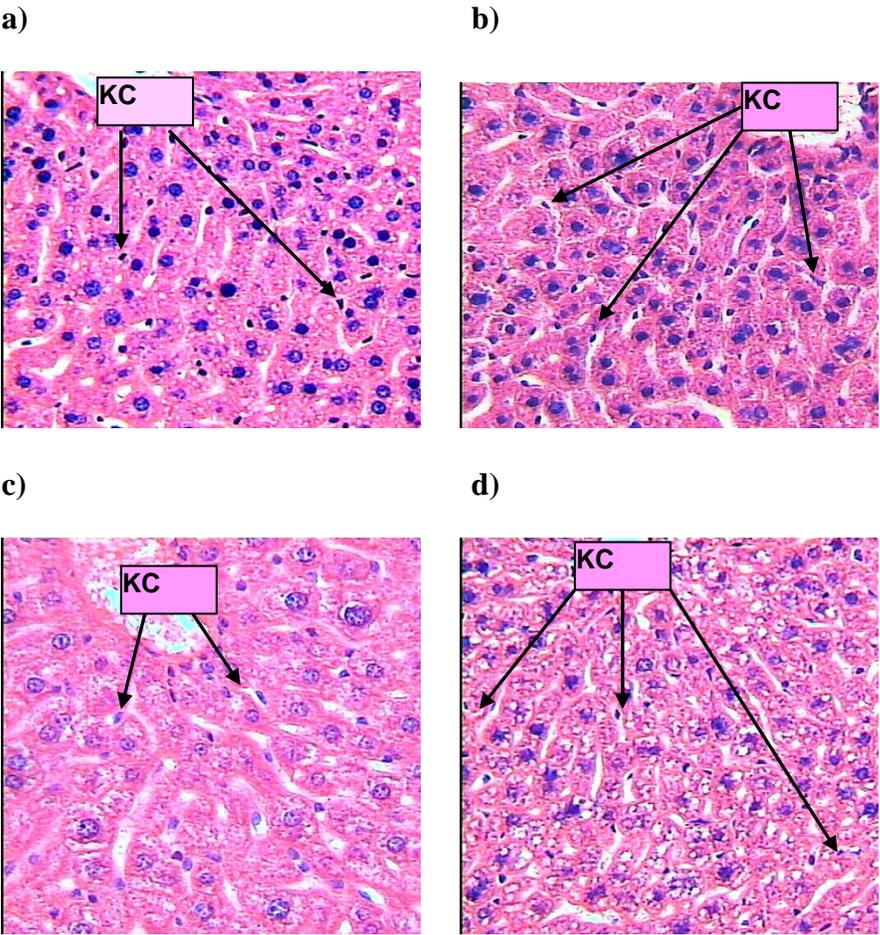
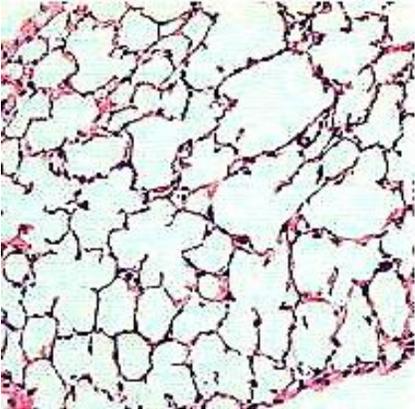
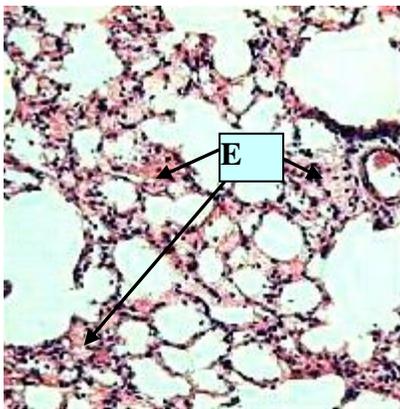


Figura 10. Porcentaje de edema pulmonar presente en animales con sepsis inducida por CLP.

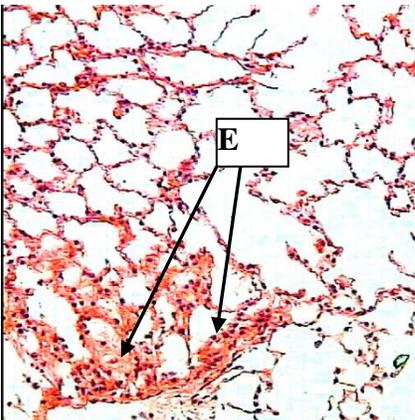
a)



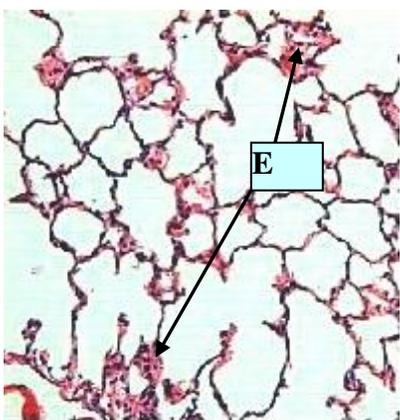
b)



c)



d)



e)

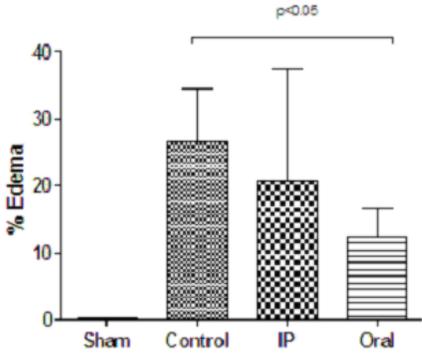


Figura 9. Porcentaje de células de Kupffer en hígado de animales con sepsis inducida por CLP. Las micrografías tomadas a un aumento 200X son representativas y muestran el hígado de ratones 48h después del proceso quirúrgico (Figura 9a). Los tejidos fueron teñidos con la técnica de hematoxilina-eosina y corresponden a un animal representativo de animales a)sham, b) control, c) tratados intraperitonealmente (IP) y d) tratados oralmente (O). Por otro lado, en la gráfica se puede observar el porcentaje de células de Kupffer (Figura 9b) encontradas en hígado de los diferentes grupos y es representativa de dos experimentos independientes con una n=8 animales por grupo. En la gráfica se presentan las medias \pm desviación estándar y solo el grupo O mostró una proporción significativamente baja ($p<0.05$) vs los grupos control e IP.

Figura 10. Porcentaje de edema pulmonar presente en animales con sepsis inducida por CLP. Las micrografías tomadas a un aumento 200X son representativas y muestran el pulmón de ratones 48h después del proceso quirúrgico (Figura 10a). Los tejidos fueron teñidos con la técnica de hematoxilina-eosina y corresponden a un animal representativo de animales a)sham, b) control, c) tratados intraperitonealmente (IP) y d) tratados oralmente (O). Por otro lado, en la gráfica se puede observar el porcentaje de edema encontrada en el pulmón (Figura 10b) de los diferentes grupos y es representativa de dos experimentos independientes con una n=8 animales por grupo. En la gráfica se presentan las medias \pm desviación estándar y solo el grupo O se observó una disminución importante de edema ($p<0.05$) vs el grupo control.

Hemocultivos. Para definir el perfil microbiológico del proceso infeccioso ocasionado por la CLP, se realizaron hemocultivos 24h después del proceso quirúrgico. Estos fueron negativos para el grupo S, mientras que en los grupos C y O fueron positivos a las 9 y 8h respectivamente (Tabla 2), con un predominio de bacterias gram-negativas (Tabla 3). En contraste sólo el 50% de los cultivos de los animales del grupo IP fueron positivos 96h después de la cirugía.

| Grupos | % de Positividad | Tiempo de positividad (hrs) |
|--------|------------------|-----------------------------|
| S | 0 | ND |
| C | 100 | 9.11 \pm 2 |
| Ip | 50 | 96 \pm 0 |
| O | 100 | 8.49 \pm 2.30 |

Tabla 2. Tiempo de positividad de hemocultivos de ratones con CLP. 200 μ l de sangre fueron sembrados en Bac Tec Peds Plus/F culture flasks (Becton Dickinson) y se incubaron durante 7 días. La positividad fue detectada por el sistema automatizado Bactec system (Becton Dickinson). El número de animales utilizados por grupo fue n=8.

| Bacterias gram-negativas | |
|---------------------------------|---------------------------------|
| <i>Escherichia coli</i> | <i>Pseudomona aeruginosa</i> |
| <i>Pseudomona sp.</i> | <i>Enterococcus faecium</i> |
| <i>Escherichia cloacae</i> | <i>Citrobacter amalonaticus</i> |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | |
| Bacteria gram-positiva | |
| <i>Streptococcus viridans</i> | |

Tabla 3. Análisis microbiano de animales con CLP. Hemocultivos de sangres de ratones sépticos, tomadas por punción cardiaca. La n fue de 10 animales.

Anticuerpos anti-LPS. Debido al papel que juegan los anticuerpos para depurar el LPS sérico, se exploró su presencia como resultado del pre-tratamiento repetido con la endotoxina. En este contexto solo la IgM anti-LPS se detectó en el grupo S, mientras que se detectaron títulos bajos del resto de los isotipos de anticuerpos (Figura 11); en tanto que los animales C presentaron niveles de IgG2b anti-LPS significativamente elevados ($p < 0.05$) vs S, y el resto de los isotipos mostraron concentraciones parecidas a las de S. Por su parte, en animales IP se detectaron los títulos significativamente mayores de isotipos IgG anti-LPS vs el resto de los grupos ($p < 0.05$). Por último, la IgM anti-LPS fue predominante elevada en el grupo O vs el resto de los grupos ($p < 0.05$).

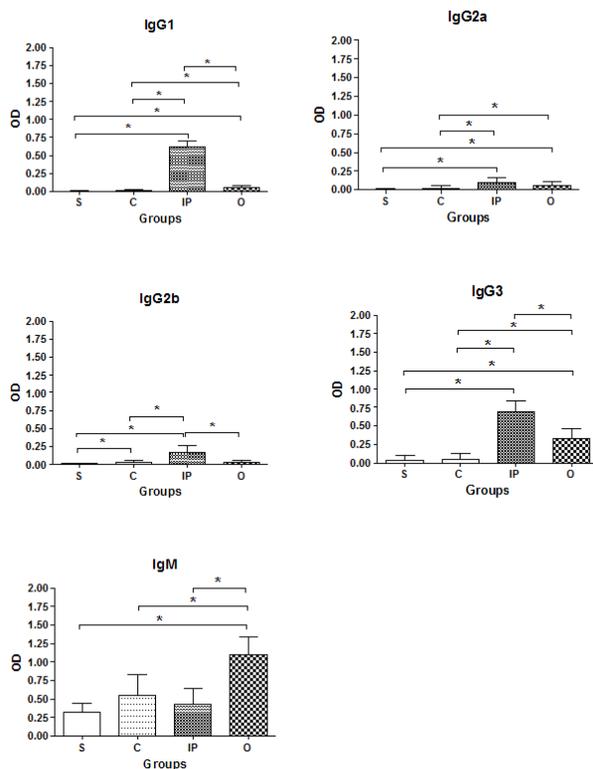


Figura 11. Producción de anticuerpos anti-LPS. Los isotipos de anticuerpos anti-LPS evaluados 24h después del procedimiento quirúrgico. Se utilizó una n=9 animales por grupo y en la gráfica se reportan las medias \pm SD. Las diferencias estadísticamente significativas se consideraron cuando la $*p < 0.05$.

Tratamiento profiláctico con fragmentos F(ab)'2 anti-TNF

Supervivencia. Debido a que en los animales protegidos con LPS se observaron cambios en tiempo de expresión de TNF, se exploró el efecto profiláctico de anti-TNF en el modelo de CLP. En este contexto, 120h después del procedimiento quirúrgico, la supervivencia en el grupo S fue del 100% (Figura 12), mientras que en el grupo control fue solo del 29%. Los tratamientos con anti-TNF en dosis de 0.01, 0.1 y 10 mg/kg aumentaron la supervivencia a 37, 57 y 53% respectivamente (ns) y solamente el tratamiento con 1 mg/kg aumentó significativamente la supervivencia hasta el 69% ($p < 0.05$) vs C.

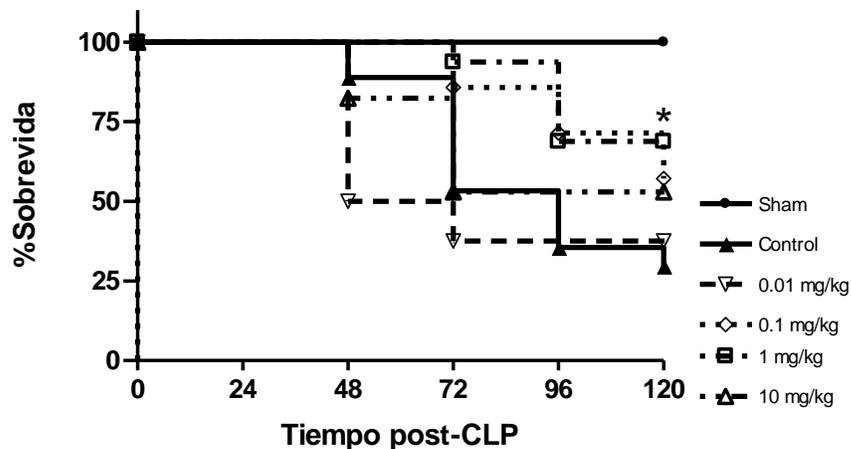


Figura 12. Administración profiláctica de anti-TNF. La gráfica presenta la supervivencia inducida por tratamientos con solución salina (sham y C), con 0.01, 0.1, 1 o 10 mg/kg de fragmentos F(ab')₂ anti-TNF fueron administrados 2h antes y cada 24h después de los procesos quirúrgicos, hasta completar un total de 5 dosis. La figura es representativa de dos experimentos independientes. (número de animales: Sham=15, control=18, 0.01=8, 0.1=8, 1 mg/kg=16, 10mg/kg=17). Las sobrevivencias fueron comparadas con una prueba de Log Rank Mantel-Haenzel,* p<0.05 vs control.

Citocinas en suero. Para explorar mecanismos relacionados con resistencia o susceptibilidad, se identificó el perfil inflamatorio en los grupos seleccionados S, C, tratados con 1 mg/kg (resistentes a la CLP) y 10 mg/kg de anti-TNF (susceptibles a la CLP). En esta etapa del estudio, la detección de TNF en los diferentes grupos experimentales nuevamente fue inconsistente. Por otro lado, en el grupo S 3h después de la cirugía (figura 13a), se pudo observar un predominio de IL-1 β e IL-10; éste perfil se modificó a las 24h por un predominio pro-inflamatorio caracterizado por la presencia IL-1 β e IFN- γ y 48h después ambas citocinas se redujeron. En el grupo C el perfil se caracterizó por un predominio pro-inflamatorio (IL-1 e IL-6) a las 3h (Figura 13b), manteniéndose hasta las 24h y a las 48h cambió por un predominio de IL-10; en este grupo se detectó IFN- γ solo 3h

después de la CLP. Mientras que en el grupo tratado con 1mg/kg de anti-TNF, se observó una coexistencia de IL-1, IL-10 e IFN- γ y niveles considerablemente elevados de IL-6 durante las primeras 24h de estudio (Figura 13c). 48h después aumentó IL-10 y disminuyó IL-1, sin embargo los niveles de IL-6 e IFN- γ no se modificaron. Por último, los animales tratados con dosis 10 veces mayores del mismo anticuerpo, mostraron un predominio de IL-10 desde las 3h y hasta las 48h (Figura 13d).

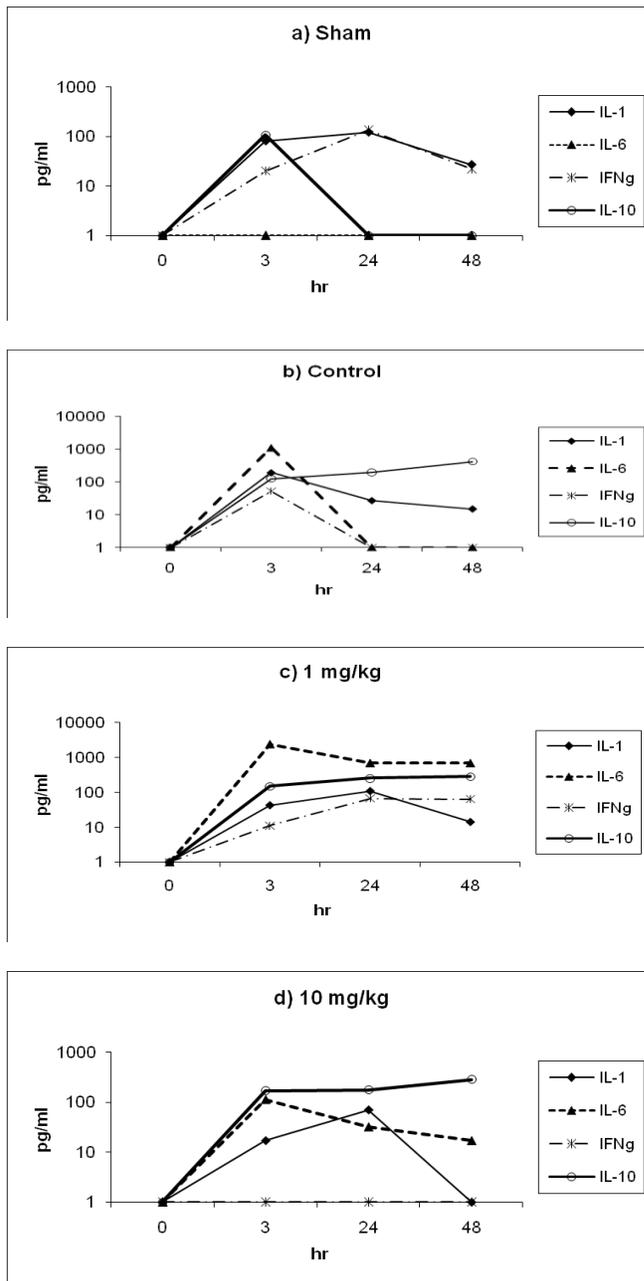


Figure 13. Citocinas séricas en animales con CLP tratados con anti-TNF profiláctico. Las muestras de suero fueron obtenidas de sangre tomada por punción cardiaca en diferentes lotes de animales a las 0, 3, 24 y 48h posteriores al procedimiento quirúrgico. Las citocinas fueron medidas por ELISA en animales a) Sham; b) Control; c) tratados con 1 mg/kg o d) 10 mg/kg. La n utilizada fue de entre 5-6 animales por grupo y por tiempo.

Papel terapéutico de fragmentos F(ab)'2 anti-TNF. Una vez que la dosis de 1 mg/kg de anti-TNF fue identificada como protectora, se decidió evaluar su efecto terapéutico (Figura 14). Este esquema mostró que el tratamiento iniciado a las -2h, -30min (78 y 93%) y 30 min (91%) protegieron significativamente ($p < 0.001$), lo que no sucedió cuando el tratamiento inició 2h o 24h posteriores a la CLP (61 y 57% de sobrevida respectivamente). Por último, la administración de fragmentos F(ab)'2 no relacionados (Alacramyn) a ratones con sepsis no modificaron la sobrevida.

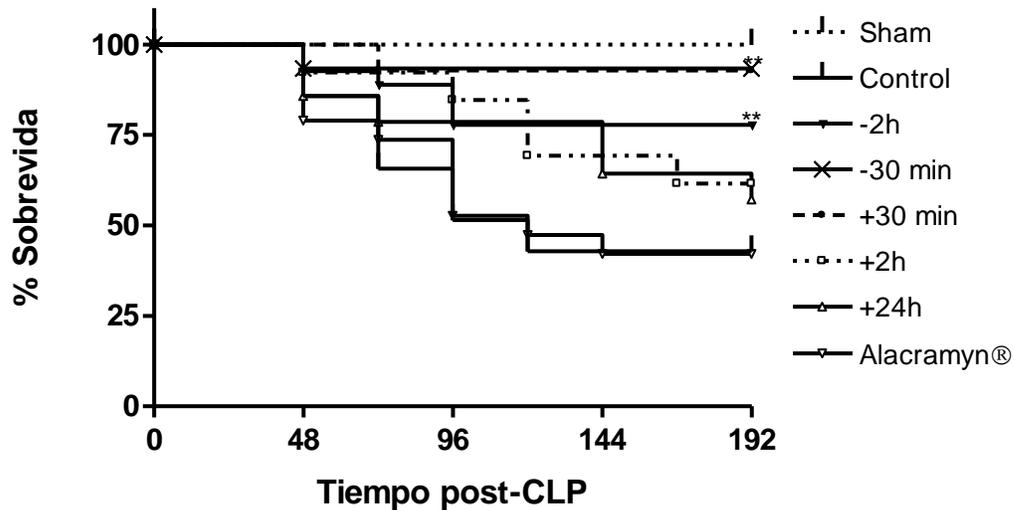


Figura 14. Administración terapéutica de anti-TNF. Los grupos experimentales fueron tratados con 1 mg/kg del anticuerpo, los tratamientos iniciaron -2h, -30 min, 30, 2 o 24h después de inducir sepsis, y cada 24h hasta completar las 5 dosis totales. Por otro lado se administraron fragmentos F(ab') anti-veneno de alacrán (Alacramyn®) en dosis de 1 mg/kg, bajo el mismo esquema de tratamiento utilizado con el anti-TNF. Los animales sham y control recibieron solución salina con el mismo esquema. La figura es representativa de dos experimentos independientes, la n utilizada fue para sham=20, control=35, -2 hr=26, -30 min=15, +30 min=14, +2 hr= 13, +24 hr=14y Alacramyn®=19. Las supervivencias encontradas entre grupos fueron comparadas con una prueba de Mantel-Haenzel Log Rank, encontrándose diferencias significativas de ** $p < 0.01$ vs control.

Tratamiento profiláctico con fragmentos F(ab')₂ anti-IFN- γ

Supervivencia. Otra citocina modificada con el tratamiento profiláctico de LPS fue el IFN- γ , por lo tanto se exploró su papel en el modelo de CLP administrando diferentes dosis de anti-IFN- γ de forma profiláctica. En este experimento, también sobrevivieron todos los animales del grupo sham (Figura 15), en tanto que en el grupo control la sobrevida fue del 33%. La administración profiláctica con 0.1 o 1 mg/kg de fragmentos F(ab')₂ anti-IFN- γ solo aumentó la sobrevida al 53% vs control (NS). Sin embargo, el tratamiento profiláctico con la dosis más baja (0.01 mg/kg) se asoció con un aumento en la sobrevida hasta el 78% vs control (p<0.05).

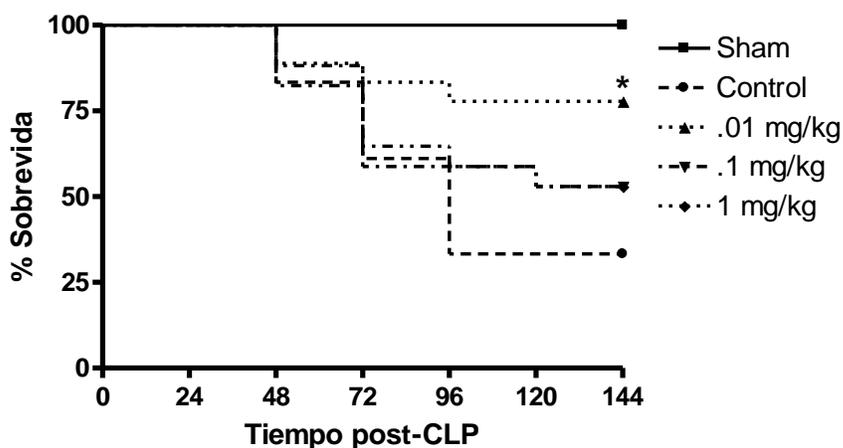


Figura 15. Administración profiláctica de anti-IFN- γ . Los animales fueron tratados con solución salina (sham y control), y con 0.01, 0.1, o 1 mg/kg de F(ab')₂ anti-IFN- γ , el tratamiento fue iniciado 2h antes y cada 24h posteriores al procedimiento quirúrgico, hasta completar 5 dosis totales. La figura es representativa de dos experimentos independientes. La n utilizada fue en Sham=10, control=17, 0.01 mg/kg=17, 0.1 mg/kg=15, 1 mg/kg=17, 10mg/kg=16. La comparación entre supervivencias se realizó con una prueba de Long Rank de Mantel-Haenzel. La * p<0.05 fue vs control.

Citocinas en suero: Para explorar mecanismos relacionados con resistencia o susceptibilidad inducidas por el anti-IFN- γ , se identificó el perfil inflamatorio en los grupos S, C, tratados con 0.01 y 1 mg/kg de anti-IFN- γ ; en el primero se observó un predominio de IL-1 β y niveles más bajos de IL-10 e IFN- γ 3h después de la cirugía (Fig 16a). A partir de las 24h se observó una coexistencia de IFN- γ , IL-1 e IL-1 β . En el grupo C a las 3h, se observó un predominio inflamatorio dependiente de IL-6 e IL-1 β ; 24h después aumentaron los niveles de IL-10 y disminuyeron los de IL-6 e IL-1 β ; finalmente se observó una disminución de IL-10 a las 48h después de la CLP. El tratamiento con anti-IFN- γ en dosis de 0.01 mg/kg indujo una alta producción de IL-6 (16c) 3h después de la CLP, mientras que IL-1 β e IL-10 se mantuvieron en concentraciones similares. 24h después la IL-6 disminuyó mientras que los niveles de IL-1 β e IL-10 permanecieron constantes, para las 48h los niveles de IL-6 continuaron elevados, pero disminuyeron los de IL-1 β , y los de IL-10 se mantuvieron constantes. Cuando anti-IFN- γ fue administrado en concentraciones de 0.1 mg/kg, se indujo la producción más elevada de IL-6 3h después de la CLP, asociada con bajos niveles de IL-1 β e IL-10 (Fig 16d). 24h posteriores a la cirugía, con excepción de IL-1 β , ninguna otra citocina fue detectada. Sin embargo a las 48h solo los niveles de IL-6 e IL-10 aumentaron. Tal como sucedió en otros experimentos donde se evaluó TNF, esta citocina se detectó de manera inconsistente en los diferentes grupos.

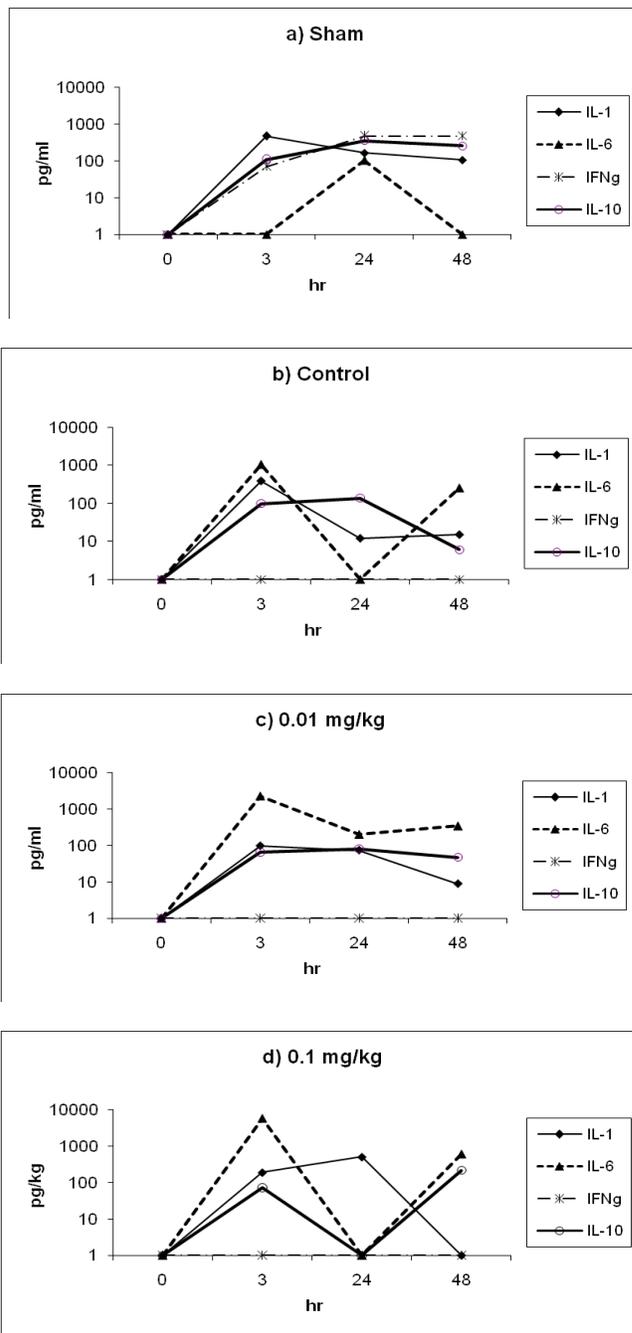


Figure 16. Citocinas séricas en animales con sepsis inducida por CLP tratados con anti-IFN- γ . Los sueros fueron obtenidos a partir de sangre tomada por punción cardiaca en diferentes lotes de animales a las 0, 3, 24 y 48h posteriores al procedimiento quirúrgico. Las citocinas fueron medidas por ELISA en animales a) Sham; b) Control; c) 0.01 mg/kg de anti-IFN- γ o d) 0.1 mg/kg. La n utilizada fue de entre 5-6 animales por grupo y por tiempo.

Papel terapéutico de fragmentos F(ab')₂ anti-IFN- γ . Una vez que la dosis de 0.01 mg/kg de anti-IFN- γ fue identificada como protectora se decidió evaluar su efecto terapéutico. Como referencia, el 100% de ratones sham y el 54% animales control sobrevivieron a sus respectivos procedimientos quirúrgicos (Figura 17). Por otro lado, los fragmentos F(ab')₂ anti-IFN- γ en dosis de 0.01 mg/kg administrados 2h antes o 24h después de inducir la sepsis aumentaron la sobrevida al 88% (p<0.05) y 94% (p<0.01) vs C respectivamente. Mientras que el tratamiento iniciado 30min antes, 30min o 2h después de la CLP no disminuyeron la mortalidad vs C.

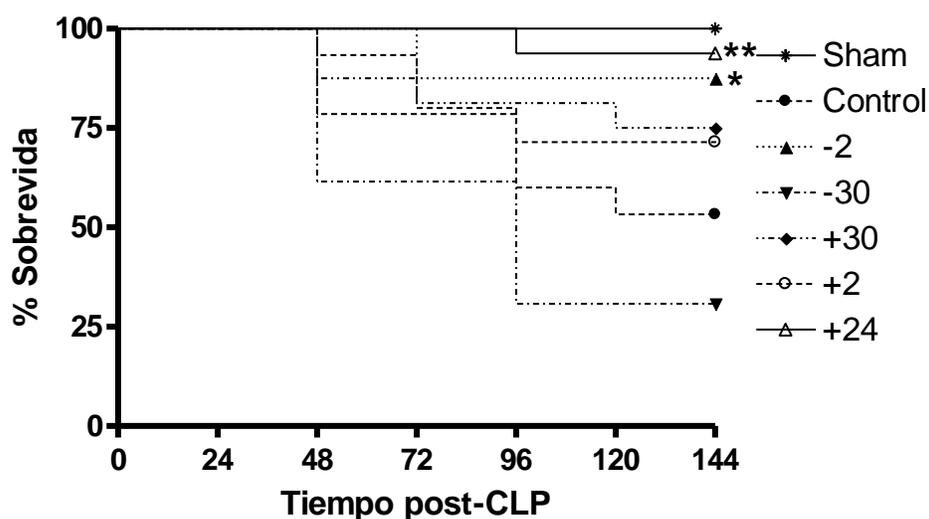


Figura 17. Administración terapéutica de anti-IFN- γ . Todos los animales fueron tratados con dosis de 0.01 mg/kg, iniciando a las -2h, -30min, 30min, 2h y 24h del procedimiento quirúrgico y cada 24h hasta completar 5 dosis totales. Los grupos sham y control recibieron solución salina con el mismo esquema. La figura es representativa de dos experimentos independientes y la n para cada grupo fue de sham=10, control=15, -2h= 8, -30min=8, +30min= 16, +2h= 15, +24h= 16). Las comparaciones de estadísticas de supervivencia fueron realizadas con una prueba de Log Rank de Mantel-Haenzel , la ** p<0.01 fue vs control.

Discusión

En la actualidad es indiscutible el papel que juega el proceso inflamatorio para el establecimiento o control de infecciones bacterianas, sin embargo en sepsis éste representa un detonante de mecanismos deletéreos que favorecen la progresión de la enfermedad. En modelos animales como los de endotoxemia o sepsis inducida por bacterias vivas, la desensibilización con dosis subletales de antígenos bacterianos induce cambios en el perfil de citocinas que protegen contra dosis letales posteriores [Mengozi M y Ghezzi P, 1993]. En estos modelos la utilización de anticuerpos anti-citocinas o citocinas recombinantes, también pueden modificar el curso de la enfermedad atenuando o potenciándola [Bengtsson A y col, 1998. van der Poll T, 2001. Annane D y col, 2005]. En nuestro estudio, se documentó por primera vez que la administración de LPS por la vía O y no IP, protegió contra la sepsis inducida por CLP. Comúnmente, la resistencia contra sepsis se asocia con reducción de la respuesta pro-inflamatoria y aumento de la anti-inflamatoria, tal como lo reportaron Varma y col [2005] quienes observaron una disminución de IL-1, IFN- γ e IL-12 y aumento de IL-10 en circulación. En otro estudio, utilizando cultivos de monocitos humanos, desensibilizados con LPS *“in vitro”*, se produjeron concentraciones elevadas de IL-10 y TGF- β [Radow F y col, 1995]. En nuestro estudio, a nivel sérico pudimos observar sólo 4h después de la cirugía, que el tratamiento con LPS vía O indujo un predominio anti-inflamatorio; hallazgo sustentado a nivel tisular por la baja

proporción de células de Kupffer en hígado ($p < 0.05$) vs los grupos C e IP, y disminución ($p < 0.05$) del edema pulmonar (O vs C).

Por su parte, la inconsistencia en la detección de TNF circulante no fue un problema metodológico ya que otros trabajos han reportado que no se eleva en el modelo de CLP [Evans GF y col, 1989. Villa P y col, 1995. Ebong S y col, 1999], pensamos que algunos de los mecanismos responsables para este resultado son la labilidad de la citocina, su vida media, su consumo durante el proceso séptico, y/o a la presencia de receptores solubles en circulación (TNFRI/II) [Cavaillon JM y col, 2003] que podrían interferir para su detección con el método de ELISA. No obstante, se pudo observar una reducción en su tiempo de expresión en hígado o retraso en el inicio de su expresión en pulmón vs los grupos C e IP. Estas diferencias en los distintos órganos blanco, pudieron deberse a mecanismos de compartimentalización inmunológica [Fitting C y col, 2004].

Aunque desconocemos con precisión qué mecanismos se activaron durante la administración de LPS vía O, pensamos que por un lado se pudieron estimular subpoblaciones celulares específicas como dendríticas productoras de IL-10 presentes en placas de Peyer y en bazo [Iwasaki A y col, 1999], cuya influencia podría resultar en la generación de células T naive hacia fenotipos Th2 productoras de IL-10, y a su vez reducir el IFN- γ sérico [Schröder M y col, 2003]; en tanto que el LPS por la vía IP, pudo estimular células productoras de IFN- γ [Iwasaki A y col, 1999]. Otra posibilidad, es que células Th3 o Treg pudieran ser estimuladas en intestino y de esta manera atenuar la respuesta inflamatoria

generada por el proceso séptico [Weiner HL, 2001. Mucida D y col, 2005], incluso es posible que haya varios mecanismos que se combinen para generar protección.

Otro mecanismo protector inducido por el LPS O, fueron los altos títulos de anticuerpos IgM anti-LPS, que podrían activar la cascada del complemento y favorecer la lisis bacteriana, además de facilitar la depuración del LPS circulante [Boes M y col, 1998]. Se ha reportado que los animales deficientes en la producción de IgM, muestran mayor susceptibilidad cuando son retados con LPS, por esta razón se sugiere como una estrategia alternativa, la administración de IgM para el manejo de la sepsis [Jackson SK y col, 1993. Haque KN y col, 1988. Karatzas S y col, 2002] y como un tratamiento profiláctico para pacientes con alto riesgo de adquirir infecciones nosocomiales de tipo gram-negativo [Neilson AR y col, 2005. Norrby-Teglund A y col, 2006].

De hecho, es posible que la tolerancia O al LPS sea un mecanismo fisiológico natural, ya que en las condiciones estándar de bioterio se permite la ingesta oral y continua de bacterias y LPS presentes en las heces de los animales. Esto explicaría parcialmente la resistencia basal que presentan los ratones con sepsis puncionados con una aguja calibre 21G (50%) y en la cual podrían estar involucrados anticuerpos IgM anti-LPS, ya que incluso animales de los grupos S y C presentan IgM elevada vs el resto de las inmunoglobulinas, lo que sugiere que estos anticuerpos incluso podrían producirse de manera basal o que podrían ser polireactivos, como los producidos por linfocitos B1. Aunque el tratamiento O con LPS parece ser potencialmente atractivo para el manejo de pacientes con sepsis, difícilmente se podría utilizar en clínica ya que este tipo de pacientes ingresa al hospital en etapas tardías de la enfermedad, por lo tanto este tratamiento tendría

que ser restringido a pacientes programados a cirugías con riesgo de desarrollar infecciones.

Durante la segunda fase de este estudio, se probaron diferentes dosis profilácticas de anti-TNF o -IFN- γ ; en el primer caso se observó que la administración de dosis altas de anti-TNF no mejoró la sobrevida de los animales sépticos, sin embargo el tratamiento con dosis 10 veces menores del anticuerpo protegieron significativamente ($p < 0.05$). Esto sustenta reportes previos en los que tanto animales retados con CLP, como ensayos clínicos con pacientes sépticos [Gallagher J y col, 2001. Reinhart K y col, 2001], la eliminación de TNF circulante inhibe mecanismos microbicidas, resultando en el aumento de la susceptibilidad hacia infecciones. Pero por otro lado, el resultado contrastó con lo observado en animales con endotoxemia, en los cuales la inhibición de TNF circulante protege; sin embargo es necesario señalar que la endotoxemia no es una infección, por lo tanto en este modelo esta estrategia es benéfica al inhibir mecanismos de daño tisular, sin importar que sean los mismos mecanismos microbicidas [Beutler B y col, 1985], además este efecto es complementado por el aumento de la producción de IL-10, que inhibe la sobreproducción de NO y especies reactivas de oxígeno, aumento de la permeabilidad vascular, coagulación intravascular diseminada, etc [Ghosh S y col, 1993].

Interesantemente en nuestro estudio, el tratamiento con dosis bajas de anticuerpos anti-TNF indujo la coexistencia de IL-1 e IL-10 durante las primeras 24h de estudio, mientras que en el grupo C se observó un predominio pro-inflamatorio temprano (3h) y en los animales tratados con dosis 10 veces más anti-

citocina, mostraron un predominio anti-inflamatorio desde las 3h. Contrario a las posturas que discuten el papel de las respuestas pro- o anti-inflamatorias como deletéreas en sepsis y proponen a sus respuestas antagónicas como protectoras [Lamy M y col, 1995], nuestros resultados sugieren que la polarización hacia respuestas pro- o anti-inflamatorias de manera temprana son deletéreas, mientras que la coexistencia de ambas podría ser benéfica, ya que en principio se atenuaría el desarrollo de SIRS o CARS.

El aumento de IFN- γ observado en el grupo protegido también pudo ser benéfico, y aunque este se ha asociado con letalidad de ratas con CLP [Yin K y col, 2005], otros estudios lo sugieren como protector al activar la función de monocitos de pacientes sépticos [Döcke WD y col, 1997].

Otro resultado por demás interesante fue la demostración de que dosis de 1 mg/kg de anticuerpos anti-TNF tuvo efectos terapéuticos solo en etapas tempranas del proceso séptico, esto sustenta la idea de que el TNF debe de ser regulado en etapas iniciales de la enfermedad buscando atenuar mecanismos de daño y no en etapas tardías, lo que explica parcialmente porqué en ensayos clínicos controlados los resultados son contradictorios. En estos se subestima el balance inflamatorio en el momento de iniciar el tratamiento y se trata con dosis de anticuerpos que buscan eliminar la citocina de circulación; en otras palabras si los pacientes se encuentran establecidos en etapas tardías del SIRS o en CARS, podría reflejar un efecto nulo o incluso contribuir con el desarrollo de inmunoparálisis. En este sentido, se ha observado que la administración de dosis altas y crónicas de anticuerpos monoclonales quiméricos anti-TNF a pacientes con

artritis reumatoide, aumentaron la susceptibilidad a infecciones [Armbrust W y col, 2004. Bowie VL y col, 2004. Hamilton CD y col, 2004. Moreland LW y col, 2004. Wolfe F y col, 2004], por lo que es necesario considerar las dosis, el “timing” de la administración y cronicidad de las terapias con anti-citocinas.

Por su parte, se ha reportado que el IFN- γ tiene la capacidad de estimular la producción de óxido nítrico, producción de radicales libres y otros mediadores pro-inflamatorios por macrófagos y neutrófilos [Töttemeyer S y col, 2006], que contribuyen con el daño tisular observado en sepsis; por lo anterior, animales knock-out para la producción de IFN- γ muestran disminuida su capacidad microbiciada comparado con animales silvestres [Moore TA y col, 2002]. Paradójicamente en estudios clínicos se observa que la hiporeactividad de los leucocitos sanguíneos periféricos de pacientes con sepsis es revertida al estimularlos en presencia de rIFN- γ [Döcke W, 1997], estos resultados sustentan el papel inmunoregulator de IFN- γ . Lo anterior fue constatado al probar que el tratamiento con fragmentos F(ab')₂ anti-IFN- γ iniciado 2h antes de la CLP, protegió significativamente solo cuando se administró en dosis muy bajas (0.01 mg/kg), y no al tratar con dosis 10 o 100 veces mayores. Este resultado reforzó nuestra hipótesis de que “en sepsis, los tratamientos con anti-citocinas no deben eliminarlas, sino regularlas”. Un estudio previo realizado por Laineé y col, reportaron que la administración de anticuerpos monoclonales anti-IFN- γ inmediatamente después de inducir choque con bacterias gram-negativas a primates, atenuó la disfunción orgánica y previno letalidad. Por otro lado, en ratas con sepsis inducida por CLP, Yin K y col (2005), obtuvieron resultados

concordantes con los nuestros, ya que la administración de anticuerpos monoclonales anti-IFN- γ atenuaron la mortalidad cuando se administraron inmediatamente o 24h después de la cirugía, ellos reportan como mecanismos asociados a una reducción de los niveles séricos y peritoneales de “high mobility group box-1” (HMGB1), mientras que las concentraciones de IL-1, IL-6 o TNF no se modificaron. En nuestro estudio, además se observó en el grupo control una respuesta temprana predominante de IL-1 β e IL-6 y un cambio hacia un predominio de IL-10, 24h después de la cirugía. En ratones tratados con 0.1 mg/kg de anti-IFN- γ , se observó un predominio pro-inflamatorio hasta las 24h. , que cambió hacia un predominio de IL-10 a las 48h. De manera interesante en el tratamiento con dosis bajas de anti-IFN- γ se generó la coexistencia de IL-1 e IL-10 a lo largo del estudio, resultado que coincidió con los observados en el tratamiento protector de anti-TNF. La coexistencia de citocinas pro- y anti-inflamatorias podría ser benéfica probablemente evitando la polarización temprana hacia SIRS o CARS y la activación de mecanismos deletéreos exacerbados.

Otra similitud en los tratamientos protectores con anti-TNF e -IFN- γ , fueron los altos niveles de IL-6, resultado que es concordante con el reporte de Yoshida K,y col [2001], quienes observaron que animales deficientes para la producción de IFN- γ (IFN- γ -/-), aumentaron la producción de IL-6 durante estados tardíos de la infección pulmonar con *Klebsiella pneumoniae*, y aunque estos autores interpretaron este resultado como una respuesta a la mala condición de los ratones en estados tardíos de la septicemia, nosotros pensamos que el aumento de IL-6 podría ser un mecanismo que busca compensar la falta de IFN- γ .

Esto podría ser factible en primer lugar porque IL-6 inicialmente intentaría amplificar el proceso inflamatorio, que disminuye al administrar las anti-citocinas; en segundo lugar, la IL-1 β en los grupos protegidos con anti-IFN- γ y -TNF podría contribuir con el aumento de los niveles de IL-6 [Hungness ES y col, 2002]. Por último, aunque desconocemos los mecanismos precisos que inducen el aumento de IL-6 en nuestros grupos protegidos, esta condición podría beneficiarlos ya que aunque la administración de esta citocina en forma recombinante es incapaz de inducir choque, sí ocasiona fiebre, neutrofilia, trombocitosis y producción de proteínas de fase aguda [Dinarello Ch, 1997]. Por el contrario, su ausencia se ha asociado con aumento de los niveles circulantes de TNF, IFN- γ , y factor estimulador del crecimiento de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF), mientras que su administración en forma recombinante a voluntarios sanos, potencia una respuesta plasmática anti-inflamatoria mediada por IL-10, IL-1ra, y cortisol; por lo que ha sido señalada como una citocina con propiedades anti-inflamatorias indirectas. Otras propiedades que podrían ser importantes durante la sepsis es que genera la producción de proteína C reactiva que facilita la opsonización de bacterias [Du Clos, Terry W, 2002], induce la síntesis de proteínas en intestino y pulmón, mecanismo contrario al catabolismo proteico observado durante el proceso séptico [Williams A y col, 1998], además juega un papel protector contra anomalías de la coagulación, asociadas a la inflamación durante la hemorragia pulmonar [Inoue K y col, 2004] y el desarrollo de la coagulación intravascular diseminada, responsable de hipoperfusión tisular, daño tisular y disfunción orgánica en sepsis.

Por otro lado la presencia de IL-10 pudo contribuir con el control de la producción de IL-1 β en animales protegidos, y de esta manera regular los mecanismos deletéreos que activa esta citocina; resultado contrario a lo observado en animales tratados con dosis mayores de anti-IFN- γ , lo que generó un aumento importante de IL-1 β .

Finalmente, la mayoría de pacientes sépticos que ingresan a los hospitales se encuentran en fases tardías de la enfermedad, por lo tanto, los tratamientos profilácticos presentan una reducida eficacia clínica. Nuestros resultados demostraron que bajas dosis de fregmentos F(ab')₂ anti-IFN- γ , podrían ser útiles en el tratamiento tardío de la sepsis (24h después de inducirlo), situación que beneficiaría a una gran mayoría de pacientes que ingresa a los hospitales con este diagnóstico en sus diferentes etapas. No obstante, es fundamental estudiar ampliamente el papel de anti-IFN- γ en distintos modelos de sepsis, para corroborar su utilidad en estas condiciones.

Conclusiones

- El LPS administrado en dosis subletales por la vía oral protegió en la sepsis polimicrobiana inducida por CLP.
- El pretratamiento con LPS vía oral modificó el perfil de citocinas pro-inflamatorias y favoreció la producción de IL-10, además de anticuerpos IgM anti-LPS.
- La disminución de la inflamación fue constatada por el bajo número de células de Kupffer en hígado y el porcentaje de edema en pulmón en animales tratados con LPS oral.
- Dosis profilácticas de 1 y no de 10 mg/kg de anti-TNF aumentaron significativamente la sobrevivencia de animales con sepsis inducida por CLP.
- La protección con 1 mg/kg de anti-TNF pudo extenderse terapéuticamente hasta etapas tempranas de la sepsis (30min).
- Dosis profilácticas de 0.01 mg/kg de anti-IFN- γ aumentó significativamente la sobrevivencia de animales con sepsis polimicrobiana.
- La protección con 0.01 mg/kg de anti-IFN- γ se extendió terapéuticamente solo cuando se inició tardíamente (24h) después de la CLP.
- La regulación de las respuestas pro- y anti-inflamatorias se asoció con protección en sepsis polimicrobiana, mientras que la polarización hacia alguna de las dos no protegió.

Bibliografia

1. Agnese DM, Calvano JE, Hahm SM, Coyle SM, Corbett SA, Calvano S, Lowry S. human Toll-like receptor 4 mutations but not CD14 polymorphisms are associated with an increased risk of gram-negative infections. *J infect Dis* 2002; 186: 1522-25.
2. Aird WC. The role of the endothelium in severe sepsis and multiple organ dysfunction syndrome. *Blood*. 2003; 10:3765-3777.
3. Annane D, Bellissant E, Cavallion JM. Septic Shock. *Lancet* 2005; 365: 63-78.
4. Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and costs of care. *Crit Care Med* 2001, 29: 1303-1310.
5. Armbrust W, Kamphuis SS, Wolfs TW, Fiselier TJ, Nikkels PG, Kuis W, Wulffraat NM. Tuberculosis in a nine-year-old girl treated with infliximab for systemic juvenile idiopathic arthritis. *Rheumatology* 2004; 43: 527-9.
6. Bean AG, Freiberg RA, Andrade S, Menon S, Zlotnik A. Interleukin 10 protects mice against staphylococcal enterotoxin B-induced lethal shock. *Infect Immun* 1993; 61: 4937-9.
7. Bengtsson A, Reld H, Shlang G, Högason K, Götze O, Mollnes T. Anti-TNF treatment of baboons with sepsis reduces TNF- α , IL-6 and IL-8, but not the degree of complement activation. *Scand J Immunol* 1998; 48: 509-514.
8. Beutler B, Milsark IW, Cerami AC. Passive immunization against cachectin/tumor necrosis factor protects mice from lethal effect of endotoxin. *Science* 1985; 229: 869-871. Classical article.

9. Blackwell TS and Cristman JW. Sepsis and cytokines: current status. *Br J Anaesth* 1996; 77: 110-117.
10. Bochud PY and Calandra T. Science, medicine, and the future: Pathogenesis of sepsis: new concepts and implications for future treatment. *BJM* 2003; 326: 262-266.
11. Boes M, Prodeus AP, Schmidt T, Carroll MC, Chen J. A critical role of natural immunoglobulin M in immediate defense against systemic bacterial infection. *J Exp Med* 1998; 188: 2381-6.
12. Bone R, Grodzin Ch, Balk R. Sepsis: A new hypothesis for pathogenesis of the disease process. *CHEST* 1997; 112: 235-243.
13. Bowie VL, Snella KA, Gopalachar AS, Bharadwaj P. *Listeria meningitis associated with infliximab.* *Ann Pharmacother* 2004; 38: 58-61.
14. Car BD, Eng VM, Schnyder B, Ozmen L, Huang S, Gallay P, Heumann D, Aguet M, Ryffel B. Interferon gamma receptor deficient mice are resistant to endotoxic shock. *J Exp Med.* 1994; 179:1437-44.
15. Carrigan SD, Scott G, Tabrizian M. Toward resolving the challenges of sepsis diagnosis. *Clinical Chem* 2004; 50: 1301-1314.
16. Cavillon JM, Adib-Conquy M, Fitting C, Adrie C, Payen D. Cytokine cascade in sepsis. *Scand J Infect Dis* 2003; 35: 535-44.
17. Chernoff AE, Granowitz EV, Shapiro L, Vannier E, Lonnemann G, Angel JB, Kennedy JS, Rabson AR, Wolff SM, Dinarello CA. A randomized, controlled trial of IL-10 in humans. Inhibition of inflammatory cytokine production and immune responses. *J Immunol* 1995; 154: 5492-9.

18. Coffey MJ, Phare SM and Peters-Golden M. Prolonged Exposure to Lipopolysaccharide Inhibits Macrophage 5-Lipoxygenase Metabolism Via Induction of Nitric Oxide Synthesis. *Journal of Immunology* 2000; 165: 3592-3598.
19. Cohen J. The immunopathogenesis of sepsis. *Nature* 2002; 420: 885-891.
20. Cross AS, Opal SM, Sadoff JC, Gemski P. Choice of bacteria in animal models of sepsis. *Infect Immun* 1993; 61: 2741-2747.
21. Cuschieri J, Billigren J, Maier RV. Endotoxin tolerance attenuates LPS-induced TLR4 mobilization to lipids rafts: a condition reversed by PKC activation. *J Leukoc Biol* 2006; 80: 1289-1297.
22. Damas P, Canivet JL, de Groote D, Vrindts Y, Albert A, Franchimont P, Lamy M. Sepsis and serum cytokine concentrations. *Crit Care Med.* 1997; 25: 405-12.
23. Dias MB, Almeida MC, Carnio EC, Branco LG. Role of nitric oxide in tolerance to lipopolysaccharide in mice. *J Appl Physiol.* 2005; 98: 1322-7.
24. Dinarello Ch. Proinflammatory and anti-inflammatory cytokines as mediators in the pathogenesis of septic shock. *CHEST* 1997; 112: 321S-329S.
25. Döcke WD, Randow F, Syrbe U, Krausch D, Asadullah K, Reinke P, Volk HD, Kox W. Monocyte deactivation in septic patients: restoration by IFN-gamma treatment. *Nat Med* 1997; 3: 678-81.

26. Dougnac A, Riquekme A, Calvo M, Andresen M, Magedzo A, Eugenin E, Marshall G, Gutierrez M. Study of cytokines kinetics in severe sepsis and its relationship with mortality and score of organic dysfunction. *Rev Med Chil* 2003; 131: 344.
27. Du Clos, Terry W. The Role of C-reactive Protein in the Resolution of Bacterial Infection. *Infec Dis Clin Prac* 2002; 11: 229-233.
28. Ebong S, Call D, Nemzek J, Bolgos G, Newcomb D, Remick D. Immunopathologic alterations in murine models of sepsis of increasing severity. *Infect Immun*. 1999; 67: 6603-10.
29. Echtenacher B, Weigl K, Lehn N, Mannel D. Tumor necrosis factor-dependent adhesion as a major protective mechanism early in septic peritonitis in mice. *Infec Immun* 2001; 69: 3550-3555.
30. Evans GF, Snyder YM, Butler LD, Zuckerman SH. Differential expression of interleukin-1 and tumor necrosis factor in murine septic shock models. *Circ Shock* 1989; 29: 279-90.
31. Favorite GO, Morgan HR. Effects produced by intravenous injection in man of a toxic antigenic material derived from *Eberthella typhosa*: clinical, hematological, chemical and serological studies. *J Clin Invest*, 1942; 21: 589-599.
32. Ferrara JL. Cytokines and the regulation of tolerance. *J Clin Invest*. 2000; 105: 1043-1044
33. Feuerstein, G. y Ravinovici, R. Importance of Interleukin-8 and Chemokines in Organ Injury and Shock. *Crit Care Med* 1994; 22: 550-551.

34. Fink MP, Payen D. The role of nitric oxide in sepsis and ARDS: Synopses of a roundtable held in Brussels on 18-20 March 1995. *Intensive Care Medicine* 1996; 22: 158-165.
35. Fitting C, Dhawan S, Cavaillon JM. Compartmentalization of tolerance to endotoxin. *J Infect Dis* 2004; 189: 1295-303.
36. Gallagher J, Fisher C, Sherman B, Munger M, Meyers B, Ellison T, Fischkoff S, Barchuk WT, Teoh L, Velagapudi R. A multicenter, open-label, prospective, randomized, dose-ranging pharmacokinetic study of the anti-TNF-alpha antibody afelimomab in patients with sepsis syndrome. *Intensive Care Med* 2001; 27: 1169-78.
37. Gately MK, Renzetti LM, Magram J, Stern AS, Adorini L, Gubler U, Presky DH: The interleukin-12/interleukin-12-receptor system: role in normal and pathologic immune responses. *Annu Rev Immunol* 1998; 16:495–521.
38. Gérard C, Bruyns C, Marchant A, Abramowicz D, Vandenabeele P, Delvaux A, Fiers W, Goldman M, Velu T. Interleukin-10 Reduces the Release of Tumor Necrosis Factor and Prevents Lethality in Experimental Endotoxemia. *J Exp Med* 1993. 177:547-550.
39. Ghosh S, Latimer RD, Gray BM, Harwood RJ, Oduro A. Endotoxin-induced organ injury. *Crit Care Med* 1993; 21(2 Suppl):S19-24.
40. Gresiman SE, Woodward WE. Mechanisms of endotoxin tolerance 3. The refractory state during continuous intravenous infusions of endotoxin. *J Exp Med* 1965; 121 :911-33.
41. Hamilton CD. Infectious complications of treatment with biologic agents. *Curr Opin Rheumatol* 2004; 16: 393-8.

42. Hammond KJL et al. alpha/beta-T cell receptor (TCR)+CD4-CD8- (NKT) thymocytes prevent insulin-dependent diabetes mellitus in nonobese diabetic (NOD)/It mice by the influence of interleukin-4 and /or IL-10. *J Exp Med* 1998; 187: 1047-1056.
43. Haque KN, Zaidi MH, Bahakim H. IgM-enriched intravenous immunoglobulin therapy in neonatal sepsis. *Am J Dis Child.* 1988; 142: 1293-6.
44. Heinzl F, Rerko RM, Ling P, Hakimi J, Schoenhaut DS. Interleukin 12 is produced in vivo during endotoxaemia and stimulates synthesis of gamma interferon. *Infect Immunity* 1994; 62 : 4244-4249.
45. Heyderman RS, Klein NJ, Daramola OA, Levin M. Modulation of the endothelial procoagulant response to lipopolysaccharide and tumour necrosis factor-alpha in-vitro: the effects of dexamethasone, pentoxifylline, iloprost and a polyclonal anti-human IL-1 alpha antibody. *Inflamm Res.* 1995; 44: 275-80.
46. Heyman A. The treatment of neurosyphilis by continuous infusion of typhoid vaccine. *Vener Dis Inform.* 1945; 26: 51-57.
47. Howard M, Muchamuel T, Andrade S, Menon S. Interleukin 10 protects mice from lethal endotoxaemia. *J Exp Med* 1993; 177:1205-1208.
48. Hungness ES, Luo GJ, Pritts TA, Sun X, Robb BW, Hershko D, Hasselgren PO. Transcription factors C/EBP-beta and -delta regulate IL-6 production in IL-1beta-stimulated human enterocytes. *J Cell Physiol* 2002; 192: 64-70.
49. Inoue K, Takano H, Yanagisawa R, Sakurai M, Shimada A, Morita T, Sato M, Yoshino S, Yoshikawa T, Tohyama C. Protective role of interleukin-6 in

coagulatory and hemostatic disturbance induced by lipopolysaccharide in mice. *Thromb Haemost.* 2004; 91: 1194-201.

50. Ionin B, Hammamieh R, Shupp JW, Das R, Pontzer CH, Jett M. Staphylococcal endotoxin B causes differential expression of Rnd3 and RhoA in renal proximal tubule epithelial cells while inducing actin stress fiber assembly and apoptosis. *Microbial Pathogenesis.* 45: 303-309.
51. Iwasaki A, Kelsall BL. Freshly isolated Peyer's patch but not spleen dendritic cells produce interleukin 10 and induce the differentiation of T helper type 2 cells. *J Exp Med* 1999; 190: 229-40.
52. Jackson SK, Parton J, Barnes RA, Poynton CH, Fegan C. Effect of IgM-enriched intravenous immunoglobulin (Pentaglobin) on endotoxaemia and anti-endotoxin antibodies in bone marrow transplantation. *Eur J Clin Invest* 1993; 23: 540-5.
53. Karatzas S, Boutzouka E, Venetsanou K, Myrianthefs P, Fildisis G, Baltopoulos G. The effects of IgM-enriched immunoglobulin preparations in patients with severe sepsis: another point of view. *Crit Care.* 2002; 6: 543-4-
54. Kelly JL, Lyons A, Soberg CC, Mannick JA, Lederer JA. Anti-interleukin-10 antibody restores burn-induced defects in T-cell function. *Surgery* 1997; 122: 146-52.
55. Kruger D. Acute systemic disseminated intravascular coagulation. Managing complex medical condition. *JAAPA* 2006; 19: 28-32.
56. Kuhl SJ, Rosen H. Nitric oxide and septic shock. From bench to bedside. *West J med* 1998; 176-181.

57. Laineé P, Efron P, Tschoeke SK, Elies L, De Winter H, Lorré K, Moldawer LL. Delayed neutralization of interferon-gamma prevents lethality in primate Gram-negative bacteremic shock. *Crit Care Med* 2005; 33: 797-805.
58. Lamy M y Deby-Dupont. Is sepsis a mediator-inhibitor mismatch ?. *Int Care Med* 1995. 21:S250-S257.
59. LaRue KEA and McCall CE. A labile transcriptional repressor modulates endotoxin tolerance. *J Exp Med* 1994; 180: 2269-2275.
60. Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, Cohen J, Opal SM, Vincent JL, Ramsay G. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Intensive Care Med.* 2003; 29: 530-8.
61. Lush CW, Cepinskas G, Kvietys PR. LPS tolerance in human endothelial cells: reduced PMN adhesion, E-selectin expression, and NF-kappaB mobilization. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000; 278: H853-61.
62. Lyons A, Kelly JL, Rodrick ML, Mannick JA, Lederer JA. Major injury induces increased production of interleukin-10 by cells of the immune system with a negative impact on resistance to infection. *Ann Surg* 1997; 226: 450-8.
63. Macdonald J, Galley HF, Webster NR. Oxidative stress and gene expression in sepsis. *Br J Anaesth.* 2003 Feb;90(2):221-32.
64. Martich, GD, Danner RL, Ceska M, Suffredini AF. Detection of interleukin 8 and tumor necrosis factor in normal humans after Intravenous endotoxin: The effect of antiinflammatory agents. *J Exp Med* 1991; 173: 1021-1024.

65. Mengozzi M, Ghezzi P. Cytokine down-regulation in endotoxin tolerance. Eur Cytokine Net 1993. 4: 89-98.
66. Moore TA, Perry ML, Getsoian AG, Newstead MW, Standiford TJ. Divergent role of gamma interferon in a murine model of pulmonary versus systemic *Klebsiella pneumoniae* infection. Infect Immun. 2002; 70: 6310-8.
67. Moreira AL, Wang J, Samo EN, Kaplan G. Thalidomide protects mice against LPS-induced shock. Braz J Med Biol Res 1997; 30: 1199-1207.
68. Moreland LW. Drugs that block tumour necrosis factor: experience in patients with rheumatoid arthritis. Pharmacoeconomics 2004; 22 (2 Suppl 1): 39-53.
69. Moreno C, Merino J, Vázquez B, Ramírez N, Echeverría A, Pastor F, Sánchez-Ibarrola A. Anti-inflammatory cytokines induce lipopolysaccharide tolerance in human monocytes without modifying toll-like receptor 4 membrane expression. Scan J Immunol 2004; 59: 553-558.
70. Mucida D, Kutchukhidze N, Erazo A, Russo M, Lafaille J, Lafaille M. Oral tolerance in the absence of naturally occurring Tregs. JCI 2005; 115: 1923-1933.
71. Muthukuru M, Jotwani R, Cutler CW. Oral mucosal endotoxin tolerance induction in chronic periodontitis. Infect Immun 2005; 73: 687-94.
72. Neilson AR, Burchardi H, Schneider H. Cost-effectiveness of immunoglobulin M-enriched immunoglobulin (Pentaglobin) in the treatment of severe sepsis and septic shock. J Crit Care. 2005 Sep;20(3):239-49.

73. Nomura F, Akashi S, Sakao Y, Sato S, Kawai T, Matsumoto M, Nakanishi K, Kimoto M, Miyake K, Takeda K and Akira S. Cutting Edge: Endotoxin tolerance in mouse peritoneal macrophages correlates with down-regulation of surface toll-like receptor 4 expression. *J Immunol* 2000; 164: 3476-3479.
74. Norrby-Teglund A, Haque KN, Hammarström L. Intravenous polyclonal IgM-enriched immunoglobulin therapy in sepsis: a review of clinical efficacy in relation to microbiological aetiology and severity of sepsis. *J Intern Med* 2006; 260: 509-16.
75. Osuka K, Suzuki Y, Watanabe Y, Dogan A, Takayasu M, Shibuya M, Yoshida J. Vasodilator effects on canine basilar artery induced by intracisternal interleukin-1b. *J Cerebral Blood Flow & Metabolism* 1997; 17: 1337-1345.
76. Pajkrt D, van der Poll T, Levi M, Cutler DL, Afrime MB, van den Ende A, ten Cate JW, van Deventer SJ. Interleukin-10 inhibits activation of coagulation and fibrinolysis during human endotoxemia. *Blood* 1997; 89: 2701-5.
77. Parrillo JE, Parker MM, Natanson C, Suffredini AF, Danner RL, Cunnion RE, Ognibene FP. Septic shock: advances in the understanding of pathogenesis, cardiovascular dysfunction, and therapy. *Ann Intern Med* 1990; 113: 227-242.
78. Pinsky MR, Vincent JL, Deviere J, Alegre M, Kahn RJ, Dupont E. Serum cytokine levels in human septic shock. Relation to multiple-system organ failure and mortality. *Chest* 1993; 103: 565- 575.
79. Pollak M, Huang AI, Prescott RK, Youn LS, Hunder KW, Cruess DF. Enhanced survival in *Pseudomonas aeruginosa* septicemia associated with high levels of circulating antibody to *Escherichia coli* endotoxin core. *J Clin Invest* 1983. 72: 1874-81.

80. Ramani M, Ollivier V, Khechai F, Vu T, Ternisien C, Bridey F, de Prost D. Interleukin-10 inhibits endotoxin-induced tissue factor mRNA production by human monocytes. *FEBS Lett* 1993; 334: 114-6.
81. Randow F, Syrbe U, Meisel Ch, Krausch D, Zuckerman H, Platzer C, Volk H. Mechanism of endotoxin desensitization: Involvement of Interleukin 10 and Transforming Growth Factor β . *J Exp Med* 181: 1887-1892.
82. Reinhart K, Karzai W. Anti-tumor necrosis factor therapy in sepsis: update on clinical trials and lessons learned. *Crit Care Med* 2001; 29 (7 Suppl): S121-5.
83. Remick DG. Biological perspectives. Pathophysiology of sepsis. *AJP* 2001; 170: 1435-1444.
84. Riedemann NC, Guo RF, Hollmann TJ, Gao H, Neff TA, Reuben JS, Speyer CL, Sarma JV, Wetsel RA, Zetoune FS, Ward PA. Regulatory role of C5a in LPS-induced IL-6 production by neutrophils during sepsis. *FASEB J* 2004; 18: 370-2.
85. Rittirsch D, Flierl MA, Ward PA. Harmful molecular mechanisms in sepsis. *Nature* 2008. 8: 776-787.
86. Rogy MA, Auffenberg T, Espat NJ, Philip R, Remick D, Wollenberg GK, Copeland EM 3rd, Moldawer LL. Human tumor necrosis factor receptor (p55) and interleukin 10 gene transfer in the mouse reduces mortality to lethal endotoxemia and also attenuates local inflammatory responses. *J Exp Med* 1995; 181: 2289-93.

87. Rojas-Espinoza O, Arce P. Fagocitosis, mecanismos y consecuencias. Tercera parte. *Bioquímica* 2004; 29: 55-67.
88. Schröder M, Meisel Ch, Buhl K, Profanter N, Sievert N, Volk H. Different modes of IL-10 and TGF- β to inhibit cytokine-dependent IFN- γ production: Consequences for reversal of lipopolysaccharide desensitization. *J Immunol* 2003; 170: 5260-7.
89. Sly LM, Rauh MJ, Kalesnikoff J, Song CH, Krystal G. LPS-induced upregulation of SHIP is essential for endotoxin tolerance. *Immunity*. 2004; 21: 227-39.
90. Sohn EJ, Paape MJ, Connor EE, Bannerman DD, Fetterer RH, Peters RR. Bacterial lipopolysaccharide stimulates bovine neutrophil production of TNF-alpha, IL-1beta, IL-12 and IFN-gamma. *Vet Res* 2007; 38:809-18.
91. St Clair EW, Turka LA, Saxon A, Matthews JB, Sayegh MH, Eisenbath GS, Bluestone J. New reagents on horizon for immune tolerance. *Ann Rev Med* 2007; 58: 329-346.
92. Standiford T J, Strieter RM, Lukacs NW, Kunkel S. Neutralization of IL-10 Increases lethality in endotoxemia. Cooperative effects of macrophage inflammatory protein-2 and tumor necrosis factor. *J Immunol* 1995; 155: 2222-2229.
93. Steinhauser M, Hogaboam C, Kunkel S, Lukacs N, Strieter R and Standiford T. IL-10 is a major mediator of sepsis-induced impairment in lung antibacterial host defense. *J Immunol* 1999; 162: 392-399.
94. ten Cate H. The biphasic waveform in plasma: identifying the sepsis-coagulation crossroad?. *J Thromb Haemost*. 2004; 2: 1533-4.

95. Tetta C, Fonsato V, Ronco C, Camussi G. Recent insights into the pathogenesis of severe sepsis. Recent insights into the pathogenesis of severe sepsis. Crit Care Resusc. 2005; 7: 32-9.
96. Tjardes T and Neugebauer E. Sepsis research in the next millennium: Concentrate on the software rather than the hardware. Shock 2002; 17: 1-8.
97. Toh CH, Dennis M. Disseminated intravascular coagulation: old disease, new hope. BMJ 2003; 327: 974-7.
98. Töttemeyer S, Sheppard M, Lloyd A, Roper D, Dowson Ch, Underhill D, Murray P, Maskell D, Bryanti C. IFN- γ enhances production of nitric oxide from macrophages via a mechanism that depends on nucleotide oligomerization domain-2. J Immunol 2006; 176: 4804-4810.
99. Tracey KJ, Cerami A. Tumor necrosis factor: an update review of its biology. Crit Care Med 1993: S415-422.
100. Tracey KJ, Beutler B, Lowry SF, Merryweather J, Wolpe S, Milsark IW, Hariri RJ, Fahey TJ 3rd, Zentella A, Albert JD. Shock and tissue injury induced by recombinant human cachectin. Science 1986; 234: 470-4.
101. van der Poll T. Immunotherapy of sepsis. Lancet Infect Dis 2001; 1: 165-74
102. van der Poll, T. Endogenous IL-10 protects mice from death during septic peritonitis. J Immunol 1995; 155: 5397-5401.
103. Varma T, Lin Ch, Toliver-Kinsky T, Sherwood E. Endotoxin-Induced Gamma Interferon Production: Contributing Cell Types and Key Regulatory Factors. Clin Diag Lab Immunol. 2002; 9: 530-543.

104. Varma TK, Durham M, Murphey ED, Cui W, Huang Z, Lin CY, Toliver-Kinsky T, Sherwood ER. Endotoxin priming improves clearance of *Pseudomonas aeruginosa* in wild-type and interleukin-10 knockout mice. *Infect Immun.* 2005; 73: 7340-7.
105. Verohef J, Mattsson E. The role of cytokines in Gram-positive bacterial shock. *Trends in Microbiology* 1995; 3:136-140.
106. Villa P, Sartor G, Angelini M, Sironi M, Conni M, Gnocchi P, Isetta AM, Grau G, Buurman W, van Tits LJ. Pattern of cytokines and pharmacomodulation in sepsis induced by cecal ligation and puncture compared with that induced by endotoxin. *Clin Diagn Lab Immunol.* 1995; 2: 549-53.
107. Volk HD, Reinke P, Döcke WD. Clinical aspects: from systemic inflammation to 'immunoparalysis'. *Chem Immunol* 2000; 74: 162-77.
108. Voll RE, Herrmann M, Roth EA, Stach C, Kalden JR, Girkontaite I. Immunosuppressive effects of apoptotic cells. *Nature* 1997 390: 350-1.
109. Walley KR, Lukacs NW, Standiford TJ, Strieter RM, Kunkel SL. Balance of inflammatory cytokines related to severity and mortality of murine sepsis. *Infect Immunity* 1996; 64: 4733-4738.
110. Weiner HL. Oral tolerance: Immune mechanisms and the generation of Th3-type TGF-beta-secreting regulatory cells. *Microbes Infect* 2001; 3: 947-54.

111. Williams A, Wang JJ, Wang L, Sun X, Fischer JE, Hasselgren PO. Sepsis in mice stimulates muscle proteolysis in the absence of IL-6. *Am J Physiol.* 1998; 275: R1983-1991.
112. Witcherman KA, Baue AE, Chaudry IH: Sepsis and septic shock: A review of laboratory models and a proposal. *J Surg Res* 1980; 29: 189-201.
113. Wolfe F, Michaud K, Anderson J, Urbansky K. Tuberculosis infection in patients with rheumatoid arthritis and the effect of infliximab therapy. *Arthritis Rheum* 2004; 50: 372-9.
114. Yin K, Gribbin E, Wang H. Interferon-gamma inhibition attenuates lethality after cecal ligation and puncture in rats: implication of high mobility group box-1. *Shock* 2005; 24: 396-401.
115. Yoshida K, Matsumoto T, Tateda K, Uchida K, Tsujimoto S, Iwakurai Y, Yamaguchi K. Protection against pulmonary infection with *Klebsiella pneumoniae* in mice by interferon-gamma through activation of phagocytic cells and stimulation of production of other cytokines. *J Med Microbiol.* 2001; 50: 959-64.
116. Zanotti Cavazzoni SL, Dellinger RP. Hemodynamic optimization of sepsis-induced tissue hypoperfusion. Review. *Crit Care* 2006; 10 Suppl 3:S2.
117. Zeni F, Vindimian M, Pain P, Gery P, Tardy B, Bertrand JC. Antiinflammatory and proinflammatory cytokines in patients with severe sepsis. *J Infec Dis* 1995; 172: 1171.

Artículos publicados