



Universidad de Buenos Aires  
Facultad de Farmacia y Bioquímica



"Disminución de la respuesta T durante la fase de inmunosupresión de la sepsis por *Staphylococcus aureus* : rol de las células mieloides supresoras (MDSC) y la señalización por TNFR1"

Lic. Camila Ledo

2017



Universidad de Buenos Aires  
Facultad de Farmacia y Bioquímica

Instituto de Investigaciones en Microbiología  
y Parasitología Médica

"Disminución de la respuesta T durante la fase de inmunosupresión de la sepsis por *Staphylococcus aureus*: rol de las células mieloides supresoras (MDSC) y la señalización por TNFR1"

Autora: Lic. Camila Ledo  
Directora: Dra. Marisa I. Gómez  
Consejera de estudios: Dra. Élide Álvarez

A la Dra. Marisa Gómez, por haberme brindado la posibilidad de realizar mis primeros pasos en la ciencia. Por acompañarme en las largas horas de experimentos, eso lo valoro mucho. Por la paciencia a la hora de la escritura, por enseñarme a hacerlo cada día un poco mejor. Gracias por toda la dedicación!

A la Dra. Cristina Cerquetti, Directora del IMPaM, y al Dr. Daniel Sordelli, Director del Departamento de Microbiología, Parasitología e Inmunología, por brindarme el espacio para realizar este trabajo.

Al Dr. Alfredo Vitullo, Director del CEBBAD (Universidad Maimónides) por brindarme el espacio para llevar a cabo parte de los experimentos de esta tesis.

A la Dra. Elida Álvarez, por aceptar ser mi consejera de estudios, por el tiempo dedicado, por la calidez, por su contribución a este trabajo.

A la Dra. Silvia Di Genaro por proveernos gentilmente los ratones C57BL6 *tnfr1*<sup>-/-</sup> lo cual nos permitió realizar gran parte de esta tesis doctoral.

A la Dra. Marta Mollerach, por cederme gentilmente la cepa de *S. aureus* Sa30, lo cual fue un aporte muy enriquecedor para esta tesis.

Al jurado, por la predisposición de aceptar ser parte y por el tiempo dedicado.

A las chicas de bioterio, especialmente a Marianela, Sabry, Vero y Vale. Por su excelente predisposición, por ayudarme y enseñarme. Por haber sido una de las partes fundamentales para que este trabajo se lleve a cabo.

A Daniela Ureta, Mónica Saracco, Guadalupe Suárez, Florencia Quiroga, Ariel Billordo y Pachi Baz, por su colaboración y buena predisposición siempre que los necesité.

A la Dra. Caro Poncini, no solo por los aportes siempre positivos para este trabajo sino también por ayudarme a encontrarle la vuelta. Porque pese a mis pedidos de ayuda de último momento, siempre estuviste y con la mejor predisposición! Y además de todo eso, por también escucharme con cosas de la vida no laboral!

A la Dra. Nora Goren, Fede, Agui y Jime. Por el tiempo que dedicaron a enseñarme, ayudarme y por estar siempre bien dispuestos cuando los necesité.

Al personal no docente del Departamento de Microbiología, Parasitología e Inmunología de la Facultad de Medicina, UBA. En especial a Lili, por su ayuda diaria teniendo el material siempre listo!

A la Bioq. Mónica Pomerantz, por la ayuda brindada durante su paso por el IMPaM.

A Lore, no solo por salvarme las papás siempre! sino también por escucharme y siempre estar atenta a cómo estaba.

A mis compas del labo, las de los primeros años y las de los últimos. A las de los primeros años, Coty, Ailín, Cintia y Andre, porque sin duda fueron fundamentales en mi etapa de formación, porque me enseñaron no solo a desenvolverme en la mesada sino también como persona. Por el apoyo que siempre me brindaron, por hacerme sentir siempre acompañada y en este último

tiempo por el aliento para la etapa de la escritura. Ana y Cintia "pequeña", por acompañarme y bancarme en esta etapa final.

A la Cinti, por el apoyo incansable desde nuestros tiempos de facultad. Por estar ahí desde el primer día, ayudándome y acompañándome hasta altas horas y en las vueltas a la Plata en el Plaza. Por el empuje que siempre me brindaste!

Como dice la frase: "el trabajo más productivo es el que sale de las manos de una persona contenta" y en esto le agradezco a Andre, por haberme demostrado que con alegría todo es más llevadero.

A mis compañeros del becalario, por los mates y las charlas compartidas. Por el compañerismo, por hacer de nuestro lugar de trabajo, un lugar donde uno se siente parte.

A mis nuevos compañeros del CEBBAD, gracias por la recibida tan afectuosa, por la ayuda constante.

También quiero agradecer a muchos otros que me bancaron fuera del labo...

A mi mamá, incansable alentadora! Por la libertad en la que me deja vivir, por acompañarme en todas las decisiones que tomo, por bancarse que quizá esas decisiones hagan que estemos lejos. Por su ejemplo, de estar en constante búsqueda de su mejor versión.

A mi papá, por enseñarme con su ejemplo, a trabajar con sinceridad, responsabilidad y dedicación. A valorar los logros alcanzados. Y por siempre acompañarme en la vida!

A Nico, mi hermano. Porque siempre de algún modo cuento con su apoyo. Por alentarme a vencer mis trabas!

Al Chon, mi abuelo. Por su amor!

A mis tíos y primos, su cariño es fundamental para mi!

A Sabri, mi amiga/hermana, por su incondicional apoyo. Porque con sus palabras me ayuda a ver siempre un poquito mejor cada situación.

A Ana, Anto y Mauri, los amigos que me dio la Facultad. Por la vida compartida, los consejos, el cariño!

A Angie, por su aguante cómo y dónde sea. Durante este último tiempo nos tocó acompañarlos en las difíciles, gracias por permitirme acompañarte y aconsejarte, yo también crecí en este camino recorrido.

A Lili, Martín, Naty, Dany, Ale, amigos de la vida. Que los tengo lejos, pero que son personas que me acompañan desde hace muchos años, en las buenas y no tan buenas. Que me escuchan, aconsejan, alientan y ayudan a transitar la vida.

A Sebas, amigo de labo y vecino. Por acompañarme en este último tiempo de vida en Capital, por no solo escucharme con temas laborales sino también de la vida.

<b>Carátula</b>	<b>i</b>
<b>Agradecimientos</b>	<b>ii</b>
<b>Índice</b>	<b>iv</b>
<b>Publicaciones</b>	<b>vii</b>
<b>Abreviaturas</b>	<b>ix</b>
<b>Resumen</b>	<b>xi</b>
<b>1. ANTECEDENTES</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Sepsis</b>	<b>2</b>
<b>1.2. Focos primarios de infección asociados al desarrollo de sepsis</b>	<b>3</b>
<b>1.3. Respuesta inmune innata asociada a las infecciones por <i>S. aureus</i></b>	<b>4</b>
<b>1.4. Fases de la sepsis</b>	<b>5</b>
<b>1.5. Células del sistema inmune involucradas en la inmunosupresión asociada a la sepsis</b>	<b>6</b>
<b>1.6. Vías de señalización involucradas en la expansión y funcionalidad de las MDSC</b>	<b>10</b>
1.6.1. Señalización en tumores	10
1.6.2. Señalización en modelos de sepsis polimicrobiana	10
1.6.3. Señalización en modelos de infección por <i>S. aureus</i>	11
1.6.4. Señalización inducida por TNF- $\alpha$	12
<b>2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN</b>	<b>14</b>
<b>2.1. Hipótesis</b>	<b>15</b>
<b>2.2. Objetivos de la investigación</b>	<b>15</b>
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>17</b>
<b>3.1. Soluciones y reactivos</b>	<b>18</b>
<b>3.2. Cepas bacterianas</b>	<b>18</b>
<b>3.3. Ratones</b>	<b>19</b>
3.3.1. Modelo murino de infección	19

3.3.1.1. Obtención de células de médula ósea	20
3.3.1.2. Obtención de suspensiones celulares de bazo	20
3.3.1.3. Obtención de suspensiones celulares de ganglios inguinales	20
3.3.2. Depleción de MDSC <i>in vivo</i>	20
<b>3.4. Citometría de flujo</b>	<b>21</b>
3.4.1. Inmunomarcación de moléculas de la superficie celular	21
3.4.2. Apoptosis	22
3.4.3. Detección de arginasa, óxido nítrico sintasa y Foxp3	23
3.4.4. Condiciones de adquisición de eventos celulares por citometría de flujo	24
<b>3.5. Cultivos celulares</b>	<b>24</b>
3.5.1. Purificación de MDSC por selección inmunomagnética	24
3.5.2. Ensayos de proliferación celular	25
3.5.2.1. Funcionalidad de los linfocitos T	25
3.5.2.2. Ensayos de funcionalidad de MDSC	27
<b>3.6. Cuantificación relativa de ARNm</b>	<b>27</b>
3.6.1. Extracción y cuantificación de ARN total	27
3.6.2. Preparación de ADNc a partir del ARN total	28
3.6.3. PCR de tiempo real	30
<b>3.7. ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) DE CAPTURA</b>	<b>32</b>
<b>3.8. Evaluación estadística</b>	<b>33</b>
<b>4. RESULTADOS</b>	<b>34</b>
<b>4.1. Inmunosupresión durante la sepsis por <i>S. aureus</i></b>	<b>35</b>
4.1.1. Modelo de sepsis por <i>S. aureus</i>	35
4.1.2. Funcionalidad de los linfocitos T durante la sepsis por <i>S. aureus</i>	37
4.1.3. Expansión y acumulación de MDSC durante la sepsis por <i>S. aureus</i>	41

4.1.3.1. Fenotipo de las MDSC que se expanden durante la sepsis por <i>S. aureus</i>	43
4.1.3.2. Capacidad de las MDSC provenientes de bazo de ratones inoculados con <i>S. aureus</i> de inhibir la proliferación de células T	44
4.1.4. Células T regulatorias durante la sepsis por <i>S. aureus</i>	46
4.1.5. Conclusiones parciales	47
<b>4.2. Contribución relativa de las MDSC en la inmunosupresión durante la sepsis por <i>S. aureus</i></b>	<b>47</b>
4.2.1. Conclusiones parciales	51
<b>4.3. Rol de la señalización por TNFR1 en la función inmunosupresora de las MDSC durante la sepsis por <i>S. aureus</i></b>	<b>51</b>
4.3.1. Sepsis por <i>S. aureus</i> en ratones <i>tnfr1</i> <sup>-/-</sup>	51
4.3.2. Funcionalidad de los linfocitos T durante la sepsis por <i>S. aureus</i> en ausencia de TNFR1	53
4.3.3. Expansión y acumulación de MDSC durante la sepsis por <i>S. aureus</i> en ausencia de la señalización por TNFR1	55
4.3.3.1. Fenotipo de las MDSC en ausencia de la señalización del TNFR1	56
4.3.4. La función supresora de las MDSC durante la sepsis por <i>S. aureus</i> depende de la señalización vía TNFR1	57
4.3.5. Posibles mecanismos de regulación <i>in vivo</i> de la funcionalidad de las MDSC a través de TNFR1	58
4.3.6. Conclusiones parciales	61
<b>5. DISCUSIÓN</b>	<b>62</b>
<b>6. CONCLUSIONES</b>	<b>72</b>
6.1. Conclusiones	73
6.2. Conclusión general	74
6.2. Perspectivas futuras	74
<b>7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>75</b>

**Los resultados del presente trabajo han sido parcialmente publicados en:**

**TNFR1 signaling drives the immunosuppressive function of MDSC during *Staphylococcus aureus* sepsis.**

Ledo C, Gonzalez CD, Poncini CV, Gómez MI.

Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease. Enviado. Año: 2017.

**Los resultados del trabajo han sido presentados en las siguientes reuniones científicas:**

***Staphylococcus aureus* induces expansion of myeloid derived suppressor cells.**

Ledo C, Mendoza Bertelli AC, Gómez MI.

LXII Reunión anual de la Sociedad Argentina de Inmunología (SAI). 19-22 de noviembre 2014. Mar del Plata, Buenos aires, Argentina. Poster.

**Role of TNFR1 in accumulation and functions of Myeloid-derived Suppressor Cell during *Staphylococcus aureus* infection.**

Ledo C, Gómez MI. LXIII

Reunión anual de la Sociedad Argentina de Inmunología (SAI). 18-21 de noviembre 2015. Ciudad Autónoma de Buenos aires, Argentina. Poster.

**TNFR1 signaling drives the immunosuppressive function of MDSC during *Staphylococcus aureus* sepsis.**

Ledo C, Gonzalez CD, Poncini CV, Gómez MI.

Gordon Research Conference, Staphylococcal diseases. Agosto 2017. Estados Unidos. Poster.

**TNFR1 SIGNALING DRIVES THE IMMUNOSUPPRESSIVE FUNCTION OF MDSC DURING *Staphylococcus aureus* SEPSIS.**

Ledo C, Gonzalez CD, Poncini CV, Gómez MI

Reunión anual de la Sociedad Argentina de Inmunología (SAI). 13-17 de noviembre 2017. Ciudad Autónoma de Buenos aires, Argentina. Poster.



**Otros trabajos publicados durante el Doctorado:**

**Shedding of TNFR1 induced by protein A decreases TNF- $\alpha$  availability and inflammation during systemic *Staphylococcus aureus* infection.**

Giai C, Gonzalez CD, Ledo C, Garofalo A, Di Genaro MS, Sordelli DO, Gómez MI.  
Infection and Immunity. 81(11):4200. Año: 2013

**The Sbi Protein Contributes to *Staphylococcus aureus* Inflammatory Response during Systemic Infection.**

Gonzalez CD, Ledo C, Giai C Garofalo A, Gómez MI.  
Plos One. 10 (6): e0131879. Año: 2015.

**High virulence of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* ST30-SCCmecIVc-spat019, the dominant community-associated clone in Argentina.**

Fernandez S, Ledo C, Lattar S, Noto Llana M, Mendoza Bertelli AC, Di Gregorio S, Sordelli DO, Gómez MI, Mollerach M.  
Int J Med Microbiol. 307(4-5):191-199. Año: 2017.

## ABREVIATURAS

Abs: absorbancia.  
ADAM17: del inglés "*a disintegrin and metalloproteinase domain 17*".  
ADN: ácido desoxirribonucleico.  
ADNc: ácido desoxirribonucleico complementario.  
Arg1: Arginasa 1.  
ARN: ácido ribonucleico.  
ARNm: ácido ribonucleico mensajero.  
BHI: del inglés "Brain Heart Infusion".  
5FU: 5- fluorouracilo.  
C/EBP $\beta$ : del inglés "CCAAT/enhancer binding protein  $\beta$ ".  
CFSE: succinimidil éster diacetato de carboxifluoresceína: CFDA-SE.  
CLP: del inglés "cecal ligation puncture".  
ConA: concanavalina A.  
COX2: ciclooxigenasa 2.  
DO: densidad óptica.  
DP: Diálisis peritoneal.  
EDTA: del inglés "*Ethylenediaminetetraacetic acid*".  
EGFR: del inglés "*Epidermal growth factor receptor*".  
GAPDH: del inglés "*Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*".  
G-MDSC: MDSC de tipo granulocítico.  
gr: gramo.  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Peróxido de hidrógeno.  
IDO: 2,3-dioxigenasa.  
IFN- $\gamma$ : interferón gamma  
IFM: intensidad de fluorescencia media.  
IL-1 $\beta$ : interleuquina 1 beta.  
IL-1 $\beta$ ra: antagonista del receptor de IL-1 $\beta$ .  
IMC: del inglés "Immature Myeloid Cells".  
iNOS: óxido nítrico sintasa inducible.  
JAK2: del inglés "Janus kinase 2".  
KDa: Kilodalton.  
MAPKs: del inglés "*Mitogen-activated protein kinases*".  
MDSC: del inglés "Myeloid-Derived Suppressor Cells".  
 $\mu$ g: microgramo.  
 $\mu$ l: microlitro.  
 $\mu$ M: micromolar.  
ml: mililitro.  
mM: milimolar.  
M: molar.  
NF- $\kappa$ B: del inglés "*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*".  
ng: nanogramo.  
nm: nanómetro.  
nM: nanomolar.  
NOD: del inglés "*nucleotide-binding oligomerization domain proteins*".  
n.s.: no significativo.  
MAMPs: del inglés: "*microbe-associated molecular patterns*".  
MHC II: complejo mayor de histocompatibilidad de clase II.  
Mo-MDSC: MDSC de tipo monocítico.  
Pb: Pares de bases.  
PCR: del inglés "*polymerase chain reaction*".  
PD-1: del inglés "programmed cell death-1".  
PD-L1: del inglés "programmed cell death-1 ligand".  
PGE2: prostaglandina E2.

pg: picogramo.

PRRs: del inglés: "*pathogen recognition receptors*".

rpm: revoluciones por minuto.

RT: retrotranscripción o retrotranscriptasa.

SA: *S. aureus*.

SAMR: *S. aureus* Meticilino Resistente.

SF: Solución fisiológica.

SNR: suero normal de ratón.

STAT3: del inglés "Signal Transducer and Activator of Transcription 3".

*sTNFR*: forma soluble del receptor de *TNF- $\alpha$* .

Td: temperatura de disociación.

T°: Temperatura.

TACE: del inglés "TNF converting enzyme".

TGF- $\beta$ : del inglés "transforming growth factor beta".

TLR2: del inglés "*Toll- like receptor 2*".

TMB: tetrametilbencidina.

tmTNF- $\alpha$ : TNF- $\alpha$  transmembrana.

TNF- $\alpha$ : del inglés "*tumor necrosis factor alfa*".

*tnfr1*<sup>-/-</sup>: ratones que carecen de la expresión de TNFR1.

TNFR1: del inglés "*tumor necrosis factor receptor 1*".

TNFR2: del inglés "*tumor necrosis factor receptor 2*".

Treg: T regulatorias.

TSA: del inglés "Trypticase Soy Agar"

TSB: del inglés "Trypticase Soy Broth".

Tu: temperatura de unión.

UFC: Unidades Formadoras de Colonias.

V: voltios.

*Staphylococcus aureus* es un patógeno humano de gran importancia médica dado que coloniza e infecta a pacientes hospitalizados así como a individuos sanos inmunocompetentes de la comunidad. Entre las patologías que causa se encuentran las que afectan a piel y tejidos blandos y aquellas que poseen alta morbilidad y mortalidad como la sepsis. En la actualidad *S. aureus* es el patógeno más frecuentemente aislado en pacientes sépticos con infección bacteriana documentada.

La sepsis es una enfermedad de gran impacto en la salud pública dada la alta tasa de morbi-mortalidad que posee. Durante muchos años ha prevalecido el concepto que la mortalidad asociada a la sepsis resultaba de la respuesta inflamatoria exacerbada durante el período inicial de la enfermedad. Sin embargo, los avances en los cuidados intensivos han permitido disminuir la mortalidad durante la fase aguda de la sepsis, observándose un aumento gradual de la mortalidad de los pacientes luego de la "recuperación" de los fenómenos agudos. Esto se debe, a que si bien algunos pacientes logran superar el estado inflamatorio, otros fallan en resolver esta condición y progresan hacia un estado de inflamación persistente, acompañado de disfunción celular inmune y metabolismo catabólico, condición para la cual las intervenciones actuales son ineficientes. La mortalidad en esta segunda etapa se debe fundamentalmente a la imposibilidad de controlar la infección primaria o a la adquisición de infecciones secundarias de origen intrahospitalario causadas por patógenos oportunistas.

Entre los tipos celulares que podrían estar involucrados en la inmunosupresión durante la sepsis, estudios recientes han sugerido que la acumulación de células mieloides supresoras (MDSC) en órganos linfáticos secundarios y su presencia en circulación podría ser un componente importante de dicho proceso. Las MDSC constituyen una población heterogénea de células mieloides inmaduras originalmente descritas en tumores y cuya característica principal es su capacidad de suprimir la funcionalidad de células T. Entre las moléculas que regulan la acumulación y funcionalidad de las MDSC, tanto en modelos tumorales como en infecciones polimicrobianas, se ha descrito la participación del TNF- $\alpha$ .

Las infecciones por *S. aureus* se caracterizan por generar una fuerte respuesta inflamatoria, siendo el TNF- $\alpha$ , una de las citoquinas proinflamatorias inducida. Esta citoquina activa la cascada de señalización de NF- $\kappa$ B, al interactuar con el TNFR1, la cual regula de forma positiva a otras citoquinas de gran importancia como IL-1 $\beta$  e IL-6, y al mismo TNF- $\alpha$ . Más aún, nuestro grupo de trabajo ha demostrado que *S. aureus* a través de la proteína A mimetiza la acción de TNF- $\alpha$  en diferentes tipos celulares induciendo la producción de citoquinas proinflamatorias.

Los eventos que conducen a la inmunosupresión asociada a la sepsis por *S. aureus* no han sido al presente completamente elucidados. Más aún, se desconoce el

rol que el TNF- $\alpha$  y la señalización por TNFR1 pudieran tener en la acumulación y funcionalidad de las MDSC presentes durante la sepsis por *S. aureus*.

En base a los antecedentes antes expuestos, el objetivo general de este trabajo fue determinar si durante la sepsis por *S. aureus* se produce la expansión y posterior acumulación de MDSC en órganos linfoides periféricos y si este fenómeno contribuye a la disminución de la respuesta T durante la fase de inmunosupresión. Asimismo, se estableció el rol que la señalización mediada por TNFR1 podría tener en la expansión y adquisición del fenotipo inmunosupresor de las MDSC.

El trabajo fue llevado a cabo utilizando un modelo experimental de sepsis por *S. aureus* de origen peritoneal. En el mismo fue posible observar características propias de la fase inicial pro-inflamatoria, como el incremento de la IL-6 circulante a tiempos tempranos luego de la inoculación y de la fase de inmunosupresión, como la presencia de niveles elevados de IL-10 en plasma y bazo a tiempos tardíos luego de la inoculación. La producción de IL-10 observada en plasma y bazo resultó ser un proceso dependiente de la señalización por TNFR1.

Los resultados obtenidos permitieron determinar que durante la sepsis experimental por *S. aureus* se indujo la expansión y acumulación de MDSC en médula ósea, bazo y ganglios linfáticos. Al evaluar la contribución relativa de las MDSC en la fase de inmunosupresión se estableció que contribuyen significativamente a la anergia de las células T CD4 y a la patogénesis de la sepsis por *S. aureus*. Asimismo, se demostró que la señalización por TNFR1 no se encuentra implicada en el reclutamiento y expansión de las MDSC en el bazo pero es crítica en el proceso de adquisición de la funcionalidad inmunosupresora de dicha población celular modulando la expresión de arginasa y óxido nítrico sintasa inducible. El impacto de la señalización por TNFR1 en la actividad de las MDSC estaría dado principalmente por el microambiente generado *in vivo* en respuesta a las cascadas inducidas por dicho receptor.

Por lo tanto, el presente trabajo permitió demostrar por primera vez que las MDSC participan de la inmunosupresión observada durante la sepsis por *S. aureus*, y que la señalización inducida por TNF- $\alpha$ , una citoquina inflamatoria, es crítica en dicho proceso. Nuestros hallazgos contribuirán a establecer la potencialidad de considerar a las MDSC como blanco de terapias inmunomoduladoras que complementen las terapias convencionales en pacientes sépticos.

# *1. Antecedentes*

## 1.1. Sepsis

La sepsis se define como la disfunción orgánica potencialmente mortal causada por la respuesta inmunológica desregulada del huésped frente a una infección (The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3)) (Singer M *et al.*, 2016). La incidencia de sepsis ha aumentado en los últimos años debido al incremento en el porcentaje de la población que alcanza edades avanzadas, a los tiempos prolongados de internación y al mayor uso de procedimientos terapéuticos invasivos, lo cual ha generado gran interés a nivel epidemiológico en dicha entidad (Cabrera-Perez J *et al.*, 2014).

Dentro de la sepsis de origen bacteriano, las bacterias gram negativas fueron los microorganismos predominantes que causaban dicha enfermedad hasta la década de los 80. Sin embargo, la incidencia de sepsis por bacterias gram positivas ha ido aumentando en forma constante durante las últimas tres décadas. En un estudio realizado en Estados Unidos en el año 2000 las bacterias gram positivas representaron el 52,1% de los casos de sepsis siendo *Staphylococcus aureus* el patógeno más frecuentemente aislado (van der Poll T *et al.*, 2008; Angus DC *et al.*, 2013). Asimismo, en un estudio realizado en 2007 se observó que *S. aureus* fue la principal bacteria gram positiva aislada en pacientes internados en cuidados intensivos (Vincent JL *et al.*, 2009). El estudio retrospectivo realizado por Otto y colaboradores sobre pacientes internados en unidades de cuidados intensivos en un hospital de Alemania demostró que *S. aureus* fue el principal patógeno aislado en pacientes que cursaban la fase I de la sepsis, considerada como la etapa que comprende los 5 días posteriores al diagnóstico (Otto GP *et al.*, 2011).

En este contexto, es importante considerar que no ha habido un avance proporcional en el conocimiento de los eventos que se desencadenan durante la sepsis por *S. aureus* en comparación con los estudios realizados respecto de bacterias gram negativas o sepsis polimicrobianas. Más aún, investigaciones recientes demuestran que las respuestas inducidas por bacterias gram positivas difieren significativamente de las observadas con bacterias gram negativas (Horiuchi K *et al.*, 2007; Secher T *et al.*, 2009; Long C *et al.*, 2010; McIlwain DR *et al.*, 2012) lo cual señala la importancia de considerar la etiología de la sepsis en el estudio de la patogenia de dicha entidad clínica.

## 1.2. Focos primarios de infección asociados al desarrollo de sepsis

En 2007 se realizó un estudio en las unidades de cuidados intensivos de instituciones de salud de 75 países para evaluar cual era el principal foco infeccioso en pacientes con sepsis. De los 7000 pacientes incluidos, el foco pulmonar presentó la mayor prevalencia (64%) seguido por el abdominal (20%) y la bacteriemia (15%) siendo los menos frecuentes el tracto renal o genitourinario (14%) (Vincent JL *et al.*, 2009).

Las cepas de *S. aureus* resistentes a meticilina que provienen de la comunidad (SAMR) han surgido durante la década de los 90 como un problema de gran importancia en la salud pública. Los principales aislamientos de SAMR de la comunidad fueron aislados a partir de infecciones de piel y partes blandas. La celulitis y la fascitis necrotizante son las infecciones prevalentes de piel y partes blandas en las unidades de cuidados intensivos (George SM *et al.*, 2008). Estas cepas provenientes de la comunidad son conocidas por estar asociadas a infecciones invasivas (Fernandez S *et al.*, 2013; Klevens RM *et al.*, 2007; Skinner D *et al.*, 1941). En este sentido, el 7% de los pacientes hospitalizados diagnosticados con sepsis tienen como foco de infección primaria, la piel (Vincent JL *et al.*, 2009).

En relación al modelo de sepsis monomicrobiana utilizado en el presente trabajo, es importante considerar que la infección abdominal es un foco primario causante de sepsis principalmente en pacientes que se encuentran bajo regímenes de diálisis peritoneal (DP). En estos pacientes las peritonitis por *S. aureus* son una complicación frecuente que puede dar origen al desarrollo de bacteriemias con elevada mortalidad (Szeto CC *et al.*, 2011; Barretti P *et al.*, 2012). La DP es un tratamiento extensamente utilizado en pacientes pediátricos que se encuentran en el estadio final de enfermedad renal (Chiu YW *et al.*, 2010). La frecuencia de peritonitis en niños bajo DP excede ampliamente la tasa de peritonitis en adultos y resulta el principal motivo por el cual se debe cambiar el régimen al de hemodiálisis (Klaus G, 2011; Piraino B *et al.*, 2011; Warady BA *et al.*, 2012). Entre los causales de peritonitis que presentan mayor morbilidad y mortalidad se encuentran: *S. aureus* (Troidle L *et al.*, 1998; Peacock SJ *et al.*, 2000, Troidle L *et al.*, 2006), *Pseudomonas aeruginosa* (Bunke CM *et al.*, 1997; Krishnan M *et al.*, 2002), hongos (Goldie SJ *et al.*, 1996; Wang AY *et al.*, 2000), micobacterias (Lui SL *et al.*, 1996) y microorganismos endémicos (Tzamaloukas AH *et al.*, 1993; Piraino B *et al.*, 1995; Harwell CM *et al.*, 1997; Kern EO *et al.*, 2002). Entre ellos, *S. aureus* se encuentra asociado a los cuadros de peritonitis más severos y a un mayor riesgo de peritonitis recurrentes (Leppänen H *et al.*, 2006; Szeto CC *et al.*, 2011).



### 1.3. Respuesta inmune innata asociada a las infecciones por *S. aureus*

*S. aureus* es un coco gram positivo de gran importancia médica dado que es un importante patógeno humano que coloniza e infecta a pacientes hospitalizados así como a individuos sanos inmunocompetentes de la comunidad. Entre las enfermedades que causa se encuentran las que afectan a piel y tejidos blandos y aquellas que poseen alta morbilidad y mortalidad como neumonías, osteomielitis, endocarditis y sepsis (Lowy FD, 2008; Lowy FD, 2007). A su vez, es un importante agente causal de infecciones asociadas a la presencia de prótesis, catéteres y a heridas quirúrgicas. La patogenicidad de *S. aureus* se debe a la acción coordinada de múltiples factores de virulencia, que permiten al patógeno adherirse a las células o tejidos, invadir y causar daño, así como evadir el sistema inmune (Lowy FD, 1998; Foster TJ *et al.*, 2014). Asimismo, la expresión de los genes que codifican para factores de virulencia se encuentra rigurosamente regulada por sistemas regulatorios de dos componentes (Brunskill EW *et al.*, 1996; Novick RP, 2003), ARNs pequeños regulatorios (Pichon C, *et al.*, 2005; Felden B, 2011; Guillet J *et al.*, 2013) y proteínas de unión al ADN (Cheung AL *et al.*, 2008; Lauderdale KJ *et al.*, 2009).

La sepsis por *S. aureus* es un problema creciente a nivel mundial y la mortalidad que ocasiona se atribuye a la desregulación del sistema inmune (Hotchkiss RS *et al.*, 2003, Hotchkiss RS *et al.*, 2006). Las infecciones por *S. aureus* se caracterizan por la inducción de una importante respuesta inflamatoria. Luego del ingreso de la bacteria al sitio de infección, la misma es rápidamente reconocida por receptores celulares del sistema inmune innato del hospedador iniciando cascadas de señalización que conducen a la producción de citoquinas inflamatorias y quimioquinas las cuales dirigen el reclutamiento de neutrófilos al sitio de la infección. Las células del hospedador reconocen, mediante receptores específicos denominados PRRs (del inglés: "pathogen recognition receptors") diversas moléculas producidas por bacterias las cuales son motivos conservados llamados MAMPs (del inglés: "microbe-associated molecular patterns"). Entre los receptores celulares que reconocen MAMPs se destacan, en el caso del reconocimiento de *S. aureus*, los receptores TLR2 (del inglés: "Toll-like receptor-2") y NOD (del inglés: "nucleotide-binding oligomerization domain proteins").

La proteína A, una proteína presente en la superficie de la mayoría de los aislamientos clínicos de *S. aureus*, participa en la inducción de respuesta inflamatoria dado que es capaz de interactuar con el receptor del factor de necrosis tumoral, TNFR1, en células epiteliales respiratorias y macrófagos y activar los mecanismos de transducción de señales normalmente inducidos por TNF- $\alpha$ , el ligando natural de TNFR1. La activación de TNFR1 por la proteína A induce la producción de citoquinas

inflamatorias y quimioquinas y el reclutamiento de neutrófilos a través de la activación de MAPKs y NF- $\kappa$ B (Gomez MI *et al.*, 2004; Claro T *et al.*, 2013). Además de ser reconocida por TNFR1, la proteína A induce la fosforilación del receptor del factor de crecimiento epidérmico, EGFR, activando la señalización a través del mismo lo cual conduce a la fosforilación de los intermediarios intracelulares Erk1/2 y STAT3 y la producción de citoquinas (Gomez MI *et al.*, 2007; Martin FJ *et al.*, 2009).

#### 1.4. Fases de la sepsis

Durante la sepsis la respuesta inmune innata y adaptativa se encuentran alteradas por períodos de tiempo sostenidos y la activación sistémica del sistema inmune innato resulta en una respuesta inflamatoria severa y persistente que eventualmente produce daño en los tejidos, lo cual puede provocar la disfunción orgánica e incluso la falla multiorgánica (Rittirsch D *et al.*, 2008). Esta última, es la consecuencia más frecuente de la sepsis, la cual conduce a la muerte del individuo (Abraham E *et al.*, 2007; Holthoff JH *et al.*, 2013; Patil NK *et al.*, 2014; Singer M *et al.*, 2016).

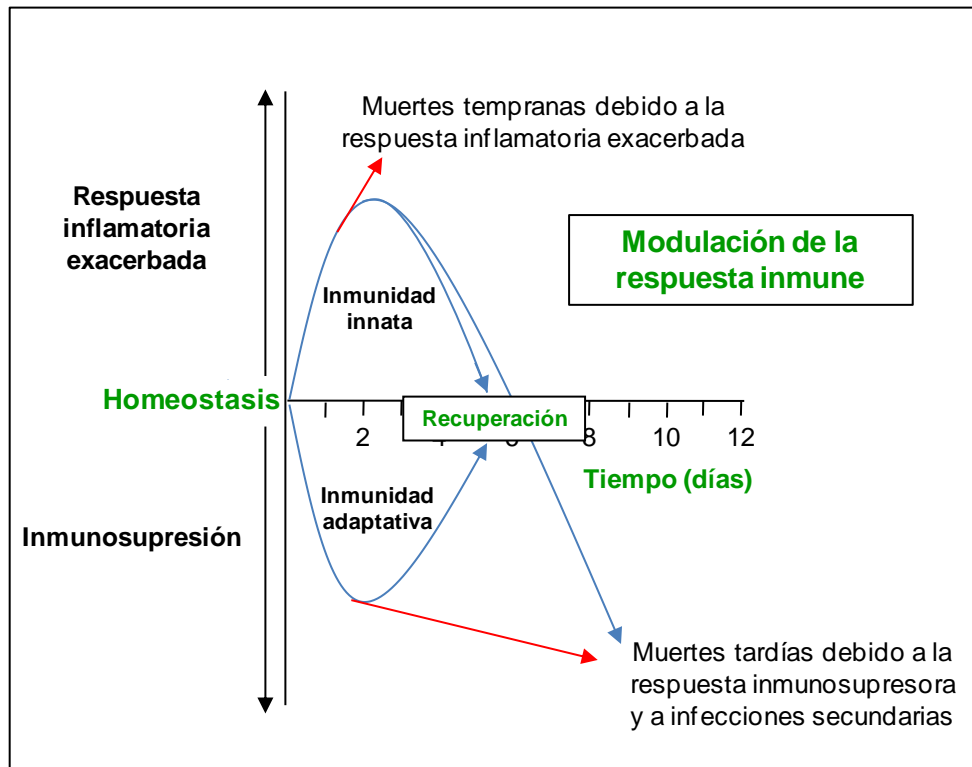
Durante muchos años ha prevalecido el concepto que la mortalidad asociada a la sepsis resultaba de la respuesta inflamatoria exacerbada durante el período inicial de la enfermedad (Hotchkiss RS *et al.*, 2009). Esto se debe en parte a que los primeros estudios en modelos animales experimentales se realizaron utilizando lipopolisacárido, principal componente de la membrana externa de las bacterias gram negativas, como inductor de sepsis para mimetizar la hiperinflamación característica de la enfermedad. Se observó que la respuesta proinflamatoria causaba un alto índice de mortalidad y que la neutralización de las citoquinas inflamatorias conducía a una mejora en la supervivencia (Tracey KJ *et al.*, 1987). En base a los resultados obtenidos en dichos modelos experimentales los ensayos clínicos subsiguientes se orientaron hacia la neutralización de la respuesta inflamatoria. Sin embargo, los ensayos clínicos realizados durante más de dos décadas, diseñados para neutralizar citoquinas inflamatorias, no mostraron ser eficaces en mejorar el desenlace de la sepsis (van Dissel JT *et al.*, 1998; Opal SM *et al.*, 1997; Abraham E *et al.*, 1998). Esto se debe en parte a que los niveles de citoquinas inflamatorias que se detectan en pacientes con sepsis son sumamente inferiores a los determinados en ratones inoculados con lipopolisacárido (Hotchkiss RS *et al.*, 2003) y a que la presencia de niveles moderados de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  y otras citoquinas inflamatorias es necesaria para la eliminación de los microorganismos (Lorente JA *et al.*, 2005). En este sentido, la importancia del TNF- $\alpha$  y la IL-1 $\beta$  en la resolución de la etapa inicial de la infección sistémica por *S. aureus* ha sido demostrada por nuestro grupo de investigación y otros (Nakane A *et al.*, 1995; Giai C *et al.*, 2013; Giai C *et al.*, 2016).

Los avances en los cuidados intensivos han permitido disminuir la mortalidad durante la fase aguda de la sepsis, observándose un aumento gradual de la mortalidad de los pacientes luego de la "recuperación" de los fenómenos agudos. Esto se debe a que si bien algunos pacientes se recuperan del estado inflamatorio, otros fallan en resolver esta condición y progresan hacia un estado de inflamación persistente, acompañado de disfunción celular inmune y metabolismo catabólico, condición para la cual las intervenciones actuales son ineficaces (Goodwin AJ *et al.*, 2015). En dichos pacientes se observan manifestaciones metabólicas, inmunológicas y fenotípicas similares a la de los pacientes con cáncer avanzado. La mortalidad en esta segunda etapa se debe fundamentalmente a la imposibilidad de controlar la infección primaria o a la adquisición de infecciones secundarias de origen intrahospitalario causadas por patógenos oportunistas (Torgersen C *et al.*, 2009; Otto GP *et al.*, 2011). Los principales patógenos oportunistas que se aíslan en estos pacientes presentan variaciones en frecuencia según la epidemiología del centro de salud en cuestión, predominando las infecciones por bacilos gram negativos como *Pseudomonas aeruginosa* y *Klebsiella pneumoniae* e infecciones por *Candida* spp. (Otto GP *et al.*, 2011).

Si bien antes se consideraba a la fase hiperinflamatoria como una etapa previa y diferenciada de la fase de inmunosupresión, el avance del conocimiento del tema ha permitido demostrar que la inmunosupresión o inmunoparálisis se inicia concomitantemente con la fase proinflamatoria inicial (Munford RS *et al.*, 2011; Xiao W *et al.*, 2011; Stearns-Kurosawa DJ *et al.*, 2011) y que se encuentra directamente relacionada con el mal pronóstico de la sepsis (Hotchkiss RS *et al.*, 2006) (Figura 1, próxima página). En este sentido, estudios que involucran un alto número de pacientes sépticos así como modelos experimentales en animales han demostrado una asociación significativa entre la inmunosupresión y la mortalidad tardía (Boomer JS *et al.*, 2011).

### **1.5. Células del sistema inmune involucradas en la inmunosupresión asociada a la sepsis**

Entre los mecanismos que conducen a la inmunosupresión, se ha descrito un aumento de la apoptosis de células B, T y dendríticas así como la inducción de anergia en células T y el predominio de respuestas celulares de tipo T helper 2 en las células inmunes sobrevivientes (Hotchkiss RS *et al.*, 2006). Una citoquina que resulta protagónica durante la inmunosupresión es la IL-10, la cual es producida por varios tipos celulares. La IL-10 suprime la producción de IL-6 e IFN- $\gamma$  y estimula la producción de las formas solubles del receptor de TNF- $\alpha$  (sTNFR) y del antagonista del receptor de IL-1 $\beta$



**Figura 1.** La activación de la respuesta inmune pro y antiinflamatoria ocurre en forma simultánea desde el inicio de la sepsis. Las células del sistema inmune innato liberan grandes cantidades de citoquinas proinflamatorias que provocan la respuesta inflamatoria (línea azul, día 1 al 3). La intensidad de la respuesta inflamatoria varía en cada paciente, y depende de múltiples factores. Las muertes tempranas (línea roja superior, día 3) se deben a una respuesta inflamatoria exacerbada. El sistema inmune innato y adaptativo se restablece en gran parte de los pacientes, de esta forma logran sobrevivir a la infección (recuperación, día 6). Si la sepsis persiste, puede ocurrir la falla de los elementos críticos del sistema inmune tanto innato como adaptativo de forma que los pacientes entran en un estado de inmunosupresión (líneas azules y rojas, luego del día 6). Las muertes se deben a la incapacidad del paciente para eliminar la infección primaria así como también al desarrollo de infecciones secundarias.

(IL-1 $\beta$ ra), los cuales actúan neutralizando a las citoquinas proinflamatorias, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , respectivamente (Gilroy DW *et al.*, 2005).

En células inmunes obtenidas de bazo o pulmón de pacientes con sepsis en un período de entre 30 y 180 minutos luego de su muerte, se ha observado producción disminuida de citoquinas pro y antiinflamatorias, un aumento en la expresión de receptores inhibitorios y la expansión de células T regulatorias (Treg) y células mieloides supresoras (MDSC, del inglés: "Myeloid-Derived Suppressor Cells") (Boomer JS *et al.*, 2011).

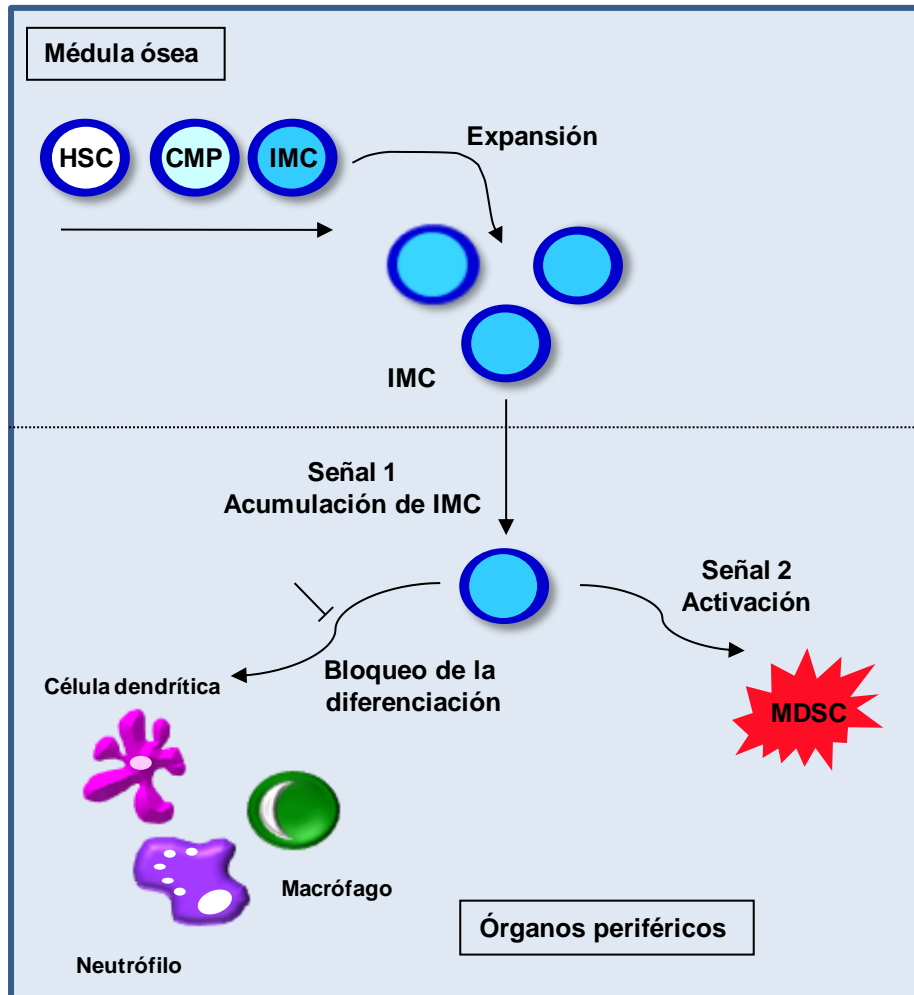
Recientemente, se demostró que la expansión temprana de MDSC de tipo granulocítico es predictiva del desarrollo de infecciones nosocomiales secundarias en pacientes sépticos, lo cual sugiere un rol preponderante para dichas células en la supresión inmune inducida por la sepsis (Uhel F *et al.*, 2017, Mathias B *et al.*, 2017). En base a estos antecedentes y otros estudios previos (Sander LE *et al.*, 2010; Cuenca AG

*et al.*, 2011) es posible proponer un rol para la acumulación de MDSC en órganos linfáticos secundarios y su presencia en circulación en los fenómenos de inmunosupresión.

Las MDSC son una población heterogénea de células mieloides inmaduras que fue originalmente caracterizada por su capacidad de suprimir la funcionalidad de células T en tumores (Gabrilovich DI *et al.*, 2009). Más recientemente, se demostró un incremento de MDSC en enfermedades inflamatorias agudas y crónicas incluyendo trauma, quemaduras, infecciones de piel y sepsis (Cuenca AG *et al.*, 2011; Ilkovitch D, 2011) y se ha propuesto que podrían tener un rol protector en la regulación de la inflamación (Sander LE *et al.*, 2010; Brudecki L *et al.*, 2012; Poe SL *et al.*, 2013; Arocena A *et al.*, 2014). Sin embargo, dependiendo del modelo utilizado, se les ha atribuido un rol deletéreo por su capacidad de inducir un microambiente antiinflamatorio que no permite la erradicación de los microorganismos (Delano MJ *et al.*, 2007; Brudecki L *et al.*, 2012; Martire-Greco D *et al.*, 2014; Heim CE *et al.*, 2014). La descripción de los marcadores que definen esta población ha sido un desafío importante, pero en la actualidad existe consenso acerca de que las MDSC de ratón expresan en su superficie los marcadores CD11b y Gr1 (Peranzoni E *et al.*, 2010; Lechner MG *et al.*, 2010). En ratones, bajo condiciones normales, la médula ósea contiene un 20-30% de células con este fenotipo, pero estas células sólo constituyen una pequeña proporción (2-4%) de células del bazo y están ausentes de los nódulos linfáticos (Gabrilovich DI *et al.*, 2009). A su vez, se ha propuesto que de acuerdo a la expresión de los marcadores Ly6G y Ly6C las MDSC murinas pueden ser subdivididas en MDSC de tipo granulocítico (G-MDSC: CD11b<sup>+</sup>Gr1<sup>+</sup>Ly6G<sup>+</sup>Ly6C<sup>low</sup>) o de tipo monocítico (Mo-MDSC: CD11b<sup>+</sup>Gr1<sup>+</sup>Ly6G<sup>-</sup>Ly6C<sup>high</sup>) (Movahedi K *et al.*, 2008). Las MDSC humanas han sido descritas como células CD11b<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup>HLA-DR<sup>low/neg</sup>. Las MDSC de tipo granulocítico son CD14<sup>-</sup> y expresan tanto CD66b como CD15, mientras que la de tipo monocítico son CD14<sup>+</sup> (Nagaraj S *et al.*, 2010). A pesar del uso de múltiples marcadores, la caracterización fenotípica no es suficiente para identificar a las MDSC siendo necesario establecer mediante ensayos funcionales su actividad supresora. Esto se debe a que el término MDSC es una definición funcional de las células mieloides inmaduras (IMC, del inglés: "Immature Myeloid Cells") que han adquirido una potente actividad inmunosupresora (Gabrilovich *et al.*, 2009).

Las IMC son parte del proceso normal de mielopoyesis, que tiene lugar en la médula ósea y es controlada por una compleja red de factores. Las células madres hematopoyéticas se diferencian en células progenitoras mieloides comunes y luego en IMC. Normalmente, las IMC migran a diferentes órganos periféricos donde se diferencian en células dendríticas, macrófagos y granulocitos. Sin embargo, los factores producidos

en el microambiente tumoral y/o durante las infecciones agudas o crónicas, trauma o sepsis, promueven la acumulación de IMC en estos sitios, impidiendo su diferenciación e induciendo su activación (adquisición de la función supresora). Estas células exhiben funciones inmunosupresoras y son, por lo tanto, llamadas MDSC (Gabrilovich *et al.*, 2009) (Figura 2).



**Figura 2.** Ante una demanda aumentada de células mieloides, las IMC se expanden en la médula ósea y migran hacia la periferia, un proceso conocido como mielopoyesis de emergencia. Cuando las IMC se exponen a factores producidos en condiciones patológicas, se produce el bloqueo en el proceso de diferenciación de esta población y, por lo tanto, se produce la acumulación de las IMC (Señal 1). Asimismo, el ambiente patológico genera señales para que las IMC se conviertan en células mieloides supresoras funcionalmente activas (Señal 2).

Las MDSC bloquean la proliferación de células T mediante la privación de ciertos aminoácidos y la acción de sus metabolitos. La L-arginina es un aminoácido esencial utilizado en la biosíntesis de proteínas, creatina y espermina. Las MDSC expresan arginasa (Arg1) y óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), enzimas que utilizan la L-arginina para producir urea y óxido nítrico, respectivamente. Se ha reportado que la privación de dicho aminoácido causa la disminución de la biosíntesis de la cadena  $\zeta$  del CD3, lo que provoca el arresto de las células T en la fase G0-G1 del ciclo celular. Además, el óxido

nítrico puede suprimir a las células T mediante la inhibición de la fosforilación y activación de JAK3 y STAT5, la disminución de la expresión de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (MHC II) y la inducción de apoptosis en las mismas. La hidrólisis del triptofano, otro aminoácido esencial para las células T, mediante la 2,3-dioxigenasa (IDO) y la privación de cisteína conducen además a la supresión de la activación de dicha población celular. Asimismo, la producción de peróxido de hidrógeno y fenilpiruvato a partir de L-fenilalanina, por parte de las MDSC, inhibe la expresión de la cadena  $\zeta$  del CD3 y la consecuente proliferación de los linfocitos T (Chen J *et al.*, 2016).

## **1.6. Vías de señalización involucradas en la expansión y funcionalidad de las MDSC**

### **1.6.1. Señalización en tumores**

La acumulación y activación de las MDSCs es un proceso complejo para el cual se ha propuesto un modelo de dos señales: la primera es la responsable de la expansión de las células mieloides inmaduras, lo cual está asociado con la inhibición de su diferenciación terminal, y la segunda es la encargada de la activación funcional de estas células, convirtiendo las células mieloides inmaduras en MDSC (Figura 2) (Condamine T *et al.*, 2011). En cáncer, la expansión de las MDSC puede ser inducida principalmente por factores de crecimiento derivados de tumores. Estos factores de crecimiento ejercen su función activando diferentes vías de señalización y empleando diferentes factores de transcripción, entre los que se encuentran STAT3, IRF8, C/EBP $\beta$ , Notch y la señalización por receptores de adenosina A2b. Los factores de crecimiento GM-CSF y G-CSF, además de la IL-6, están involucrados en la activación de STAT3 (Condamine T *et al.*, 2015). En este sentido, en modelos tumorales se ha demostrado la importancia de la activación de STAT3 y proteínas reguladas por dicho factor de transcripción como las proteínas de unión a calcio S100A8 y S100A9 en la expansión de las MDSC (Condamine T *et al.*, 2011). La segunda señal, encargada de promover la actividad supresora de las MDSC, estaría mediada por factores producidos principalmente por el estroma del tumor, como son las citoquinas proinflamatorias e incluyen las vías de señalización de NF- $\kappa$ B, STAT1, STAT3, STAT6, así como también la prostaglandina E2 (PGE2) y la ciclooxigenasa 2 (COX2) (Condamine T *et al.*, 2015).

### **1.6.2. Señalización en modelos de sepsis polimicrobiana**

Los estudios tendientes a dilucidar el rol de las MDSC en sepsis y los factores que conducen a su expansión en dicha enfermedad han sido realizados utilizando el modelo

experimental de sepsis polimicrobiana por CLP (CLP del inglés: “cecal ligation puncture”) en el cual la sepsis es inducida por volcado del contenido intestinal al peritoneo (Wichterman KA *et al.*, 1980). En dicho modelo se observó que las MDSC se expanden drásticamente en los animales sépticos a través de un proceso que requiere de la expresión del microRNA-21 y microRNA-181b. Los microRNA son reguladores claves en el control del desarrollo de enfermedades como el cáncer (Tang F *et al.*, 2012; Zheng L *et al.*, 2015) y la inflamación (Saravanan S *et al.*, 2015; Zhang XM *et al.*, 2015). En respuesta a la señalización mediada por IL-6, los factores de transcripción STAT3 y C/EBP $\beta$  (del inglés: “CCAAT/enhancer binding protein  $\beta$ ”) se unen a los promotores de los microRNA-21 o 181b, activando su expresión (McClure C *et al.*, 2017). Los microRNA-21 y 181b regulan de forma positiva la expresión del factor de transcripción NFI-A, el cual es el responsable de bloquear la diferenciación mieloide y por lo tanto, generar la expansión de las MDSC (McClure C *et al.*, 2015; McPeak *et al.*, 2017).

Recientemente se evaluó el rol que ejerce durante la sepsis el microRNA-375, el cual es conocido como un microRNA multifuncional involucrado en varias funciones celulares y en el desarrollo de tumores (Wang L *et al.*, 2016; Xu L *et al.*, 2016). Este microRNA bloquea la vía JAK2 (del inglés: “Janus kinase 2”)/STAT3, de esta forma los niveles del microRNA-21 disminuyen, regulando negativamente la acumulación de MDSC durante la fase tardía de la sepsis (Sheng B *et al.*, 2017).

### 1.6.3. Señalización en modelos de infección por *S. aureus*

Existen escasas evidencias acerca de la forma en que el huésped o los productos bacterianos promueven la expansión y activación de las MDSC durante las infecciones por *S. aureus* (Heim CE<sup>1</sup> *et al.*, 2015). Utilizando un modelo experimental de infección en piel, se demostró que la producción local de IL-6 indujo el reclutamiento y la acumulación de MDSC provocando la supresión de la respuesta T (Skabytska Y *et al.*, 2014). En estudios realizados en un modelo de infección ósea por *S. aureus* se demostró que la IL-12 sería crítica para el reclutamiento de MDSC al sitio de infección (Heim CE<sup>2</sup> *et al.*, 2015). Sin embargo, se desconoce cuáles serían las señales necesarias para que las células mieloides inmaduras adquieran el fenotipo inmunosupresor (señal 2, Figura 2). Más aún, hasta el presente, no se han descrito cuales serían las señales que conducen al reclutamiento y activación de las MDSC durante la sepsis por *S. aureus*.



#### 1.6.4. Señalización inducida por TNF- $\alpha$

El TNF- $\alpha$  es una citoquina proinflamatoria, multifuncional e inmunomoduladora (Pfeffer K, 2003). Dicha citoquina se sintetiza como una molécula transmembrana (26-kDa) la cual, puede ser clivada y convertirse en una citoquina soluble (17-kDa) por acción de la metaloproteasa ADAM17 (del inglés: “a disintegrin and metalloproteinase domain 17”) o TACE (del inglés: “TNF converting enzyme”) (Moss ML *et al.*, 1997; Black RA *et al.*, 1997). Es así que existen dos formas biológicamente activas, el TNF- $\alpha$  transmembrana (tmTNF- $\alpha$ ) y el TNF- $\alpha$  soluble (sTNF- $\alpha$ ). El TNF- $\alpha$  puede ejercer su rol biológico al interactuar con dos receptores, el receptor de tipo 1 (TNFR1) y el receptor de tipo 2 (TNFR2) los cuales son preferencialmente activados por sTNF- $\alpha$  y tmTNF- $\alpha$ , respectivamente (Cabal-Hierro L *et al.*, 2012). Las dos formas del TNF- $\alpha$  desencadenan vías de señalización importantes para la proliferación y supervivencia celular y el desarrollo de la respuesta inmune (Yeh WC *et al.*, 1997; Kelliher MA *et al.*, 1998; Hehlgans T *et al.*, 2005; Vallabhapurapu S *et al.*, 2009). La señalización por TNFR1 conduce a la activación y transcripción de genes que median la inflamación. A su vez, por medio de la activación de este receptor puede desencadenarse la activación de las caspasas con la consecuente inducción de apoptosis. El TNFR2 participa principalmente en la activación de señales proinflamatorias mediadas por NF- $\kappa$ B, JNK, p38, ERK y PI3K. Considerando el solapamiento entre las vías de señalización inducidas por ambos receptores, aún no está completamente claro, si el impacto del TNF- $\alpha$  sobre el huésped depende de un equilibrio entre la capacidad de TNFR1 y TNFR2 de inducir apoptosis o la supervivencia celular, en distintos tipos de células o en diversos ambientes inflamatorios (Zhao X *et al.*, 2012).

Existen evidencias crecientes sobre el rol de TNF- $\alpha$  en la acumulación y funcionalidad de las MDSC en modelos tumorales. La activación de las MDSC a través del tm-TNF- $\alpha$  podría incrementar la actividad supresora de dichas células, dado que se observó la regulación positiva de la expresión de iNOS de forma dependiente de la activación NF- $\kappa$ B y MAPKs. A su vez, dicha interacción promovió la supervivencia de las MDSC al inhibir la actividad de la caspasa-8 (Zhao X *et al.*, 2012; Hu X *et al.*, 2014). Utilizando un modelo murino de inflamación crónica inducida con antígenos de micobacterias, se determinó que el TNF- $\alpha$  juega un rol clave en la inducción del ambiente inmunosupresor dado que induce la acumulación de MDSC mediante el bloqueo de la maduración de las células mieloides inmaduras y promueve su actividad supresora modulando entre otros factores la expresión de arginasa y óxido nítrico sintasa (Sade-Feldman M *et al.*, 2013). Asimismo, se demostró en un modelo de infección

polimicrobiana que el TNF- $\alpha$  a través de su interacción con el TNFR2 induce la expansión y activación de MDSC de tipo monocítico (Poltz *et al.*, 2014).

Las infecciones por *S. aureus* se caracterizan por generar una fuerte respuesta inflamatoria la cual es necesaria para la erradicación del patógeno, pero puede presentar consecuencias deletéreas para el hospedador contribuyendo significativamente a la patogénesis de la enfermedad (Fournier B *et al.*, 2005). Entre las citoquinas proinflamatorias que se inducen, el TNF- $\alpha$  es una de las principales citoquinas que participa en la erradicación de la bacteria (Cohen J *et al.*, 1999; Nakane A *et al.*, 1995). Durante la fase inflamatoria la vía TNF- $\alpha$ -TNFR1 activa la cascada de señalización de NF- $\kappa$ B, la cual regula de forma positiva a otras citoquinas de gran importancia como IL-1 $\beta$  e IL-6, y al mismo TNF- $\alpha$ . Más aún, nuestro grupo de trabajo ha demostrado que *S. aureus* a través de la proteína A mimetiza la acción de TNF- $\alpha$  en diferentes tipos celulares induciendo la producción de citoquinas proinflamatorias (Gómez MI *et al.*, 2004; Giai C *et al.*, 2013).

Los eventos que conducen a la inmunosupresión asociada a la sepsis por *S. aureus* no han sido al presente completamente elucidados. En este contexto, el rol que el TNF- $\alpha$  y la señalización por TNFR1 pudieran tener en la acumulación y funcionalidad de las MDSC presentes durante la sepsis por *S. aureus* se desconoce.

## *2. Hipótesis y objetivos de la investigación*

### 2.1. Hipótesis

Durante la sepsis por *S. aureus* se produciría la expansión y posterior acumulación de MDSC en órganos linfoides periféricos lo cual podría contribuir a la disminución de la respuesta T durante la fase de inmunosupresión. Este proceso estaría modulado por la señalización inducida por TNF- $\alpha$  vía TNFR1 que podría participar en la expansión y/o adquisición del fenotipo inmunosupresor de las MDSC.

### 2.2. Objetivos de la investigación

A fin de demostrar la hipótesis propuesta, el objetivo general del presente trabajo de investigación fue establecer el rol de las MDSC en la fase de inmunosupresión de la sepsis por *S. aureus* y la participación que la señalización mediada por TNF- $\alpha$  vía TNFR1 podría tener en dicho proceso. Para ello se propusieron los siguientes objetivos específicos que fueron desarrollados mediante ensayos *in vitro* y estudios *in vivo*.

**Objetivo 1:** Establecer si durante la sepsis por *S. aureus* de origen peritoneal se produce la expansión y acumulación de MDSC.

- a. Se evaluó el número de precursores inmaduros en médula ósea y la acumulación de MDSC en bazo y ganglios linfáticos.
- b. Se realizó la caracterización fenotípica de las MDSC presentes en bazo.
- c. Se realizó la caracterización funcional de las MDSC provenientes de médula ósea y de bazo mediante la determinación de su capacidad inhibitoria sobre la proliferación de células T.

**Objetivo 2:** Determinar la contribución relativa de las MDSC en la anergia de las células T durante la sepsis por *S. aureus*.

Se estableció el impacto de la depleción farmacológica de MDSC en la capacidad proliferativa de células T y la evolución de la sepsis por *S. aureus*.

**Objetivo 3:** Determinar el rol del receptor de TNF- $\alpha$  de tipo I en los procesos de expansión y acumulación de MDSC, así como en la adquisición del fenotipo supresor de las MDSC durante la sepsis por *S. aureus*.

Mediante el uso de ratones *tnfr1*<sup>-/-</sup>, se evaluó la participación de la señalización a través de TNFR1 en:

## HIPÓTESIS Y OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

---

- a. La funcionalidad de las células T durante la sepsis por *S. aureus*.
- b. El incremento de precursores inmaduros en médula ósea y acumulación de MDSC en bazo y ganglios linfáticos periféricos.
- c. El fenotipo y la funcionalidad de las MDSC acumuladas en bazo.

### *3. Materiales y métodos*

### 3.1. Soluciones y reactivos

- PBS (10X): 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1,8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.4.
- Buffer TBE 5X: Tris-Borato 0.45 M, EDTA 0.01 M, pH 8.
- Buffer de tinción para citometría de flujo: PBS, 2% suero fetal bovino.
- Buffer para purificación de MDSC (MACS): PBS, 2 mM EDTA, 0,5% suero fetal bovino.
- Buffer de lisis de eritrocitos 10X: Agua destilada, 1,5 M NH<sub>4</sub>Cl, 10 mM KHCO<sub>3</sub>, 1 mM EDTA, pH 7.2-7.4. Para preparar una solución de trabajo 1X, diluir en agua destilada.
- Buffer lisis de eritrocitos para células de médula ósea: 0,5 M NH<sub>4</sub>Cl.
- Buffer de permeabilización: PBS, 0,5% saponina, 10% suero fetal bovino.
- Buffer de anexina (10X): Agua destilada, 0,1 M HEPES/NaOH (pH 7.4), 1,4 M NaCl, 25 mM CaCl<sub>2</sub>. Para preparar una solución de trabajo 1X, diluir en agua destilada.
- Buffer de captura para ELISA: 0,1 M NaCO<sub>3</sub> pH 9.5 (ELISA de IL-6, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ); 0,2 M Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> pH 6.5 (ELISA de IL-10).
- Buffer de lavado para ELISA: PBS, 0,05% Tween 20.
- Buffer de bloqueo para ELISA: PBS, 10% suero fetal bovino.
- Buffer citrato/acetato para ELISA: 0,1 M de acetato de sodio, 0,1M de ácido cítrico, pH 6.0.
- Sustrato de revelado para ELISA: 3,3', 5,5'-tetrametilbencidina (TMB) y peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).
- Solución de corte de reacción para ELISA: 2 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.
- Solución Fisiológica (SF): 0,9% NaCl.
- Medio completo para linfocitos: RPMI sin HEPES, 200 mM glutamina, 40 mg/ml gentamicina, 50 mM  $\beta$ -mercaptoetanol, 10% suero fetal bovino.

### 3.2. Cepas bacterianas

La cepa *S. aureus* FRP3757 (pulsotipo USA300, spa tipo t008) fue gentilmente cedida por la Dra. Alice Prince (Columbia University, New York, USA). La cepa de *S. aureus* Sa30 (ST30, SCCmec type IVc-spa type 019, PVL positivo) fue gentilmente cedida por la Dra. Marta Mollerach (Cátedra de Microbiología. Departamento de Microbiología, Inmunología y Biotecnología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires). Las bacterias fueron crecidas en caldo tripteína de soja a 37°C durante 16 horas. Para los experimentos *in vivo*, los cultivos iniciales fueron diluidos en 15 ml de caldo TSB a una densidad óptica a 600 nm (DO<sub>600</sub>) de 0,05 y se cultivaron a

37°C con agitación hasta una  $DO_{600}=0,8$ . Posteriormente, los cultivos fueron centrifugados durante 10 minutos a 10.000 rpm, se lavaron una vez con PBS y luego las bacterias fueron resuspendidas en el mismo volumen de PBS para obtener un inóculo de  $2-4 \times 10^8$  UFC/ml. Los hemocultivos se realizaron inoculando 1 ml de caldo BHI con 20  $\mu$ l de sangre. Los caldos se crecieron durante 48 horas, a 37°C con agitación. Se tomó una alícuota para ser sembrada en agar manitol salado para la realización del recuento bacteriológico.

### 3.3. Ratones

Los ratones C57BL6 salvajes y deficientes en TNFR1 (*tnfr1*<sup>-/-</sup>) fueron criados en el bioterio del Instituto de Microbiología y Parasitología Médica de la Facultad de Medicina (IMPAM, UBA-CONICET). Los animales se mantuvieron en grupos de 4-6 por jaula, recibieron la dieta habitual del bioterio (alimento balanceado) y se respetaron los ciclos de luz y de oscuridad. En todos los experimentos, la dieta y el agua fueron administradas *ad libitum*. El cuidado de los animales se llevo a cabo según normas institucionales y el diseño experimental fue revisado y aprobado por el Comité Institucional para el Cuidado de Animales de Laboratorio (Resoluciones: 2737/14 y 2865/15).

#### 3.3.1. Modelo murino de infección

Se estableció un modelo de sepsis subletal a partir de un foco infeccioso peritoneal por *S. aureus*. Dicho modelo fue utilizado para evaluar la capacidad de *S. aureus* de inducir la proliferación y activación de las MDSC en la fase de inmunosupresión característica de la etapa tardía de la sepsis. Se utilizaron ratones C57BL/6 salvajes y deficientes en la expresión de TNFR1 (*tnfr1*<sup>-/-</sup>) de 6 semanas de edad, con un peso de entre 18 y 20 gramos. Los animales fueron inoculados por ruta intraperitoneal con  $4-8 \times 10^7$  UFC de *S. aureus*. Los ratones utilizados como control negativo fueron inoculados por ruta intraperitoneal con 200  $\mu$ l de PBS. Las muestras de sangre para la obtención de plasma y para hemocultivos se obtuvieron a partir de la vena mandibular previo a la inoculación y a las 4 y 24 horas, 4, 8 y 14 días luego de la misma. A los 4, 8 y 14 días posteriores al desafío con *S. aureus* los animales fueron sacrificados. Se obtuvieron suspensiones celulares de médula ósea y a partir de homogenato de bazo y ganglios inguinales para la caracterización de poblaciones celulares por citometría de flujo, la purificación de células Gr1<sup>+</sup> con perlas magnéticas y la realización de ensayos de proliferación celular. Paralelamente, alícuotas de homogenatos de bazo, hígado, riñón y



pulmón fueron utilizadas para realizar recuentos bacteriológicos en placas de medio agar tripteína de soja (TSA).

### **3.3.1.1. Obtención de células de médula ósea**

Los animales fueron sacrificados y se realizó la extracción de fémur y tibia para la obtención de células a partir de médula ósea. Las células fueron eluidas mediante el lavado del canal medular con PBS y posteriormente centrifugadas durante 10 minutos a 1.500 rpm. El sobrenadante se descartó y el sedimento celular se lo trató con 1 ml de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  0,5 M para lisar los glóbulos rojos. Inmediatamente después se le agregaron 5 ml de PBS. Las células se centrifugaron nuevamente durante 10 minutos a 1.500 rpm, se descartó el sobrenadante y las células se resuspendieron en PBS para su posterior análisis por citometría de flujo (Sección 3.4.1.) o para la purificación de células  $\text{Gr1}^+$  (Sección 3.5.1.).

### **3.3.1.2. Obtención de suspensiones celulares de bazo**

Luego del sacrificio de los animales se realizó la extracción del bazo. Se registró el peso del órgano y el mismo se disgregó de forma mecánica, utilizando una malla metálica. Se determinaron las UFC (unidades formadoras de colonias) presentes en el bazo mediante la siembra en placas de TSA y el posterior recuento bacteriológico. La suspensión celular se centrifugó a 2.000 rpm por 5 minutos y el sobrenadante fue extraído y guardado a  $-20^\circ\text{C}$  para la cuantificación de citoquinas por ELISA. El sedimento celular se utilizó en los diferentes ensayos que se describen a lo largo de esta sección.

### **3.3.1.3. Obtención de suspensiones celulares de ganglios inguinales**

Luego del sacrificio de los animales se realizó la extracción de los ganglios inguinales. Los mismos se disgregaron de forma mecánica, utilizando una malla metálica. La suspensión celular se centrifugó a 2.000 rpm por 5 minutos y el sedimento celular se utilizó para su posterior análisis por citometría de flujo (Sección 3.4.1.).

### **3.3.2. Depleción de MDSC *in vivo***

Para la depleción farmacológica de MDSC, los ratones fueron inoculados con 5-fluorouracilo (5FU, 50 mg/kg) por ruta intraperitoneal al día 4 luego del desafío con *S. aureus*, como se describió previamente (Vincent J *et al.*, 2010).

### **3.4. Citometría de flujo**

#### **3.4.1. Inmunomarcación de moléculas de la superficie celular**

Para la identificación de las células presentes en médula ósea, bazo y ganglios inguinales se realizó la tinción de antígenos de superficie y posterior análisis por citometría de flujo. Las suspensiones celulares provenientes de bazo y ganglios inguinales se centrifugaron durante 5 minutos a 2.000 rpm a 4°C, se resuspendieron en 1 ml de buffer de lisis para eritrocitos y se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente. Luego de centrifugar las células durante 5 minutos a 2.000 rpm a 4°C y lavar el sedimento con 1 ml de PBS, se continuó con el protocolo de tinción de antígenos de superficie:

1. Luego de lavar el sedimento celular con 1 ml de PBS, se resuspendieron en 50 µl de buffer de tinción y se agregaron 5 µl de suero normal de ratón (SNR) para bloquear los receptores para Fc. Se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente.
2. Se agregaron los anticuerpos fluorescentes y se incubaron en oscuridad a 4°C por 30 minutos (Tabla 1).
3. Se agregó a continuación 1 ml de buffer de tinción frío y se centrifugó durante 5 minutos a 2.000 rpm a 4°C. Se realizó un segundo lavado con buffer de tinción.
4. Finalmente las células se resuspendieron en PBS y se adicionó un volumen igual de paraformaldehído al 2% en PBS.
5. Las muestras se conservaron en oscuridad a 4°C hasta su análisis por citometría de flujo.

La marcación específica para la detección de MDSC presentes en médula ósea, bazo y ganglios inguinales se realizó mediante la utilización de los anticuerpos anti-CD11b y anti-Gr1. Se calculó el porcentaje de MDSC respecto del total de células presentes en cada órgano evaluado, así como también el número total de MDSC presentes en el bazo.

En las suspensiones provenientes de bazo se realizó la marcación específica para determinar la distribución de las MDSC en las dos subpoblaciones descritas, de tipo granulocítico y monocítico. Para ello se utilizaron los anticuerpos anti-CD11b, anti-Ly6C y anti-Ly6G. En este caso, se calculó el porcentaje de cada población respecto al total de células CD11b<sup>+</sup> para cada animal. En dichas suspensiones celulares se determinó además la presencia de las distintas poblaciones de linfocitos T utilizando los anticuerpos anti-CD3, anti-CD4 y anti-CD8. Se calculó el porcentaje de cada población de linfocitos T

respecto al total de células CD3<sup>+</sup> para cada animal. Asimismo, se determinó el porcentaje de células T regulatorias presentes en bazo, utilizando los anticuerpos anti-CD4, anti-CD25 y anti-Foxp3 (previa permeabilización de las células, el procedimiento se explica en la sección 3.4.3.) para cada animal.

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

Anticuerpo	Clon	Conjugado	Fabricante	Cant.* (µg)
CD11b	M1/70	PE	Biolegend	0,2
Gr-1	RB6-8C5	Alexa-488	Biolegend	0,25
Gr-1	RB6-8C5	PECy7	Biolegend	0,25
Ly6C	HK1.4	APC	Biolegend	0,2
Ly6G	1A8	PECy7	Biolegend	0,2
CD3ε	145-2C11	FITC	Ligatis	1
CD4	GK1.5	PE	Ligatis	0,2
CD8	53-6.7	APC	Biolegend	0,2
CD4	-	FITC	Kit detección de T reg.	10 µl
CD25	-	PE	Miltenyi Biotec	10 µl

\* Cantidades empleadas en la inmunomarcación de  $1 \times 10^6$  células. FITC (isotiocianato de fluoresceína), PE (ficoeritrina), APC (Alofocianina), PECy7 (Ficoeritrina-Cianina7).

### 3.4.2. Apoptosis

A fin de evaluar la apoptosis de linfocitos provenientes de bazo se utilizó anexina-V además de los anticuerpos anti-CD4 y anti-CD8. En este caso, se calculó el porcentaje de células apoptóticas respecto del total de células T CD4 o T CD8<sup>+</sup> para cada animal.

En una primera instancia, se realizó la marcación de las células de bazo utilizando los anticuerpos anti-CD4 y anti-CD8 (hasta el paso 3 de la sección 3.4.1.). Posteriormente, para la marcación con anexina-V se procedió de la siguiente forma:

1. Las células se resuspendieron en 100 µl de Buffer anexina 1X.
2. Luego, se agregó 5 µl de anexina-V.
3. Durante 15 minutos se realizó la incubación en oscuridad y a T° ambiente. Posteriormente, se realizó el análisis por citometría de flujo.

**3.4.3. Detección de arginasa, óxido nítrico sintasa y Foxp3**

La detección de las enzimas arginasa y óxido nítrico sintasa en células CD11b<sup>+</sup>Gr1<sup>+</sup> purificadas (Sección 3.5.1.) a partir de células de bazo de ratones infectados se realizó por inmunomarcación intracelular seguida de citometría de flujo. Las suspensiones celulares fueron tratadas con monensina (una molécula ionófera, que altera la estructura del aparato de Golgi e impide el transporte vesicular en células eucariotas, a fin de permitir la acumulación intracelular de las proteínas a medir) a una concentración de 2  $\mu$ M en medio completo para linfocitos durante 5 h a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>.

Para la identificación de células T regulatorias, en primer lugar se realizó la marcación de antígenos de superficie (Sección 3.4.1.). Posteriormente, la detección de Foxp3 se realizó por inmunomarcación intracelular seguida de citometría de flujo.

1. Primero se realizó la marcación de antígenos de superficie (como se describió en la sección 3.4.1.) utilizando anticuerpos anti-CD11b y anti-Gr1, para la detección de Arg1 e iNOS. En el caso de las células T reg, se realizó la marcación de superficie utilizando los anticuerpos anti-CD4 y anti-CD25.
2. Luego, las células fueron lavadas con 1 ml de PBS y se procedió a centrifugar durante 5 minutos a 2.000 rpm.
3. Se descartó el sobrenadante y el sedimento celular se resuspendió en el PBS remanente. Se agregó gota a gota 150  $\mu$ L de paraformaldehído al 4% y se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente.
4. Luego se completó con PBS hasta un volumen final de 1 ml y se centrifugó a 2.000 rpm durante 5 minutos.
5. Las células fueron lavadas con 1 ml de PBS. En este punto las células pueden guardarse a 4°C hasta el día siguiente o continuar el protocolo.
6. Se realizaron 2 lavados con 1,5 ml de buffer de permeabilización.
7. Las células fueron resuspendidas en 50  $\mu$ l de buffer de permeabilización conteniendo el anticuerpo (anti-Arg1 o anti-iNOS (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) o anti-Foxp3-APC (Kit detección de T reg. Miltenyi Biotec)) e incubadas durante 30 minutos (para Foxp3) o 1 hora (para Arg e iNOS) a 4°C en oscuridad.  
Sólo en el caso de la detección de Arg e iNOS, se realizaron los pasos 8 y 9:
8. Las células se lavaron con 1,5 ml de buffer de permeabilización.
9. Las células fueron resuspendidas en 50  $\mu$ l de buffer de permeabilización conteniendo el anticuerpo anti-IgG-Alexa488 de conejo (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA) en una dilución 1:200. Las células fueron incubadas durante 30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad.

10. Se realizaron dos lavados con 1,5 ml de buffer de permeabilización.
11. Luego se realizaron dos lavados con 1,5 ml de buffer de tinción para citometría.
12. Las células fueron resuspendidas en 200  $\mu$ l de PBS.
13. Posterior análisis por citometría de flujo.

### 3.4.4. Condiciones de adquisición de eventos celulares por citometría de flujo

Las muestras fueron adquiridas en un citómetro FACSAria (BD Biosciences) del Instituto de Genética, Inmunología y Metabolismo ubicado en el Hospital de Clínicas José de San Martín o en un citómetro FACSCanto (BD Biosciences) de la Universidad Maimónides. Para la calibración de los voltajes del citómetro se utilizaron células provenientes de bazo marcadas con anticuerpos dirigidos contra antígenos expresados en forma constitutiva por las mismas y conjugados a los fluorocromos utilizados en cada caso.

Los datos fueron analizados con el programa Cyflogic. Los resultados del análisis de citometría de flujo fueron expresados como la intensidad de fluorescencia media (IFM marca específica – IFM marca inespecífica) en caso de expresar los cambios en la densidad de moléculas en la superficie celular, o como el porcentaje de células que resultaron positivas para el marcador de superficie evaluado.

## 3.5. Cultivos celulares

### 3.5.1. Purificación de MDSC por selección inmunomagnética

Se purificaron las células Gr1<sup>+</sup> a partir de células de bazo y médula ósea obtenidas de ratones inoculados con *S. aureus* utilizando anticuerpo anti-Gr1, perlas y columnas magnéticas (Kit de purificación de MDSC murinas, Miltenyi Biotec). La viabilidad de las células purificadas se analizó por azul tripán. El protocolo empleado fue el recomendado por el fabricante:

1. Una vez determinado el número de células en las suspensiones celulares, se centrifugaron  $7 \times 10^7$ - $10^8$  células (dependiendo de cada animal) durante 10 minutos a 1.500 rpm. Luego se aspiró completamente el sobrenadante.
2. El pellet fue resuspendido en 350  $\mu$ l de buffer MACS.
3. Se agregó 50  $\mu$ l de reactivo de bloqueo del receptor para Fc y se incubó durante 10 minutos en hielo.

4. Luego se agregaron 100  $\mu$ l del anticuerpo anti-Gr1 biotinilado y se incubó durante 10 minutos en hielo.
5. Las células fueron lavadas agregando 5 ml de buffer MACS y se centrifugaron durante 10 minutos a 1.500 rpm. El sobrenadante fue aspirado.
6. Las células se resuspendieron en 900  $\mu$ l de buffer MACS
7. Luego se agregaron 100  $\mu$ l de perlas magnéticas unidas a estreptavidina y se incubó durante 15 minutos en hielo.
8. Las células se lavaron agregando 10 ml de buffer MACS y se centrifugaron durante 10 minutos a 1.500 rpm. El sobrenadante fue aspirado.
9. Las células fueron resuspendidas en 500  $\mu$ l de buffer MACS.
10. Se procedió a colocar la columna LS en el imán, el cual luego se colocó sobre el soporte. Las células a purificar se colocaron en la columna. Se procedió a lavar la columna utilizando 3 ml de buffer MACS, este procedimiento se repitió 3 veces. Luego la columna se retiró del imán y las células se eluyeron utilizando 5 ml de buffer MACS. Para aumentar la pureza de la muestra el paso 10 se repitió usando una nueva columna.
11. Se realizó el recuento de las células retenidas.
12. Se tomó una alícuota para analizar la pureza de la muestra por citometría de flujo.
13. Las células Gr1<sup>+</sup> purificadas fueron utilizadas en los ensayos de funcionalidad de las MDSC, donde se evaluó su función supresora sobre la proliferación de las células T (Sección 3.5.2.2.).

### **3.5.2. Ensayos de proliferación celular**

#### **3.5.2.1. Funcionalidad de los linfocitos T**

Las suspensiones celulares provenientes de bazo de ratones inoculados con *S. aureus* o con PBS (control) se centrifugaron durante 5 minutos a 2.000 rpm a 4°C, se resuspendieron en 1 ml de buffer de lisis para eritrocitos y se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente. Luego de centrifugar las células durante 5 minutos a 2.000 rpm a 4°C y lavar el sedimento con 1 ml de PBS, se determinó la concentración celular de la suspensión y se procedió a realizar la marcación con CFDA-SE (succinimidil éster diacetato de carboxifluoresceína, conocido como CFSE) según el protocolo recomendado por el fabricante (Biolegend). El CFDA-SE es un colorante permeable a las células. Los grupos acetato son escindidos mediante las esterasas intracelulares para formar un producto denominado CFSE, el cual produce una fluorescencia detectable. El CFSE queda retenido dentro de la célula y se acopla covalentemente a moléculas intracelulares a través de su grupo succinimidilo. Los niveles de colorante permanecen

relativamente estables en las células que no se dividen. Si una célula teñida se divide, el tinte se divide por igual entre las dos células hijas. La fluorescencia se detecta típicamente en el detector FL1 del citómetro de flujo, y cada pico fluorescente resultante representa una ronda de división celular.

Una alícuota de células sin marcar fue reservada para realizar los controles de calibración del citómetro.

1. Se realizó la marcación de  $4 \times 10^6$  células resuspendidas en 200  $\mu$ l de PBS mediante el agregado de 200  $\mu$ l de CFSE 5  $\mu$ M.
2. Las células fueron incubadas a 37° C en atmósfera de CO<sub>2</sub> durante 10 minutos.
3. Luego, se agregó 10 ml de RPMI 2% SFB.
4. Las células se centrifugaron durante 5 minutos a 2.000 rpm.
5. El sobrenadante se descartó y se agregó 5 ml de RPMI 2% SFB.
6. Las células se centrifugaron durante 5 minutos a 2.000 rpm.
7. Las células fueron resuspendidas en 2 ml de medio completo para linfocitos para obtener una concentración de  $2 \times 10^6$  células/ml.
8. Se colocaron 100  $\mu$ l de células por well en placas de 96 wells fondo en "U" ( $2 \times 10^5$  células/well).
9. Las células provenientes de cada animal fueron cultivadas adicionando 100  $\mu$ l de medio completo para linfocitos o 100  $\mu$ l de medio conteniendo ConA (Concanavalina A, 5  $\mu$ g/ml) por 72 horas a 37°C y en atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>.
10. A las 72 horas, la placa se centrifugó durante 5 minutos a 2.000 rpm y los sobrenadantes fueron guardados a -20°C para la detección de citoquinas mediante ELISA.
11. Las células fueron marcadas con anticuerpos anti-CD4 y anti-CD8 utilizando el protocolo marcación de antígenos de superficie y citometría de flujo antes descrito (Sección 3.4.1.).
12. Para cuantificar la proliferación de las poblaciones de linfocitos T se determinó la intensidad de fluorescencia en el canal FL1 (para la detección de CFSE) en células T CD4 y T CD8. Se utilizó como control positivo esplenocitos provenientes de ratones inoculados con PBS estimulados con ConA y como control negativo esplenocitos provenientes de ratones inoculados con PBS cultivados en presencia de medio sin estímulos.

### **3.5.2.2. Ensayos de funcionalidad de MDSC**

Esplenocitos de ratón vírgenes fueron co-cultivados con MDSC purificadas (Sección 3.5.1.) de modo de obtener diferentes proporciones de células T:MDSC (1:0, 1:10, 1:20). Los esplenocitos fueron marcados con CFSE utilizando el protocolo detallado anteriormente (Sección 3.5.2.1.) previo al cultivo. Los cultivos se estimularon con ConA y a las 72 horas las células fueron colectadas y marcadas con anticuerpos anti-CD4 y anti-CD8 utilizando el protocolo marcación de antígenos de superficie y citometría de flujo antes descrito (Sección 3.4.1.). Para cuantificar la proliferación de las poblaciones de linfocitos T se determinó la intensidad de fluorescencia en el canal FL1 (para la detección de CFSE) en células T CD4 y T CD8 en respuesta a la estimulación con ConA. Se utilizó como control positivo esplenocitos vírgenes estimulados con ConA en ausencia de MDSC y como control negativo esplenocitos vírgenes cultivados en presencia de medio sin estímulos. Los sobrenadantes de los co-cultivos fueron recolectados y guardados a -20°C para la detección de citoquinas por ELISA.

### **3.6. Cuantificación relativa de ARNm**

Para cuantificar los niveles de ARNm se realizaron las extracciones de ARN total de las muestras de interés, se llevaron a cabo las reacciones de retro-transcripción (RT) y finalmente la PCR en tiempo real.

#### **3.6.1. Extracción y cuantificación de ARN total**

Se siguió el protocolo de extracción de ARN del reactivo TRIzol (Invitrogen). Este reactivo contiene una solución monofásica de fenol y tiocianato de guanidina que permiten la ruptura celular, la disgregación de los componentes celulares y la protección del ARN para evitar su degradación.

1. Se lisaron las células con el reactivo TRIzol pasando las suspensiones celulares varias veces a través la pipeta.
2. Las muestras se incubaron 5 minutos a temperatura ambiente, para completar la disgregación.
3. Se agregó 0.2 ml de cloroformo por 1ml TRIzol utilizado inicialmente.
4. Los tubos se agitaron vigorosamente por 15 segundos y se incubaron 3 minutos a temperatura ambiente.
5. Se centrifugaron durante 15 minutos a 12.000 x g a 4°C, para permitir la separación de la fase orgánica-interfase, de la fase acuosa conteniendo el ARN.



6. La fase acuosa se transfirió a un tubo eppendorf estéril (se recuperó aproximadamente 60% del volumen de TRIzol utilizado inicialmente).
7. Se precipitó el ARN con 0,5 ml alcohol isopropílico por 1ml TRIzol utilizado inicialmente y se mezcló por inversión, hasta obtener una única fase.
8. Se incubaron las muestras durante toda la noche a -20°C.
9. Se centrifugaron las muestras durante 10 minutos a 12.000 x g a 4°C.
10. Se lavó el sedimento celular con 1 ml de etanol 75% por 1ml TRIzol utilizado inicialmente.
11. Se centrifugó durante 5 minutos a 7500 x g a 4°C.
12. Los sedimentos de ARN se dejaron secar a temperatura ambiente el tiempo necesario.
13. A continuación el ARN se resuspendió en 15 µl de agua libre de ARNasa y se incubó 10 minutos a 60°C para favorecer la solubilidad en agua. Se homogeneizaron las muestras pasándolas a través de la pipeta varias veces.
14. Se agregó la cantidad necesaria de buffer 10X para ADNasa, de agua libre de ARNasa y 1 unidad de ADNasa (Promega) por 1 µg de RNA tratado y se incubó 30 minutos a 37°C.
15. Finalmente se agregó la cantidad necesaria de solución Stop (Promega) y se incubó 10 minutos a 65°C.
16. Se cuantificó el ARN total obtenido midiendo la absorbancia a 260 nm (ácidos nucleicos). A fin de determinar el grado de pureza, se midió la absorbancia a 280 nm (proteínas). Se consideró que la purificación fue óptima si la relación  $Abs_{260nm}/Abs_{280nm}$  resultó entre 1.8 y 2. La concentración de ARN en las muestras se determinó mediante la siguiente relación:  $Abs_{260nm}=1$  equivale a 40 µg/ml de ARN.

### 3.6.2. Preparación de ADNc a partir del ARN total

Las reacciones de retrotranscripción (RT) se realizaron a partir de 1µg de ARN utilizando la enzima RT (M-MLV reverse Transcriptase, Promega) y hexámeros de primers. La reacción consiste de dos etapas:

**Etapa 1 (RT1):** unión de los cebadores al templado. Se utilizan 2 µl de la solución de *random primers* (hexámeros de secuencias aleatorias) a 0,25ug/ml; 1 µg de ARN y la cantidad de agua libre de ARNasas para completar 16,4 µl. Esta mezcla se incubó a 70°C durante 5 minutos y se conservó en hielo por 5 minutos.

**Etapa 2 (RT2):** se preparó una pre-mezcla de los reactivos componentes de la reacción (ver tabla 2) y a 8,6 µl de la misma se le agregaron los 16,4 µl de la reacción RT1: Y se procedió con el siguiente programa:

1. 37° C, 60 minutos.
2. 10°C, hold.

**Tabla 2:** Reactivos y volúmenes necesarios para la RT etapa 2.

El volumen final luego de agregar la pre-mezcla al RNA será de 25 µl.

Concentración Inicial	Volumen necesario (µl)
5X Buffer	5
10mM dNTPs	2,5
ARNsin 25 U	0,6
RT 100 U	0,5
<b>Volumen final: 8,6µl</b>	

Los ADNc obtenidos fueron testeados mediante PCR del gen GAPDH de ratón (Tabla 3 y 4). Se utilizó 2 µl de ADNc de una dilución 1:10 por reacción y agua como control negativo.

**Tabla 3:** Reactivos y volúmenes necesarios para la PCR de GAPDH de ratón

Mezcla para la PCR de GAPDH	
Concentración Inicial	Concentración Final
Agua	
5X PCR Buffer	1X
10mM dNTPs	0,5 mM
25 µM Cebador GAPDH Fw	0,25 µM
25 µM Cebador GAPDH Rev	0,25 µM
Go Taq 5U/ µl	1U
<b>Volumen final 18µl</b>	

**Tabla 4:** Programa utilizado para la realización de la PCR GAPDH en el termociclador.

Las etapas 2 a 5 se repiten por 35 ciclos.

Programa GAPDH		
Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo
1	95	5 minutos. Desnaturalización inicial del ADN
2	95	30 segundos. Desnaturalización del ADN
3	57	45 segundos. Unión de los cebadores
4	72	45 segundos. Síntesis de ADN
5	72	10 minutos. Elongación de cadenas de ADN
6	4	Mantenimiento

Alícuotas de cada reacción de PCR (10µl) fueron analizadas en un gel de agarosa al 2% en TBE conteniendo 0.3 µl de bromuro de etidio (10 mg/ml). La corrida se realizó en buffer TBE a 80-90 V. Se corrió en paralelo el marcador de peso molecular “100 pb ladder” que permitió determinar el tamaño de cada fragmento amplificado. Tamaño del producto esperado para GAPDH: 473 pb (utilizando los cebadores indicados en la Tabla 8).

### 3.6.3. PCR de tiempo real

La PCR de tiempo real permite visualizar el progreso de la reacción y al mismo tiempo cuantificar el producto de amplificación debido a que en la mezcla de reacción se encuentra incluido el reactivo EvaGreen® que es capaz de fluorecer cuando se une a ADN doble cadena. La fluorescencia se incrementa en cada ciclo debido a que se acumula el producto de amplificación de PCR. Durante la reacción se determina el número de ciclo al cual se incrementa la fluorescencia en forma exponencial. El punto en la curva al cual la fluorescencia cruza el umbral se lo denomina CT y este valor se comporta inversamente proporcional a la concentración de ARNm en la muestra. Para corroborar que la amplificación fue específica, se realiza una curva de disociación, donde cada par de cebadores y cada producto de amplificación, posee un valor particular de temperatura de disociación (Td). Esta curva permite visualizar dímeros de cebadores, los cuales presentaran un Td menor al producto de amplificación esperado ya que son fragmentos de menor cantidad de pares de bases, así como también se pueden visualizar fragmentos de ADN contaminantes.

Para los genes a analizar se realizó una curva de calibración utilizando como templado ADN genómico. Se realizaron diluciones seriadas del ADN al décimo, partiendo de una concentración máxima de 150 ng/µl hasta una dilución 1/10000 equivalente a

15 pg/μl. Se realizó la reacción de PCR de tiempo real, utilizando 2 μl de ADN genómico o las diluciones en 18 μl de mezcla. Se graficó en escala logarítmica el valor de CT promedio obtenido para cada dilución en función de la dilución, obteniéndose una recta que permite extrapolar a partir del valor de CT la masa relativa de este gen en cada muestra.

A continuación se muestran los reactivos y volúmenes necesarios (Tabla 5) y el programa de corrida para la realización de la PCR de tiempo real de GAPDH, arginasa e iNOS (Tablas 6 y 7).

**Tabla 5:** Reactivos y volúmenes necesarios para la PCR de tiempo real de GAPDH, arginasa e iNOS.

<b>Mezcla para la PCR de tiempo real</b>	
<b>Concentración Inicial</b>	<b>Concentración final</b>
Agua	
5X Mezcla de PCR de tiempo real	1X
25 μM Cebador Fw	0,25 μM
25 μM Cebador Rev	0,25 μM
<b>Volumen final 18μl</b>	

**Tabla 6:** Programa utilizado para la realización de la PCR de tiempo real para los genes evaluados. Las etapas 2 a 4 se repiten por 40 ciclos.

<b>Programa de PCR de tiempo real</b>		
<b>Etapas</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Tiempo</b>
1	95	15 minutos. Desnaturalización inicial del ADN
2	95	15 segundos. Desnaturalización del ADN
3	Tu correspondiente	30 segundos. Unión de los cebadores
4	72	60 segundos. Síntesis de ADN, al final de este tiempo se mide la fluorescencia

**Tabla 7:** Temperaturas de unión (Tu) utilizadas para la PCR de tiempo real para los distintos genes medidos

Cebadores	Tu(°C)
GAPDH	57
Arginasa	57
iNOS	60

Para cada muestra se calculó el CT promedio obtenido en la PCR de tiempo real para GAPDH y se extrapoloó este valor en su correspondiente curva de calibración, obteniéndose la masa relativa promedio de este gen. Para determinar los niveles de ARNm de arginasa e iNOS se calculó la masa relativa en función del CT obtenido en cada muestra y luego se relativizó cada una a su correspondiente valor de masa relativa promedio de GAPDH (arginasa/GAPDH, iNOS /GAPDH).

**Tabla 8:** Secuencia de cebadores utilizados para PCR y PCR de tiempo real

Gen	Secuencia del cebador
GAPDH	<b>Fw:</b> 5´ - AAC TTT GGC ATT GTG GAA GGG CTC - 3´
	<b>Rev:</b> 5´ - ACC CTG TTG CTG TAG CCG TAT TCA - 3´
Arginasa	<b>Fw:</b> 5´ - GTC CCT AAT GAC AGC TCC TTT C - 3´
	<b>Rev:</b> 5´ - CCA CAC TGA CTC TTC CAT TCT T - 3´
iNOS	<b>Fw:</b> 5´ - CAC AGC AAT ATA GGC TCA TCC A - 3´
	<b>Rev:</b> 5´ - GGA TTT CAG CCT CAT GGT AAA C - 3´

### 3.7. ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) DE CAPTURA

Se determinó la presencia de IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-10 e IFN- $\gamma$  en los sobrenadantes de bazo. Se determinó la presencia de IFN- $\gamma$  en los sobrenadantes de cultivo de los ensayos de proliferación celular. En los sobrenadantes provenientes de los ensayos de co-cultivo se cuantificaron los niveles de IL-10. Se cuantificaron los niveles de IL-6 e IL-10 en plasma. La medición de citoquinas se realizó mediante el uso del kit OptEIA™ (BD Biosciencias), utilizando placas de 96 pocillos pequeños. En todos los casos se utilizó el protocolo detallado por el fabricante:

1. Se cubrieron los pocillos con 50  $\mu$ l del anticuerpo de captura. Se selló la placa y se la incubó a 4°C durante toda la noche.

2. Se descartó el líquido de cada pocillo y se lavó tres veces con 100  $\mu$ l de buffer de lavado. Después de cada lavado se invirtió la placa y se la secó sobre papel absorbente para remover el buffer de lavado residual.
3. Se bloqueó la placa con 100  $\mu$ l de buffer de bloqueo y se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora.
4. Se descartó el líquido y se lavó tres veces como en el paso 2.
5. Se prepararon diluciones del estándar y las muestras en buffer de bloqueo.
6. Se agregaron 50  $\mu$ l de cada estándar y de las muestras y se incubaron 2 horas a temperatura ambiente.
7. Se descartó el líquido y se lavó cinco veces como en el paso 2.
8. Se agregaron 50  $\mu$ l del anticuerpo de detección biotinilado en cada pocillo.
9. Se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente.
10. Se descartó el líquido y se lavó cinco veces como en el paso 2.
11. Se agregó 50  $\mu$ l de streptavidina-HRP (streptavidina conjugada a peroxidasa) en cada pocillo. Se cubrió la placa y se incubó 30 minutos a temperatura ambiente.
12. Se descartó el líquido y se lavó siete veces como en el paso 2. Solo que esta vez en cada lavado se incubó 30-60 segundos.
13. Se agregaron 50  $\mu$ l de la solución sustrato (tetrametilbencidina (TMB) y peróxido de hidrógeno) en cada pocillo. Se incubó la placa durante 30 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad.
14. Se agregaron 25  $\mu$ l de la solución corte (2N H<sub>2</sub> SO<sub>4</sub>) en cada pocillo.
15. Se leyó la absorbancia a 450 nm dentro de los 30 minutos de agregada la solución de corte.

### 3.8. Evaluación estadística

Los datos de las muestras que presentaron distribución normal fueron analizados mediante la prueba *t* de Student. Los datos de las muestras que no presentaron una distribución normal se analizaron con la prueba de Mann-Whitney no paramétrica. Las proporciones fueron comparadas mediante la prueba exacta de Fisher y para el análisis de correlaciones se evaluó el coeficiente de Spearman para correlaciones no paramétricas. Para el análisis estadístico se utilizó el software GraphPad Prism.

## 4. Resultados

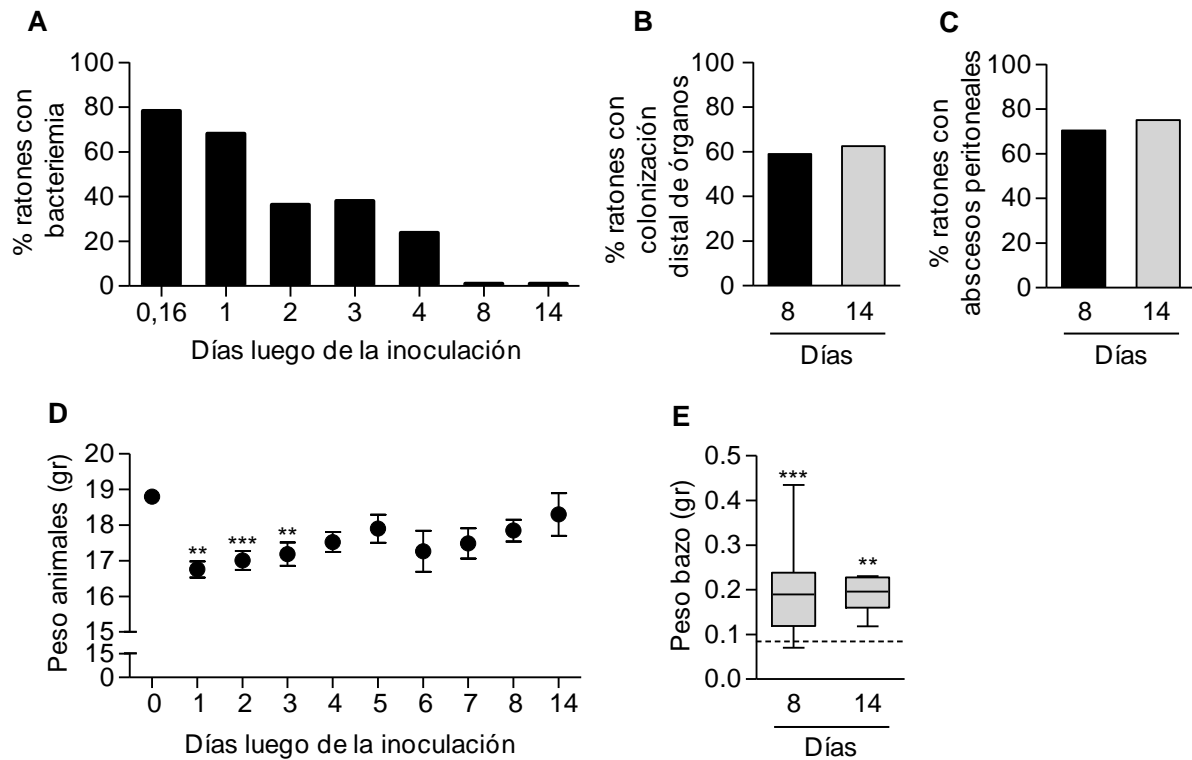
#### 4. 1. Inmunosupresión durante la sepsis por *S. aureus*

Con el fin de comprender los eventos que rigen la disfunción inmune durante la sepsis por *S. aureus* y su relación con el período pro-inflamatorio inicial, en una primera etapa de la investigación, se caracterizó el microambiente de citoquinas en el bazo y se determinó la capacidad proliferativa de los linfocitos T esplénicos provenientes de ratones en los cuales la sepsis se indujo a partir de un foco de infección peritoneal por dicho microorganismo.

##### 4.1.1. Modelo de sepsis por *S. aureus*

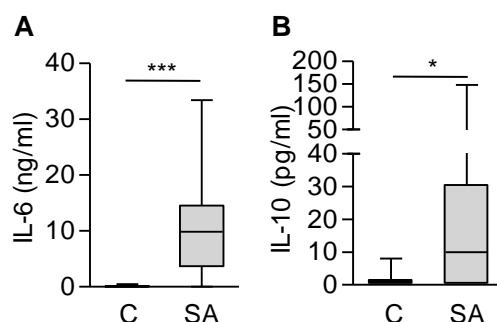
Los experimentos se llevaron a cabo utilizando un modelo de infección sistémica subletal de origen peritoneal en el cual grupos de ratones C57BL/6 de 6 semanas de edad fueron inoculados por ruta intraperitoneal con  $4-8 \times 10^7$  UFC de *S. aureus*. La mortalidad observada en este modelo fue del 10% y tuvo lugar predominantemente en las primeras 48 horas luego del desafío. Los animales sobrevivientes desarrollaron abscesos en la cavidad peritoneal así como también se observó la formación de abscesos en órganos como el riñón, bazo, hígado e intestino (rango: 1-3 abscesos/ratón). El estado séptico de los animales se confirmó por al menos 14 días en base a los parámetros que se describen a continuación. A las 4 horas luego del desafío se observó una tasa de bacteriemia del 80%, la cual descendió paulatinamente en los días subsiguientes hasta alcanzarse la negativización completa de los hemocultivos (Figura 3A). Al evaluar la colonización de bazo, pulmón, hígado y riñón por *S. aureus* se observó que a los 8 y 14 días luego de la inoculación el 60% de los animales presentaba la colonización de al menos uno de los órganos evaluados (Figura 3B). A los 8 días luego de la inoculación el 70 % de los animales desafiados con *S. aureus* presentaron abscesos en la cavidad peritoneal. El 75% de los animales presentaron abscesos en la cavidad peritoneal a los 14 días luego de la inoculación (Figura 3C). Se registró una pérdida de peso del 12% al día 1 luego de la inoculación. Posteriormente, los animales recuperaron su peso alcanzando valores similares a los iniciales al día 14 luego del desafío (Figura 3D). Tanto a los 8 como a los 14 días luego de la inoculación se observó un aumento significativo en la masa esplénica (Figura 3E).





**Figura 3.** Grupos de ratones C57BL/6 salvajes fueron inoculados por ruta intraperitoneal con  $4-8 \times 10^7$  UFC de *S. aureus*. (A) Se monitoreó la presencia de bacteria en sangre diariamente. (B-C) A los 8 días (barras negras) y 14 días (barras grises) luego de la inoculación se determinó el porcentaje de ratones que presentaron uno o más órganos colonizados (B) y aquellos que presentaron abscesos peritoneales (C). (D) Diariamente se monitoreó el peso corporal de los animales. \*\*:  $p < 0,01$ , \*\*\*:  $p < 0,001$ ; Prueba de Anova. (E) Se determinó el peso del bazo a los 8 y 14 días luego de la inoculación con *S. aureus*. Las cajas y sus bigotes representan los valores obtenidos en cada grupo con sus respectivas medianas, máximo y mínimo. La línea punteada representa el valor medio del peso del bazo en el grupo de ratones control (inoculados con PBS). \*\*:  $p < 0,01$ , \*\*\*:  $p < 0,001$ , respecto del peso de animales control; Prueba de Mann Whitney.

Al evaluar la producción de citoquinas, se observó un aumento significativo en los niveles de IL-6 en circulación a las 4 horas luego del desafío (Figura 4A), lo cual coincidió con reportes previos en modelos experimentales de sepsis polimicrobiana (Remick DG *et al.*, 2002) y en muestras de pacientes sépticos (Hack CE *et al.*, 1989; Borrelli E *et al.*, 1996), retornando a los valores basales al día 1 y no observándose aumentos a los días 4, 8 y 14 (resultados no mostrados). A los 8 días luego de la inoculación se evaluaron los niveles circulantes de IL-10, una citoquina crítica en los procesos de inmunosupresión, observándose niveles significativamente mayores en ratones desafiados con *S. aureus* respecto de los animales inoculados con PBS como control (Figura 4B).

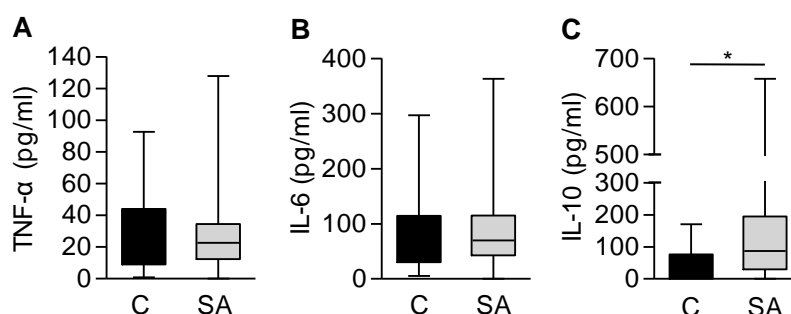


**Figura 4.** Grupos de ratones C57BL/6 salvajes fueron inoculados por ruta intraperitoneal con *S. aureus* (barras grises) o PBS (control, barras negras). (A-B) Se determinaron los niveles de IL-6 (A) y de IL-10 (B) en plasma a las 4 horas y 8 días luego de la inoculación, respectivamente mediante ELISA. Las cajas y sus bigotes representan los valores obtenidos en cada grupo con sus respectivas medianas, máximo y mínimo. \*:  $p < 0,05$ , \*\*\*:  $p < 0,001$ ; Prueba de Mann-Whitney.

#### 4.1.2. Funcionalidad de los linfocitos T durante la sepsis por *S. aureus*

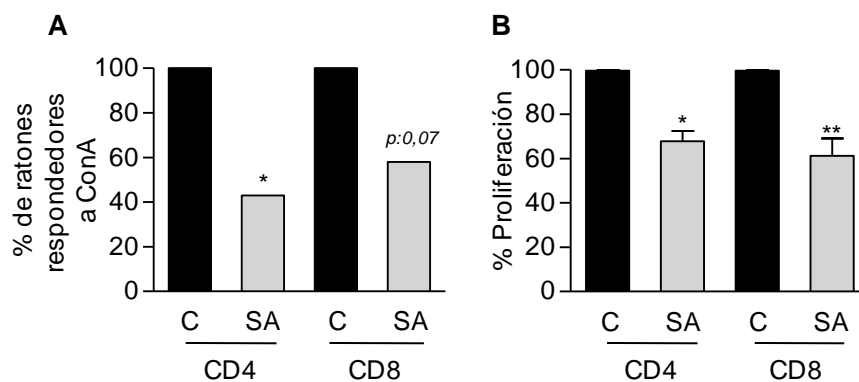
Entre los eventos que contribuyen a la inmunosupresión que caracteriza a la sepsis, se ha demostrado recientemente que las células T, población crítica para el control de la infección por *S. aureus*, pierden gradualmente su capacidad para responder a la estimulación antigénica y presentan un estado de anergia que contribuye a la progresión de la infección y a la persistencia bacteriana (Tebartz C *et al.*, 2015).

A fin de caracterizar los eventos que conducen a la anergia de las células T, en primer lugar se caracterizó la producción de citoquinas pro- y antiinflamatorias en el bazo de ratones inoculados con *S. aureus*. A los 8 días luego de la inoculación no se observaron incrementos en los niveles de TNF- $\alpha$  e IL-6 respecto de los niveles determinados en animales control (Figura 5A y 5B). Sin embargo, se observó un aumento significativo de los niveles de IL-10 en bazo en respuesta a la infección por *S. aureus* (Figura 5C).



**Figura 5.** Grupos de ratones C57BL/6 salvajes fueron inoculados por ruta intraperitoneal con *S. aureus* (barras grises) o PBS (control, barras negras). A los 8 días luego de la inoculación, se cuantificaron los niveles de TNF- $\alpha$  (A), IL-6 (B) e IL-10 (C) en los sobrenadantes de homogenato de bazo obtenidos de cada animal. Las cajas y sus bigotes representan los valores obtenidos en cada grupo con sus respectivas medianas, máximo y mínimo. \*:  $p < 0,05$ ; Prueba de Mann-Whitney.

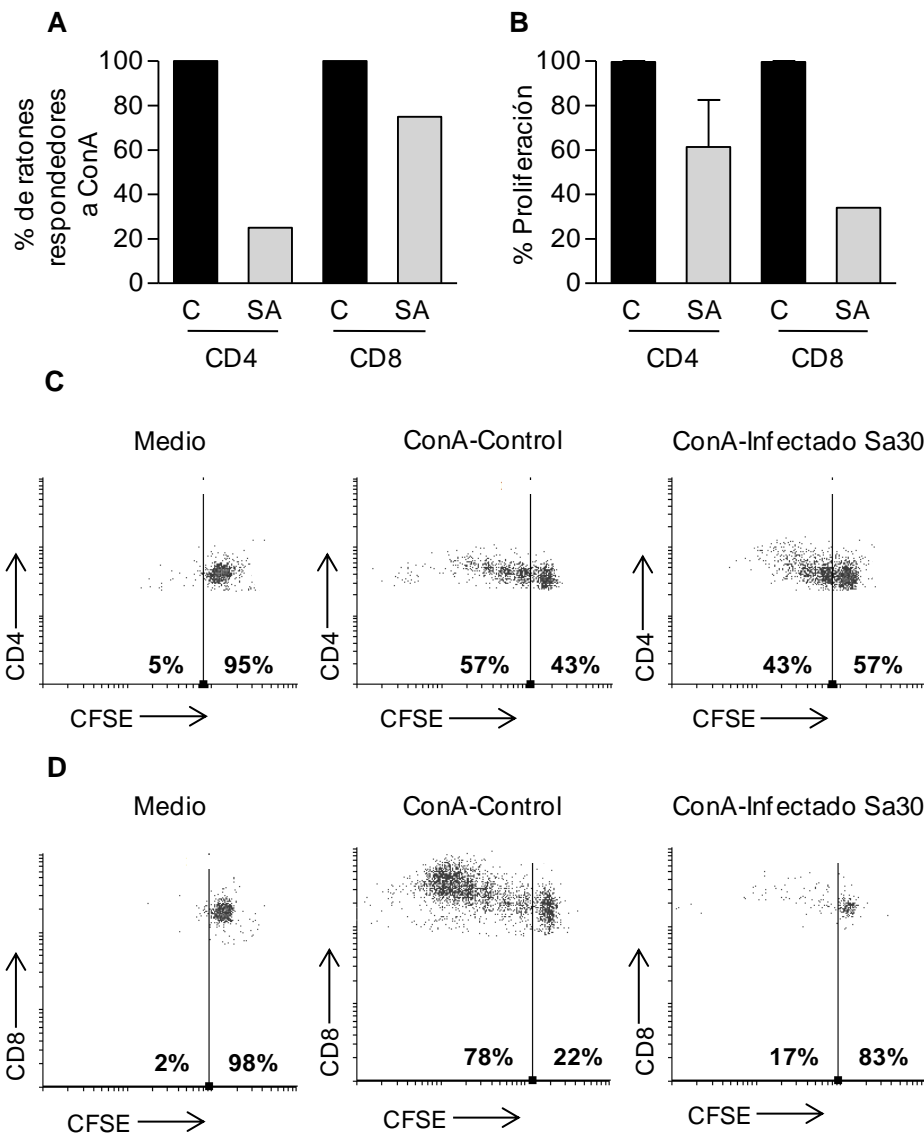
Luego se evaluó la respuesta proliferativa frente a ConA de células T provenientes de bazo de ratones inoculados por ruta intraperitoneal con *S. aureus*. La funcionalidad de las células T se evaluó a los 8 días luego del desafío y se la comparó con la observada en células T provenientes de ratones inoculados con PBS (control). Para ello, los esplenocitos fueron marcados con CFSE y cultivados en presencia o ausencia de ConA. A las 72 horas luego de la estimulación, las células fueron cosechadas y teñidas con anticuerpos específicos anti-CD4 y anti-CD8. Se cuantificó la disminución de la intensidad de fluorescencia del CFSE a causa de la proliferación celular inducida por la estimulación con ConA en linfocitos T CD4 y T CD8. A los 8 días luego del desafío sólo el 40% de los animales presentó células T CD4 con capacidad proliferativa frente al estímulo con ConA equivalente a la del grupo control (Figura 6A). Al evaluar la respuesta de los linfocitos T CD8 se observó que el 60% de los animales presentó capacidad proliferativa frente a ConA comparable a la del grupo control (Figura 6A). Aquellos ratones cuyos linfocitos T no respondieron completamente a ConA mostraron aproximadamente el 60% de la capacidad proliferativa en comparación con los ratones control (respondedores) (Figura 6B). Niveles similares de anergia de las células T fueron observados a los 14 días luego de la inoculación en experimentos realizados con un reducido número de animales (resultados no mostrados).



**Figura 6.** Grupos de ratones C57BL/6 salvajes fueron inoculados por ruta intraperitoneal con *S. aureus* FRP3757 (barras grises) o PBS (control, barras negras). A los 8 días luego de la inoculación se evaluó la respuesta proliferativa frente a ConA (10 µg/ml) de células T provenientes de bazo de ratones infectados y control. (A) Los resultados se expresan como el porcentaje de ratones inoculados con *S. aureus* cuyas células T presentaron capacidad proliferativa frente a ConA. Se consideró ratones respondedores a ConA a aquéllos que tuvieron una respuesta proliferativa relativa mayor al 90% (se consideró la respuesta proliferativa de los ratones inoculados con PBS como 100%). \*:  $p < 0.05$ ; Prueba exacta de Fisher. (B) Se determinó la respuesta proliferativa de linfocitos T provenientes de ratones inoculados con *S. aureus* o PBS en respuesta a la estimulación con medio y ConA a los 8 días luego de la inoculación. Los resultados se expresan relativos a la proliferación de los ratones inoculados con PBS considerada como 100 % (control). El gráfico muestra para el grupo inoculado con *S. aureus* los datos provenientes de aquellos ratones que mostraron respuesta T inferior a la observada con PBS. \*:  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$ ; Prueba *t* no pareada.

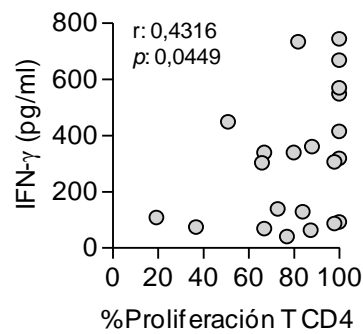
Para confirmar el estado de anergia de las células T en el modelo de sepsis utilizado, se realizaron experimentos con un número reducido de animales utilizando una cepa diferente de *S. aureus*. Para ello se utilizó un aislamiento perteneciente al clon de *S. aureus* predominante en infecciones invasivas adquiridas en la comunidad en nuestro país (Sa30, Fernandez S *et al.*, 2013). A las 4 horas luego del desafío se observó una tasa de bacteriemia del 80%. Acorde con las características invasivas de este clon, se observó que a los 8 días luego de la inoculación en el 100% de los animales hubo formación de abscesos en la cavidad peritoneal y en el 50% hubo colonización de bazo.

A los 8 días luego del desafío sólo el 25% de los animales presentó células T CD4 con capacidad proliferativa frente al estímulo con ConA equivalente a la del grupo control (Figura 7A), mientras que el 75% de los animales presentó células T CD8 funcionales (Figura 7A). Aquellos ratones que no respondieron completamente a ConA mostraron aproximadamente el 60% de la capacidad proliferativa de las células T CD4 y el 34% de la capacidad proliferativa de las células T CD8 en comparación con los ratones control (respondedores) (Figura 7B).



**Figura 7.** Grupos de ratones C57BL/6 salvajes fueron inoculados por ruta intraperitoneal *S aureus* Sa30 (barras grises) o PBS (control, barras negras). A los 8 días luego de la inoculación se evaluó la respuesta proliferativa frente a Con A (10 µg/ml) de células T provenientes de bazo de ratones infectados y control. (A) Los resultados se expresan como el porcentaje de ratones inoculados con *S. aureus* Sa30 cuyas células T presentaron capacidad proliferativa frente a ConA. Se consideró ratones respondedores a ConA a aquéllos que tuvieron una respuesta proliferativa relativa mayor al 90% (se consideró la respuesta proliferativa de los ratones inoculados con PBS como 100%). Prueba exacta de Fisher. (B) Se determinó la respuesta proliferativa de linfocitos T provenientes de ratones inoculados con *S. aureus* Sa30 o PBS en respuesta a la estimulación con medio y ConA a los 8 días luego de la inoculación. Los resultados se expresan relativos a la proliferación de los ratones inoculados con PBS considerada como 100 % (control). El gráfico muestra los datos provenientes de aquellos ratones que mostraron respuesta T inferior a la observada con PBS. Prueba *t* no pareada. (C-D) Diagramas de densidad de puntos mostrando el porcentaje de células CD4<sup>+</sup>CFSE<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup>CFSE<sup>-</sup> (C) o CD8<sup>+</sup>CFSE<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>CFSE<sup>-</sup> en las distintas condiciones ensayadas (D).

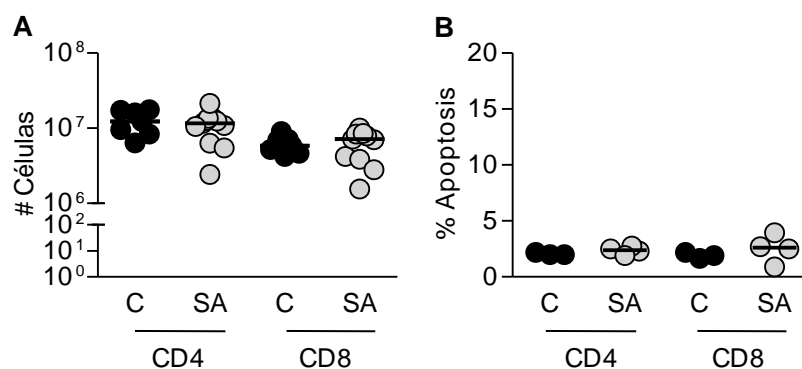
La disminución de la capacidad proliferativa de las células T CD4 se correlacionó positivamente con los niveles de IFN-γ presentes en el bazo (Figura 8), resaltando la disfunción en dicha población celular.



**Figura 8.** Grupos de ratones C57BL/6 salvajes fueron inoculados por ruta intraperitoneal con *S. aureus*. Los datos incluyen los valores obtenidos en ratones inoculados con la cepa FRP3757 y la cepa Sa30. Se muestra la correlación lineal entre los niveles de IFN- $\gamma$  en el sobrenadante de homogenato de bazo de ratones inoculados con *S. aureus* y el porcentaje de proliferación relativa de células T CD4 a los 8 días luego de la inoculación. Prueba de Spearman.

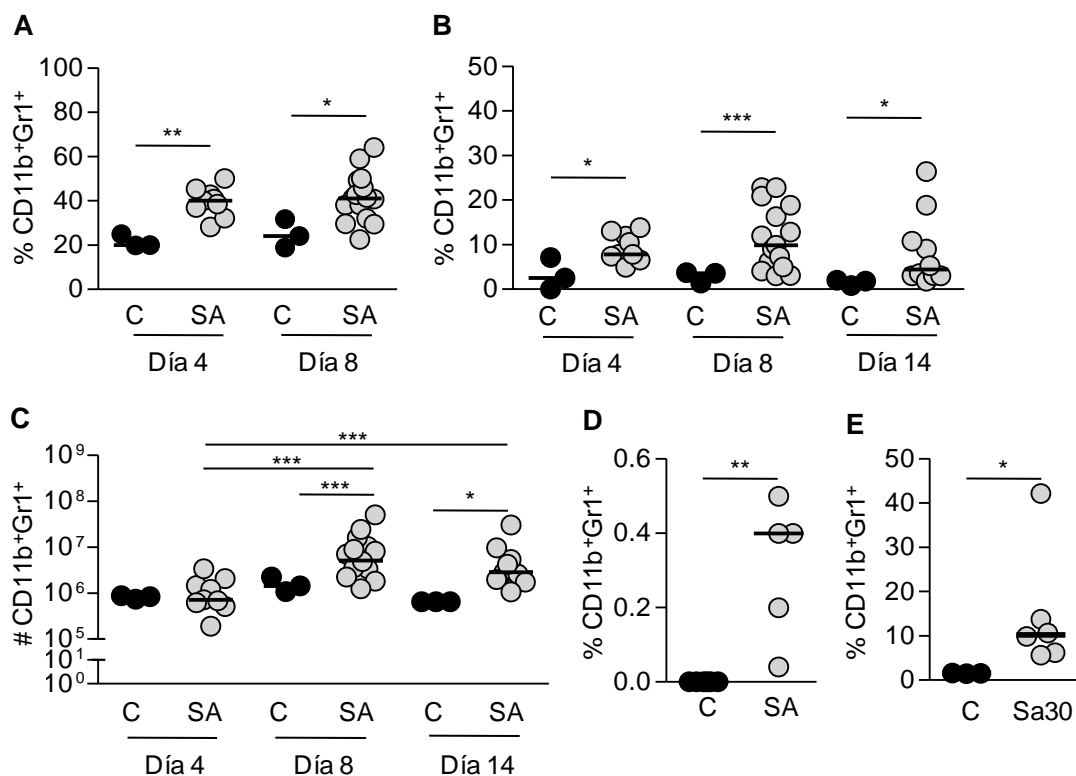
#### 4.1.3. Expansión y acumulación de MDSC durante la sepsis por *S. aureus*

A fin de dilucidar los mecanismos involucrados en la anergia de los linfocitos T durante la sepsis por *S. aureus* y considerando que en otros modelos experimentales de sepsis y en pacientes sépticos se ha descrito la presencia de linfocitos T y B apoptóticos (Muenzer JT *et al.*, 2010; Hotchkiss RS *et al.*, 1999; Hotchkiss RS *et al.*, 2001, Hotchkiss RS *et al.*, 2002), se evaluó en primer lugar el número absoluto de células T CD4 y T CD8 y su viabilidad en el bazo de los animales infectados. El número absoluto de células T CD4 y T CD8 esplénicas así como la apoptosis de las células T no se modificaron significativamente en animales inoculados con *S. aureus* respecto del grupo control (Figura 9A y 9B).



**Figura 9.** Grupos de ratones C57BL/6 salvajes fueron inoculados por ruta intraperitoneal con *S. aureus* (círculos grises) o PBS (control, círculos negros). (A) A los 8 días luego de la inoculación el número de células T CD4 (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>) y T CD8 (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>) en bazo fue determinado por tinción con anticuerpos específicos y análisis por citometría de flujo. (B). El porcentaje de apoptosis al día 8 luego de la inoculación fue determinado en la población de células T CD4 y T CD8 utilizando anticuerpos específicos, anexina V y posterior análisis por citometría de flujo. Cada círculo representa un ratón individual y la línea horizontal la mediana para cada grupo. Prueba de Mann Whitney.

Estos resultados sugieren que la anergia en la respuesta T durante la sepsis por *S. aureus* no podría ser explicada por un aumento en la apoptosis de dicha población. Asimismo, estos resultados denotan que la expansión clonal de las células T, un proceso esperable durante la infección, se encuentra afectada. Por lo tanto, a fin de determinar las posibles causas de la respuesta T disminuida observada en el modelo de sepsis por *S. aureus*, se evaluó la posible expansión de células mieloides supresoras. Para ello, grupos de ratones C57BL/6 salvajes fueron desafiados por ruta intraperitoneal con *S. aureus* y se evaluó el porcentaje y número absoluto de MDSC, definidas como CD11b<sup>+</sup>Gr1<sup>+</sup> en médula ósea y órganos linfoides secundarios. La sepsis inducida por *S. aureus* se acompañó de la expansión significativa de células mieloides inmaduras en la médula ósea al día 4 luego de la inoculación la cual se sostuvo hasta el día 8 luego del desafío (Figura 10A). Paralelamente, se observó un aumento significativo en el porcentaje de células CD11b<sup>+</sup>Gr1<sup>+</sup> acumuladas en bazo a los 4, 8 y 14 días luego de la inoculación respecto de los animales control, inoculados con PBS (Figura 10B). El aumento en el porcentaje de células CD11b<sup>+</sup>Gr1<sup>+</sup> se correspondió con un aumento significativo en el número absoluto de dicha población en bazo respecto de los animales control, a los 8 y 14 días luego de la inoculación (Figura 10C). A los 8 días luego de la inoculación se observó un aumento significativo en el porcentaje de células CD11b<sup>+</sup>Gr1<sup>+</sup> presentes en ganglios linfáticos inguinales respecto el grupo control (Figura 10D). A fin de confirmar los resultados obtenidos, se evaluó la expansión y proliferación de MDSC en bazo durante la sepsis inducida por el aislamiento de *S. aureus* Sa30. A los 8 días luego de la inoculación se observó un aumento significativo en el porcentaje de células CD11b<sup>+</sup>Gr1<sup>+</sup> en el bazo respecto a lo observado en los animales control (Figura 10E).



**Figura 10.** Grupos de ratones C57BL/6 salvajes fueron inoculados por ruta intraperitoneal con *S. aureus* FRP3757 (A-D, círculos grises), *S. aureus* Sa30 (E, círculos grises) o PBS (control, A-E, círculos negros). (A) Se determinó el porcentaje de células CD11b<sup>+</sup>Gr1<sup>+</sup> en médula ósea a los 4 y 8 días luego de la inoculación. (B-C) Se determinó el porcentaje (B) y número absoluto (C) de MDSC en bazo a los 4, 8 y 14 días luego de la inoculación. (D) Se determinó el porcentaje de MDSC en ganglios linfáticos inguinales a los 8 días luego de la inoculación. (E) Se determinó el porcentaje de MDSC en bazo a los 8 días luego de la inoculación. Cada círculo representa un ratón individual y la línea horizontal la mediana para cada grupo. \*:  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$ , \*\*\*:  $p < 0,001$ ; Prueba de Mann Whitney.

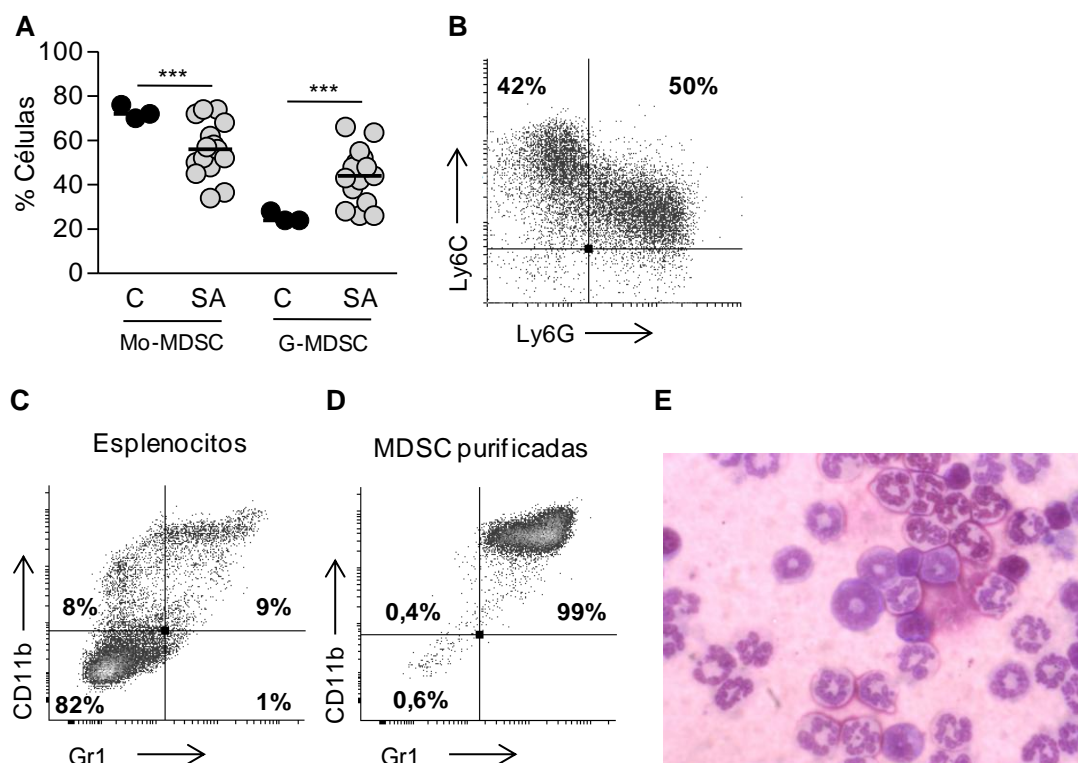
#### 4.1.3.1. Fenotipo de las MDSC que se expanden durante la sepsis por *S. aureus*

Considerando que las MDSC son una población heterogénea de células inmaduras que se subclasifican, según la expresión de los marcadores Ly6G y Ly6C, en MDSC monocíticas (CD11b<sup>+</sup>Ly6C<sup>high</sup>Ly6G<sup>-</sup>) o MDSC granulocíticas (CD11b<sup>+</sup>Ly6C<sup>low</sup>Ly6G<sup>+</sup>), se caracterizó la distribución de dichos marcadores en las MDSC presentes en el bazo en condiciones fisiológicas y en las MDSC que se expanden durante la sepsis por *S. aureus*. En ratones control las MDSC de tipo monocítico representaron alrededor del 80% de la población mientras que durante la infección se observó una disminución significativa en la proporción de células de tipo monocítico y un aumento significativo en la proporción de células de tipo granulocítico (Figura 11A y 11B).

A fin de visualizar la heterogeneidad de las MDSC presentes en animales inoculados con *S. aureus*, se realizó la purificación de células Gr1<sup>+</sup> a partir del bazo a los 8 días luego de la inoculación mediante perlas magnéticas. La pureza de las células



purificadas fue del 99% (Figura 11C y 11D). La tinción con Giemsa de las mismas reveló la presencia de células con núcleos circulares y en forma de anillo, confirmando la heterogeneidad de la población expandida en bazo durante la sepsis por *S. aureus* (Figura 11E).



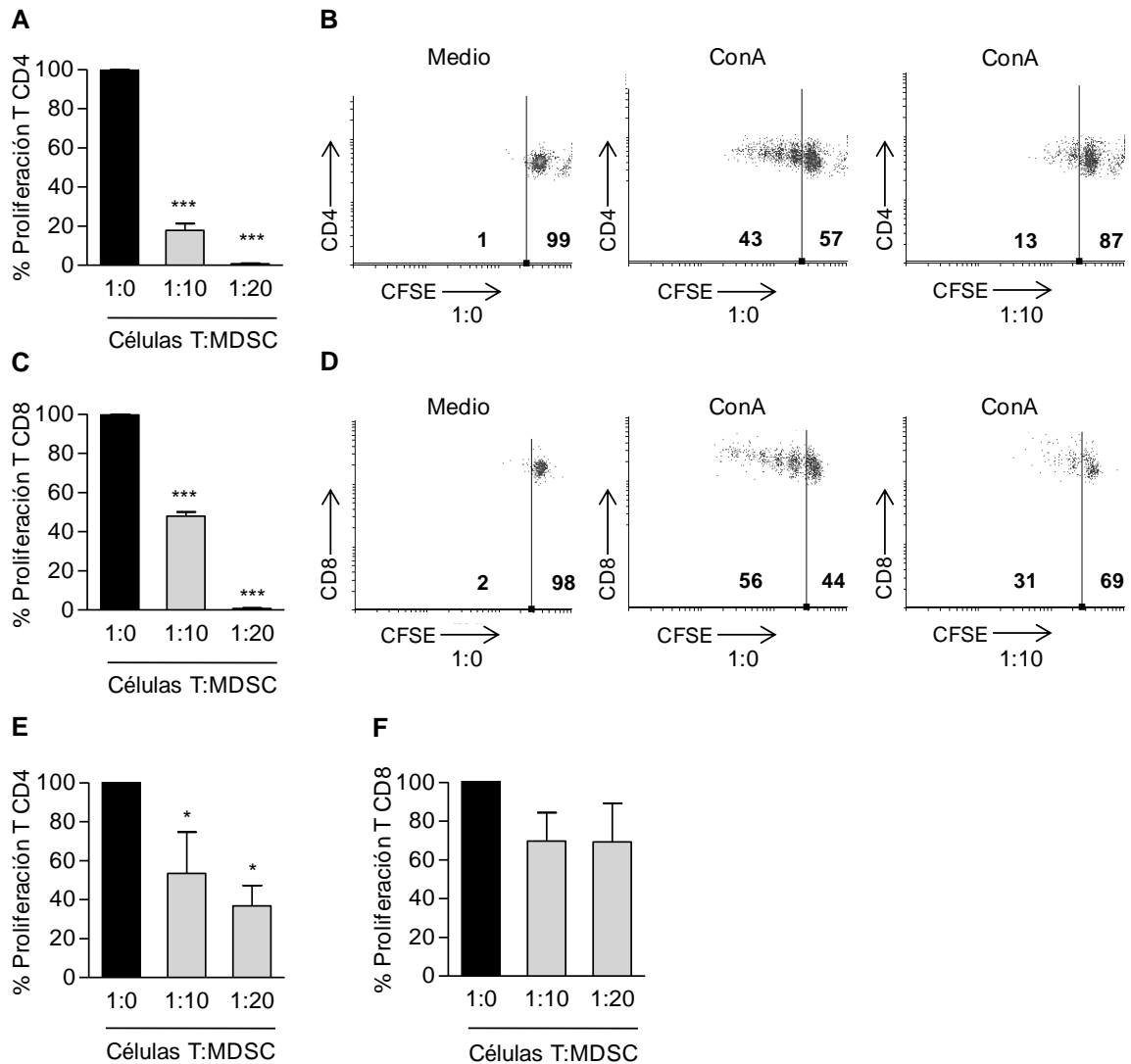
**Figura 11.** Grupos de ratones C57BL/6 salvajes fueron inoculados por ruta intraperitoneal con *S. aureus* (círculos grises) o PBS (control, círculos negros). (A) Expresión de CD11b, Ly6G y Ly6C en esplenocitos a los 8 días luego de la inoculación. Mo-MDSC: CD11b<sup>+</sup>Ly6C<sup>high</sup>Ly6G<sup>-</sup>. G-MDSC: CD11b<sup>+</sup>Ly6C<sup>low</sup>Ly6G<sup>+</sup>. (B) Diagrama de densidad representativo mostrando la expresión de los marcadores de superficie Ly6C y Ly6G en células CD11b<sup>+</sup> provenientes de un animal infectado. (C) Diagrama de densidad representativo mostrando la expresión de CD11b y Gr1 en esplenocitos de un animal infectado. (D) Diagrama de densidad representativo mostrando la expresión de CD11b y Gr1 en células purificadas utilizando anticuerpos anti-Gr1 y perlas magnéticas. (E) Tinción con giemsa de células CD11b<sup>+</sup>Gr1<sup>+</sup> purificadas. \*\*\*:  $p < 0,001$ ; Prueba de Mann Whitney.

#### 4.1.3.2. Capacidad de las MDSC provenientes de bazo de ratones inoculados con *S. aureus* de inhibir la proliferación de células T

Para confirmar fehacientemente la presencia de MDSC es necesario, además de realizar la caracterización fenotípica, evaluar parámetros funcionales. Es decir, determinar su capacidad de suprimir la funcionalidad de los linfocitos T. Para ello, a partir de las suspensiones celulares que se obtuvieron de médula ósea y bazo a los 8 días luego de la inoculación, se purificaron las MDSC mediante el uso de anticuerpos anti-Gr1 y perlas magnéticas y se procedió a determinar sus propiedades inmunosupresoras. Para ello, esplenocitos de ratón vírgenes fueron marcados con CFSE y co-cultivados a razón

de  $2 \times 10^5$  células por pocillo con diferentes proporciones MDSC (células T:MDSC: 1:0, 1:10, 1:20). Las células fueron estimuladas con ConA y se cuantificó la proliferación de células T a las 72 horas. Las células fueron cosechadas y teñidas con anticuerpos específicos anti-CD4 y anti-CD8. Se determinó la capacidad de las MDSC de inhibir la proliferación de células T evaluando la intensidad de fluorescencia del CFSE en células T CD4 y T CD8 en los co-cultivos con diferentes proporciones de MDSC respecto de los cultivos en ausencia de MDSC.

Se observó una disminución significativa en la capacidad proliferativa de células T CD4 en presencia de cantidades crecientes de células CD11b<sup>+</sup>Gr1<sup>+</sup> purificadas tanto de médula ósea como de bazo (Figura 12A y 12E). Las MDSC provenientes de médula ósea tuvieron capacidad de supresión sobre las células T CD8 similar a la observada para las células T CD4 (Figura 12A-D). Sin embargo, las MDSC provenientes de bazo presentaron menor capacidad de supresión sobre las células T CD8 que la observada para las células T CD4 (Figura 12E y 12F). Las MDSC aisladas de bazo al día 14 luego de la inoculación también presentaron función supresora sobre la proliferación de células T (resultados no mostrados).

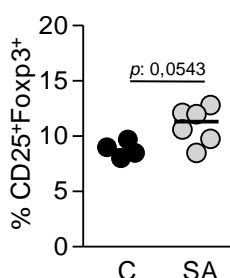


**Figura 12.** Grupos de ratones C57BL/6 salvajes fueron inoculados por ruta intraperitoneal con *S. aureus*. A los 8 días luego de la inoculación las células CD11b<sup>+</sup>Gr<sup>+</sup> presentes en médula ósea y bazo fueron purificadas y posteriormente co-cultivadas con esplenocitos de ratón vírgenes ( $2 \times 10^5$  células por pocillo) en una proporción 1:10 y 1:20 de linfocitos T:MDSC. Los cultivos fueron estimulados con ConA (10µg/ml). (A, E) Las barras grises representan la proliferación relativa observada para células T CD4 cultivadas en presencia de MDSC de médula ósea (A) o de bazo (E) respecto de la proliferación observada en ausencia de células MDSC considerada como el 100% (barras negras). (C, F) Las barras grises representan la proliferación relativa observada para células T CD8 cultivadas en presencia de MDSC de médula ósea (C) o de bazo (F) respecto de la proliferación observada en ausencia de células MDSC considerada como el 100% (barras negras). (B, D) Diagramas de densidad de puntos representativos mostrando el porcentaje de células CD4<sup>+</sup>CFSE<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup>CFSE<sup>-</sup> (B) o CD8<sup>+</sup>CFSE<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>CFSE<sup>-</sup> (D) en las distintas condiciones ensayadas. \*:  $p < 0,05$ , \*\*\*:  $p < 0,001$ ; Prueba *t* no pareada.

#### 4.1.4 Células T regulatorias durante la sepsis por *S. aureus*

Considerando que otros mecanismos, además de la expansión de MDSC, podrían ser responsables de la supresión de la respuesta T durante la infección por *S. aureus*, se evaluó la población de células T regulatorias (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>), conocidas por su

actividad inmunosupresora. Se observó un incremento pequeño de esta población en animales salvajes a los 8 días luego del desafío (Figura 13).



**Figura 13.** Grupos de ratones C57BL/6 salvajes fueron inoculados por ruta intraperitoneal con *S. aureus* (círculos grises) o PBS (control, círculos negros). A los 8 días luego de la inoculación el número de células Treg (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>) en bazo fue determinado por tinción con anticuerpos específicos y análisis por citometría de flujo. Prueba de Mann Whitney.

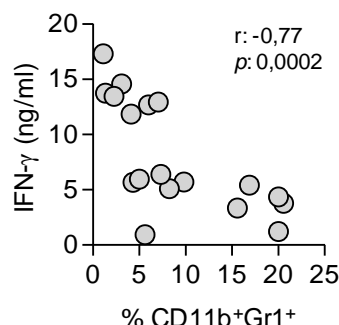
#### 4.1.5. Conclusiones parciales

- Los parámetros evaluados permitieron validar el modelo de sepsis por *S. aureus* de origen peritoneal. Se observaron características propias de la fase inicial pro-inflamatoria, como el incremento de la IL-6 circulante a tiempos tempranos (4 horas) luego de la inoculación y de la fase de inmunosupresión, como la presencia de niveles elevados de IL-10 en plasma y bazo a tiempos tardíos (8 días) luego de la inoculación.
- La sepsis por *S. aureus* indujo la anergia de células T CD4. La población de células T CD8 presentó funciones levemente disminuidas.
- La infección por *S. aureus* indujo la expansión y acumulación de MDSC en médula ósea, bazo y ganglios linfáticos, siendo el fenotipo mayoritario el de tipo granulocítico.
- Las MDSC presentes en médula ósea y bazo durante la sepsis por *S. aureus* resultaron funcionalmente activas presentando capacidad supresora de la proliferación de linfocitos T.

#### 4.2. Contribución relativa de las MDSC en la inmunosupresión asociada a la sepsis por *S. aureus*

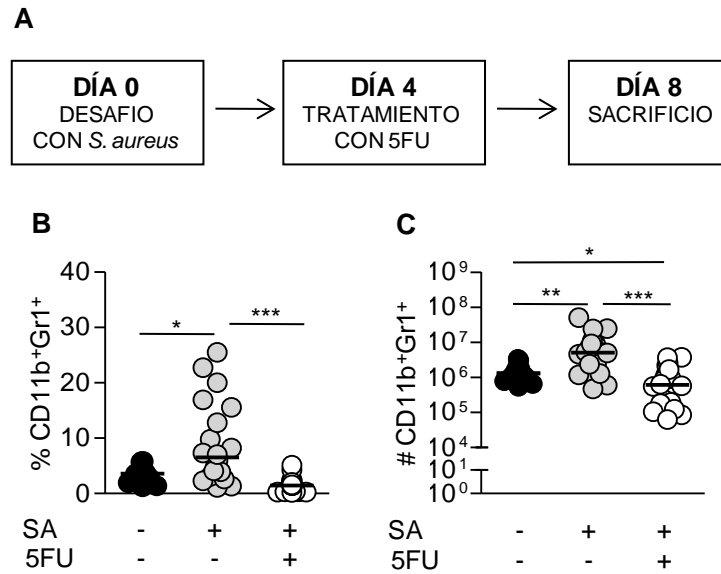
Considerando la importancia de la expresión de IFN- $\gamma$  en la proliferación de las células T, se determinaron los niveles de dicha citoquina producidos en respuesta a ConA por esplenocitos de ratones inoculados con *S. aureus*. Se observó un aumento en los niveles de IFN- $\gamma$  en los cultivos de esplenocitos provenientes de ratones sépticos en comparación con aquéllos provenientes de animales control. Sin embargo, se observó una gran dispersión en los valores determinados para los diferentes animales. La

inducción diferencial de IFN- $\gamma$  presentó una correlación inversa con el porcentaje de MDSC presentes en el bazo de ratones sépticos (Figura 14), sugiriendo un rol para esta población en la disfunción de células T durante la sepsis por *S. aureus*.



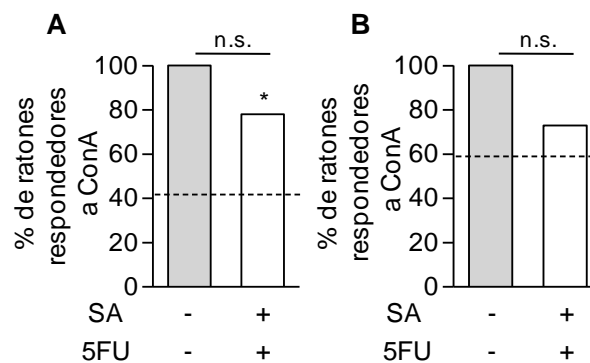
**Figura 14.** Correlación lineal entre los niveles de IFN- $\gamma$  producidos en respuesta al estímulo con ConA por esplenocitos obtenidos a los 8 días luego de la inoculación con *S. aureus* y el porcentaje de MDSC presentes en el bazo de cada animal a dicho tiempo. Prueba de Spearman.

A fin de determinar el rol de las MDSC en la fase de inmunosupresión de la sepsis por *S. aureus*, se estableció el impacto de la depleción farmacológica de dicha población celular en la funcionalidad de las células T esplénicas y el desarrollo de la infección. Estudios previos han demostrado que la droga 5- fluorouracilo administrada a 50mg/kg induce la apoptosis selectiva de MDSC sin efecto sobre otras poblaciones celulares (Vincent J *et al.*, 2010). Por lo tanto, grupos de ratones fueron inoculados por ruta intraperitoneal con 5FU (50 mg/kg) al día 4 luego del desafío con *S. aureus* (Figura 15A). De forma consistente con la acción farmacológica esperada, el porcentaje y el número absoluto de células CD11b<sup>+</sup>Gr1<sup>+</sup> en el bazo de ratones inoculados con *S. aureus* y tratados con 5FU fue significativamente menor al determinado en ratones inoculados con *S. aureus* y no tratados con 5FU y resultó comparable al observado en ratones control inoculados con PBS (Figuras 15B y 15C). Asimismo, se evaluó el efecto del 5FU sobre la población de linfocitos T CD4 y T CD8 en grupo de ratones inoculados con PBS respecto lo observado en ratones inoculados con PBS y tratados con 5FU. Como era de esperar, el 5FU no indujo apoptosis sobre esta población celular obteniéndose porcentajes de células CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> y CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> similares en ambos grupos [%CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>: 15% (mediana grupo PBS), 14,85% (mediana grupo PBS tratado con 5FU); %CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>: 5% (mediana grupo PBS), 6,2% (mediana grupo PBS tratado con 5FU)].



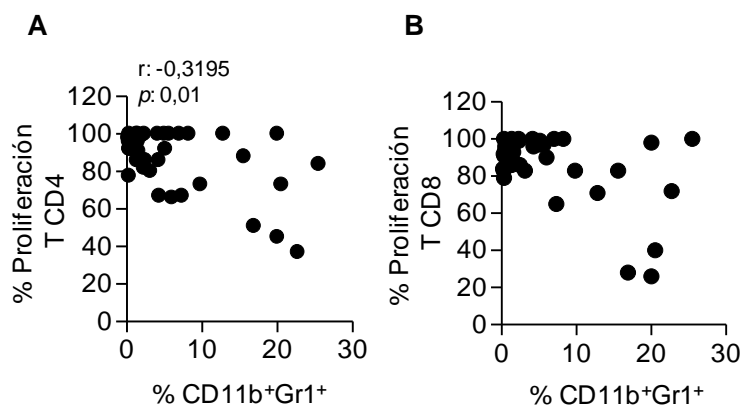
**Figura 15.** Grupos de ratones C57BL/6 salvajes fueron inoculados por ruta intraperitoneal con *S. aureus* o con PBS (control, círculos negros). A los 4 días luego de la inoculación los ratones inoculados con *S.aureus* fueron tratados con 5FU (50 mg/Kg) (círculos blancos) o no tratados (círculos grises) por ruta intraperitoneal. (A) Esquema de inoculación. (B-C) El porcentaje (B) y el número absoluto (C) de MDSC presentes en bazo a los 8 días luego de la inoculación con *S. aureus* se determinó por tinción con anticuerpos específicos y posterior análisis por citometría de flujo. \*:  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$ , \*\*\*:  $p < 0,001$ ; Prueba de Mann Whitney.

Interesantemente, el bloqueo de la expansión de MDSC restauró la capacidad de células T CD4 (Figura 16A) y, en menor medida, de las células T CD8 provenientes de ratones sépticos de proliferar en respuesta a ConA (Figura 16B).



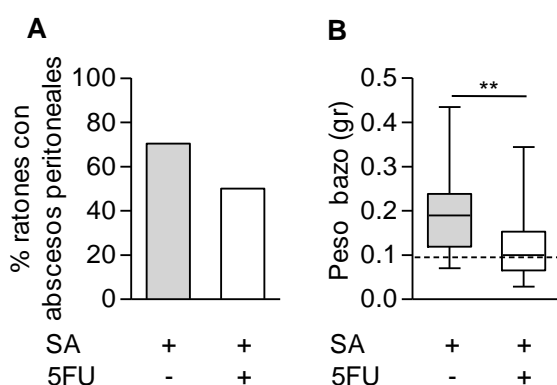
**Figura 16.** Grupos de ratones C57BL/6 salvajes fueron inoculados por ruta intraperitoneal con *S. aureus* o con PBS (control, barras grises) y posteriormente tratados con 5FU (barras blancas) o no tratados (línea punteada). A los 8 días luego de la inoculación con *S. aureus* se evaluó la respuesta proliferativa de células T esplénicas frente al estímulo con ConA (10  $\mu$ g/ml). Los resultados se expresan como el porcentaje de ratones cuyas células T CD4 (A) y T CD8 (B) fueron capaces de proliferar frente al estímulo con ConA. Se consideró ratones respondedores a ConA a aquellos que tuvieron una respuesta proliferativa relativa mayor al 90% (se consideró la respuesta proliferativa de los ratones inoculados con PBS como 100%). \*:  $p < 0,05$  (respecto al grupo de animales inoculados con *S. aureus* no tratados con 5FU), n.s. (no significativo); Prueba exacta de Fisher.

El rol de las MDSC en la supresión de la funcionalidad de células T CD4 fue confirmado por análisis de correlación que mostraron una correlación inversa entre la capacidad proliferativa de células T CD4 y el porcentaje de MDSC presentes en el bazo (Figura 17A). Por el contrario, no se encontró correlación entre la capacidad proliferativa de células T CD8 y el porcentaje de MDSC (Figura 17B).



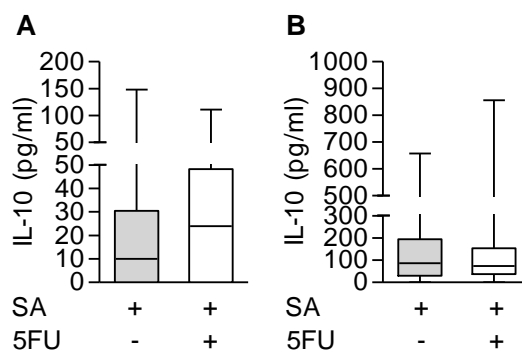
**Figura 17.** Correlación lineal entre el porcentaje de proliferación relativa de células T CD4 (A) y de células T CD8 (B) provenientes de ratones inoculados con *S. aureus* y el porcentaje de MDSC presentes en bazo de cada animal a los 8 días luego de la inoculación. Prueba de Spearman.

El tratamiento con 5FU y la consiguiente depleción de MDSC no sólo permitió recuperar la funcionalidad de las células T, sino que además impactó positivamente en parámetros de la infección. El grupo tratado con 5FU mostró una tasa menor de formación de abscesos peritoneales al día 8 luego del inicio de la sepsis (Figura 18A) y una reducción significativa de la esplenomegalia (Figura 18B).



**Figura 18.** Grupos de ratones C57BL/6 salvajes fueron inoculados por ruta intraperitoneal con *S. aureus* y posteriormente tratados con 5FU (barras blancas) o no tratados (barras grises). A los 8 días luego de la inoculación se determinó el porcentaje de ratones con abscesos peritoneales (A) y el peso del bazo de los animales infectados (B). Las cajas y sus bigotes representan los valores obtenidos en cada grupo con sus respectivas medianas, máximo y mínimo. La línea punteada representa el valor medio del peso del bazo de ratones control (inoculados con PBS). \*\*:  $p < 0,01$ ; Prueba de Mann Whitney.

Interesantemente, la producción de IL-10 en plasma y en bazo no resultó afectada por la depleción de las MDSC (Figura 19A y 19B).



**Figura 19.** Grupos de ratones C57BL/6 salvajes fueron inoculados por ruta intraperitoneal con *S. aureus* y posteriormente tratados con 5FU (barras blancas) o no tratados (barras grises). A los 8 días luego de la inoculación se determinaron los niveles de IL-10 en plasma (A) y en el sobrenadante de homogenato de bazo (B). Las cajas y sus bigotes representan los valores obtenidos en cada grupo con sus respectivas medianas, máximo y mínimo. Prueba de Mann Whitney.

#### 4.2.1. Conclusiones parciales

- Las MDSC son las responsables de la anergia observada en las células T CD4 durante la sepsis por *S. aureus*.
- La presencia de MDSC contribuye a la patogenia de la infección sistémica por *S. aureus*.

#### 4.3. Rol de la señalización por TNFR1 en la función inmunosupresora de las MDSC durante la sepsis por *S. aureus*

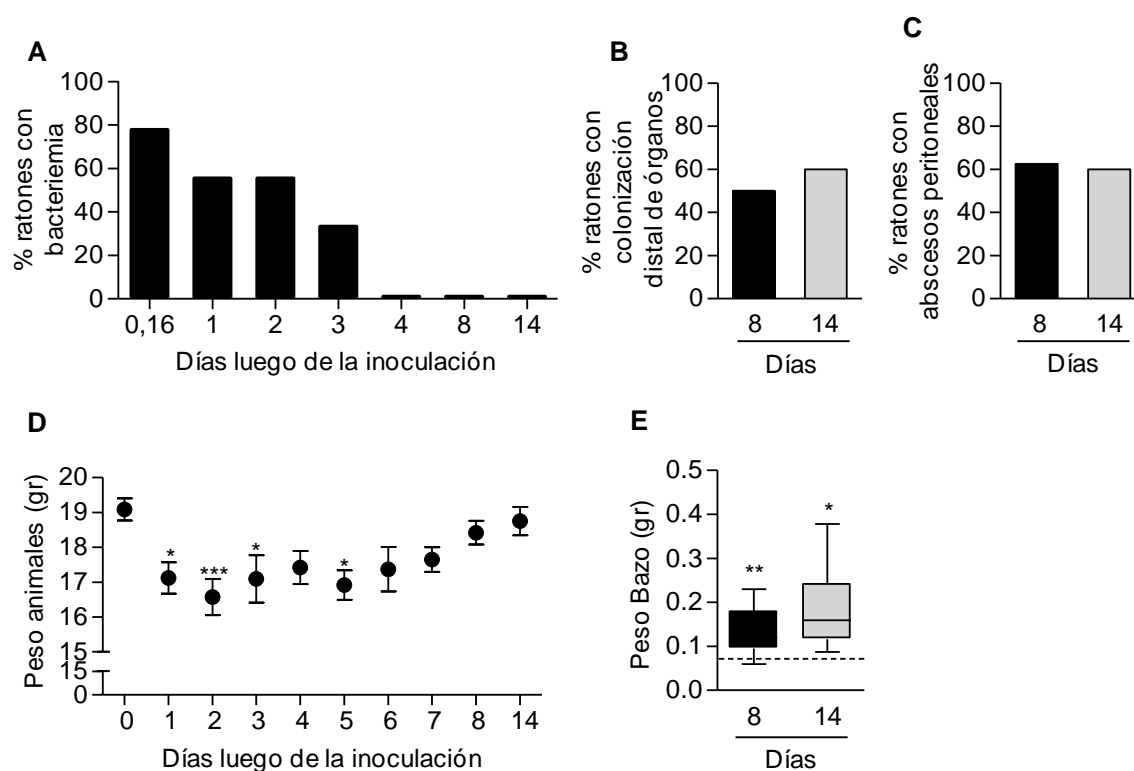
El TNF- $\alpha$  ha sido implicado en los procesos de acumulación y modulación de la funcionalidad de MDSC durante procesos de inflamación crónica (Sade-Feldman M *et al.*, 2013). Asimismo, considerando que la señalización y regulación a través del receptor de TNF- $\alpha$  de tipo I (TNFR1) desempeñan un papel fundamental durante las infecciones sistémicas por *S. aureus* (Giai C *et al.*, 2013) se realizaron estudios en ratones que carecen de la expresión de TNFR1 (*tnfr1*<sup>-/-</sup>) con el objeto de determinar la participación de la señalización vía dicho receptor en la inmunosupresión asociada a la sepsis por *S. aureus*.

##### 4.3.1. Sepsis por *S. aureus* en ratones *tnfr1*<sup>-/-</sup>

Grupos de ratones C57BL/6 *tnfr1*<sup>-/-</sup> de 6 semanas de edad fueron inoculados por ruta intraperitoneal con  $4-8 \times 10^7$  UFC de *S. aureus*. La mortalidad para este grupo de animales fue del 11% y ocurrió dentro de las primeras 48 horas luego del desafío.

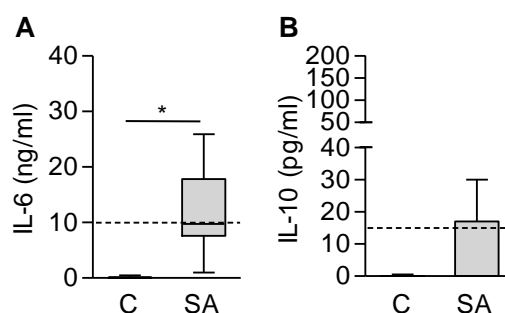


Respecto la tasa de bacteriemia, se observaron resultados similares a los obtenidos con ratones salvajes (Figura 20A). A los 8 y 14 días luego del desafío, se observó la presencia de *S. aureus* en órganos distales (bazo, pulmón, hígado o riñón) con colonización de al menos un órgano en el 50 % de los animales. En forma similar a los hallazgos en ratones C57BL/6 salvajes se observó la formación de abscesos en la cavidad peritoneal y en diferentes órganos como el riñón, bazo, hígado e intestino (rango: 1-2 abscesos) a los 8 y 14 días luego de la inoculación (Figura 20B y 20C). A las 24 horas luego del desafío, los animales sufrieron una pérdida de peso del 10% recuperando su peso inicial en los días subsiguientes (Figura 20D). A los 8 y 14 días luego de la inoculación se observó un aumento significativo en el peso del bazo respecto los animales control (Figura 20E).



**Figura 20.** Grupos de ratones C57BL/6 *tnfr1*<sup>-/-</sup> fueron inoculados por ruta intraperitoneal con  $4-8 \times 10^7$  UFC de *S. aureus*. (A) Se determinó la tasa de bacteriemia diariamente. (B-C) Se determinó el porcentaje de ratones que presentaron uno o más órganos colonizados (B) y abscesos peritoneales (C) a los 8 días (barras negras) y 14 días (barras grises) luego de la inoculación. (D) Diariamente se monitoreó el peso corporal de los animales. \*:  $p < 0,05$ , \*\*\*:  $p < 0,001$ ; Prueba de Anova. (E) Se determinó el peso del bazo a los 8 días (círculos negros) y 14 días (círculos grises) luego de la inoculación. La línea punteada representa el valor medio del peso del bazo para los animales control. \*:  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$ ; Prueba de Mann-Whitney.

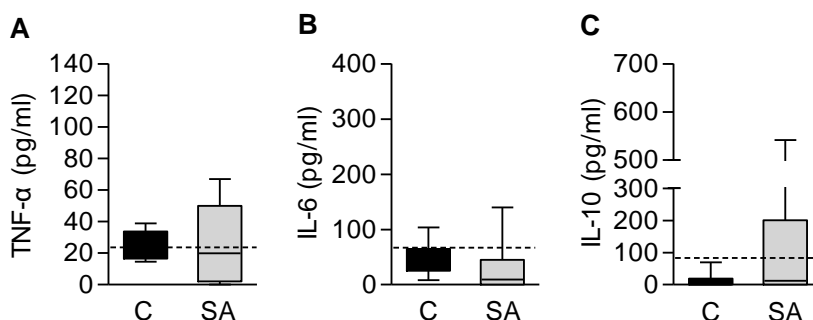
A las 4 horas luego de la inoculación los niveles de IL-6 circulantes fueron significativamente diferentes de los observados en animales inoculados con PBS (control) y similares a los observados en animales salvajes infectados con *S. aureus* (Figura 21A). Por el contrario, no se observó producción significativa de IL-10 en animales deficientes en la expresión de TNFR1 desafiados con *S. aureus* (Figura 21B).



**Figura 21.** Grupos de ratones C57BL/6 *tnfr1*<sup>-/-</sup> fueron inoculados por ruta intraperitoneal con *S. aureus* (barras grises) o PBS (control, barras negras). (A-B) Se cuantificaron los niveles de IL-6 en plasma a las 4 horas luego de la inoculación (A) y de IL-10 en plasma a los 8 días luego de la inoculación (B) mediante ELISA. La línea punteada representa el valor medio del nivel de IL-6 (A) e IL-10 (B) en plasma de animales salvajes infectados con *S. aureus*. Las cajas y sus bigotes representan los valores obtenidos en cada grupo con sus respectivas medianas, máximo y mínimo. \*:  $p < 0,05$ ; Prueba de Mann-Whitney.

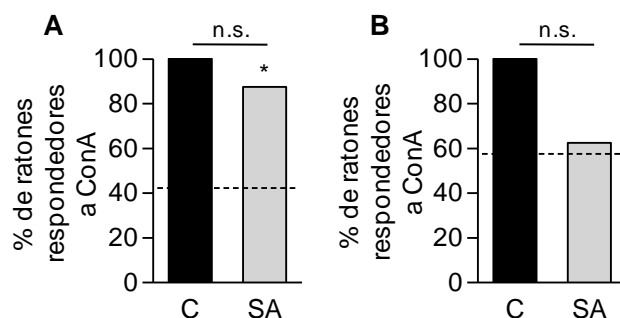
#### 4.3.2. Funcionalidad de los linfocitos T durante la sepsis por *S. aureus* en ausencia de TNFR1

Posteriormente, se determinó el impacto de la ausencia de la señalización por TNFR1 en el microambiente de citoquinas del bazo durante la sepsis por *S. aureus*. Para ello, se cuantificaron los niveles de citoquinas pro- y antiinflamatorias en el sobrenadante de homogenato de bazo de ratones *tnfr1*<sup>-/-</sup> desafiados con *S. aureus*. La infección por *S. aureus* no indujo incrementos en los niveles de TNF- $\alpha$  e IL-6 a los 8 días luego de la inoculación (Figura 22A y 22B). A diferencia de lo observado en animales salvajes, durante la sepsis por *S. aureus* en ausencia de expresión de TNFR1, no se indujo la producción de IL-10 en bazo (Figura 22C).



**Figura 22.** Grupos de ratones C57BL/6 *tnfr1*<sup>-/-</sup> fueron inoculados por ruta intraperitoneal con *S. aureus* (barras grises) o PBS (control, barras negras). Se cuantificaron los niveles de TNF-α (A), IL-6 (B) e IL-10 (C) en el sobrenadante de homogenato de bazo a los 8 días luego del desafío. Las cajas y sus bigotes representan los valores obtenidos en cada grupo con sus respectivas medianas, máximo y mínimo. La línea punteada representa el valor medio del nivel de TNF-α (A), IL-6 (B) e IL-10 (C) en el sobrenadante de homogenato de bazo de animales salvajes infectados con *S. aureus*. Prueba de Mann-Whitney.

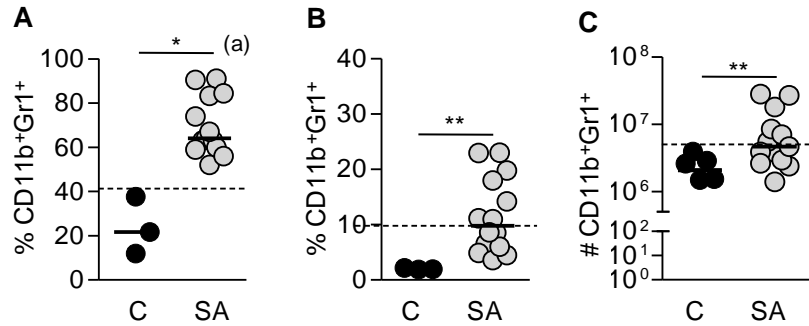
Luego, en forma similar a los estudios realizados en animales salvajes, se evaluó la funcionalidad de los linfocitos T durante la sepsis por *S. aureus* en ausencia de la expresión de TNFR1. Para ello, grupos de ratones *tnfr1*<sup>-/-</sup> fueron inoculados por ruta intraperitoneal con *S. aureus* y a los 8 días luego de la inoculación se determinó la capacidad proliferativa de los linfocitos T esplénicos. Se observó que sólo el 12% de los animales presentó una respuesta T CD4 disminuida con respecto al grupo control (Figura 23A) mientras que el 40% presentó una respuesta T CD8 disminuida (Figura 23B). Estos resultados, al ser comparados con los obtenidos en animales salvajes indican que en ausencia del receptor TNFR1 la sepsis por *S. aureus* no induciría la anergia de células T CD4. Por el contrario en el caso de las células T CD8, la anergia de dicha población no resultó dependiente de la señalización por TNFR1.



**Figura 23.** Grupos de ratones C57BL/6 *tnr1*<sup>-/-</sup> fueron inoculados por ruta intraperitoneal con *S. aureus* (barras grises) o PBS (control, barras negras). A los 8 días luego de la inoculación se evaluó en células T esplénicas la respuesta proliferativa frente a ConA (10 µg/ml). (A-B) Los resultados se expresan como el porcentaje de ratones cuyas células T fueron capaces de proliferar frente al estímulo. Se consideró ratones respondedores a ConA a aquéllos que presentaron una respuesta proliferativa relativa mayor al 90% (se consideró la respuesta proliferativa de los ratones inoculados con PBS como 100%). La línea negra punteada representa el porcentaje de ratones salvajes inoculados con *S. aureus* cuyas células T fueron capaces de responder frente al estímulo con ConA. \*:  $p < 0,05$  (en comparación con el grupo de ratones salvajes), n.s. (no significativo); Prueba exacta de Fisher.

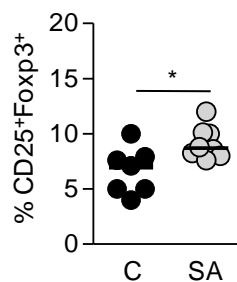
#### 4.3.3. Expansión y acumulación de MDSC durante la sepsis por *S. aureus* en ausencia de la señalización por TNFR1

Considerando que las células T CD4 provenientes de ratones carentes de la expresión de TNFR1 infectados con *S. aureus* no presentaron defectos en su función proliferativa (Figura 23A), a diferencia de lo que ocurre con las células T CD4 provenientes de animales salvajes (Figura 6A) y luego de demostrar que las MDSC inhiben la función de las células T CD4 durante la sepsis por *S. aureus* (Figura 16), se evaluó en primer lugar, la participación de la señalización a través de dicho receptor en la expansión y acumulación de MDSC en médula ósea, bazo y ganglios linfáticos durante la infección por *S. aureus*. En médula ósea se observó una mayor expansión de MDSC en ausencia de la señalización por TNFR1 que la observada en animales salvajes (Figura 24A). La sepsis por *S. aureus* indujo la acumulación de MDSC en bazo de ratones deficientes en TNFR1 a los 8 días luego de la inoculación, en forma similar a lo observado en animales salvajes (Figura 24B y 24C). A diferencia de lo observado en animales salvajes, a los 8 días luego de la inoculación no se detectaron células CD11b<sup>+</sup>Gr1<sup>+</sup> en ganglios linfáticos inguinales de los animales deficientes en TNFR1 (resultados no mostrados).



**Figura 24.** Grupos de ratones C57BL/6 *tnfr1*<sup>-/-</sup> fueron inoculados por ruta intraperitoneal con *S. aureus* (círculos grises) o PBS (control, círculos negros). (A) Se determinó el porcentaje de MDSC (CD11b<sup>+</sup>Gr1<sup>+</sup>) en médula ósea a los 4 y 8 días luego de la inoculación. Se determinó el porcentaje (B) y el número absoluto (C) de MDSC en bazo mediante tinción con anticuerpos específicos y análisis por citometría de flujo. La línea punteada representa la mediana de los valores determinados en animales C57BL/6 salvajes inoculados con *S. aureus*. \*:  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$  (respecto animales control), (a):  $p < 0.01$  (respecto animales salvajes inoculados con *S. aureus*); Prueba de Mann Whitney.

En ausencia de la señalización por TNFR1 se observó una expansión modesta de células Treg en bazo (Figura 25), similar a la observada en animales salvajes (Figura 13). Considerando que las células T CD4 provenientes de ratones carentes de la expresión de TNFR1 no presentaron defectos en su función proliferativa (Figura 23A) y que los niveles de células Treg son equivalentes a los observados en ratones salvajes, estos hallazgos sugieren que dicha población no estaría centralmente involucrada en la anergia de las células T CD4 durante la sepsis por *S. aureus*.

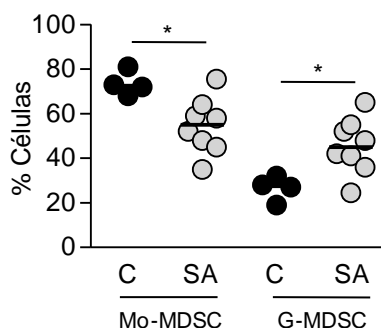


**Figura 25.** Grupos de ratones C57BL/6 *tnfr1*<sup>-/-</sup> fueron inoculados por ruta intraperitoneal con *S. aureus* (círculos grises) o PBS (control, círculos negros). A los 8 días luego de la inoculación el porcentaje de células Treg (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>) esplénicas fue determinado por tinción con anticuerpos específicos y análisis por citometría de flujo. \*:  $p < 0,05$ ; Prueba de Mann Whitney.

#### 4.3.3.1. Fenotipo de las MDSC en ausencia de la señalización del TNFR1

Con el fin de determinar si la ausencia de anergia de las células T en ausencia de expresión de TNFR1 se debía a diferencias en el fenotipo de las MDSC (monocítico o granulocítico) expandido durante la infección, se evaluó la expresión de los marcadores CD11b, Ly6G y Ly6C en las MDSC provenientes de bazo de ratones *tnfr1*<sup>-/-</sup> a los 8 días

luego de la inoculación con *S. aureus*. Se observó que en ausencia de señalización por TNFR1 la población expandida fue la de tipo granulocítico, al igual que lo encontrado en animales salvajes (Figura 26).

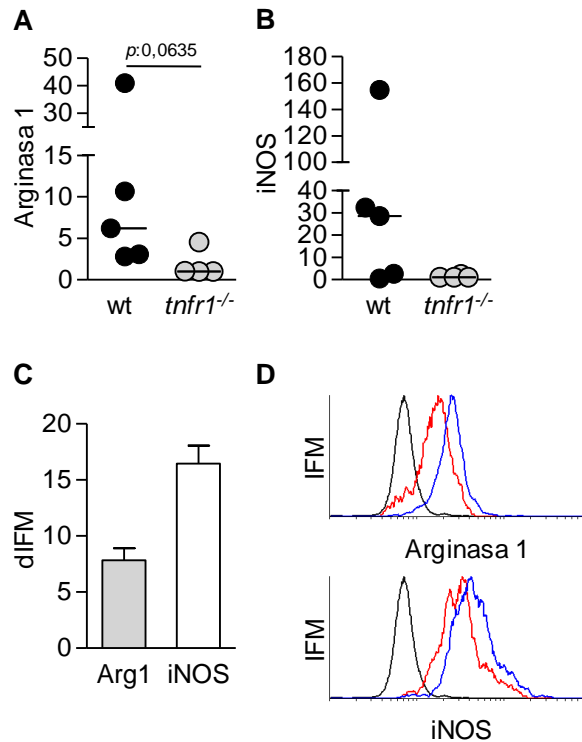


**Figura 26.** Grupos de ratones C57BL/6 *tnfr1*<sup>-/-</sup> fueron inoculados por ruta intraperitoneal con *S. aureus* (círculos grises) o PBS (control, círculos negros). A los 8 días luego de la inoculación las células presentes en bazo fueron caracterizadas en cuanto a la expresión de CD11b, Ly6G y Ly6C. Mo-MDSC: CD11b<sup>+</sup>Ly6C<sup>high</sup>Ly6G<sup>-</sup>. G-MDSC: CD11b<sup>+</sup>Ly6C<sup>low</sup>Ly6G<sup>+</sup>. \*:  $p < 0,05$ ; Prueba de Mann-Whitney.

#### 4.3.4. La función supresora de las MDSC durante la sepsis por *S. aureus* depende de la señalización vía TNFR1

Considerando que la acumulación de MDSC en respuesta a la sepsis por *S. aureus* en el bazo de los ratones *tnfr1*<sup>-/-</sup> fue equivalente a la observada en animales salvajes pero que la anergia de las células T CD4 durante la infección *in vivo* fue dependiente de la señalización por TNFR1, planteamos la hipótesis que las MDSC de ratones *tnfr1*<sup>-/-</sup> sépticos podrían tener un defecto en la actividad supresora *in vivo*. Considerando que las MDSC pueden ejercer su función supresora a través de la expresión de arginasa y óxido nítrico sintasa inducible, se realizó la cuantificación relativa de la expresión de dichas enzimas en las MDSC acumuladas en bazo de animales salvajes en comparación con animales deficientes en TNFR1, a los 8 días luego de la inoculación. La sepsis por *S. aureus* indujo elevados niveles de expresión de Arg1 e iNOS en animales salvajes (Figura 27A y 27B). Por el contrario, los niveles de expresión de Arg1 e iNOS en MDSC provenientes de ratones *tnfr1*<sup>-/-</sup> resultaron bajos y menores a los observados en MDSC provenientes de ratones de tipo salvaje (Figura 27A y 27B). La expresión de las enzimas Arg1 e iNOS a nivel proteico en MDSC esplénicas de ratones salvajes se corroboró mediante tinción con anticuerpos específicos y posterior análisis por citometría de flujo. Se observó el incremento en la producción de Arg1 e iNOS en células CD11b<sup>+</sup>Gr1<sup>+</sup> provenientes de bazo ratones infectados respecto de la observada en animales control (Figura 27C y 27D). Estos resultados sugieren que el microambiente

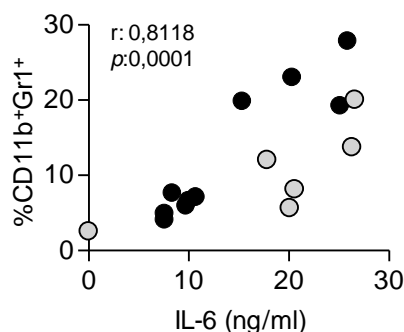
del bazo determinarían la expresión de Arg1 e iNOS y por consiguiente la funcionalidad de las MDSC *in vivo*.



**Figura 27.** Grupos de ratones C57BL/6 salvajes (wt) y *tnfr1*<sup>-/-</sup> fueron inoculados por ruta intraperitoneal con *S. aureus*. (A-B) A los 8 días luego de la inoculación se purificaron las células CD11b<sup>+</sup>Gr1<sup>+</sup> presentes en bazo. Se determinaron los niveles de expresión relativa de Arg1 (A) e iNOS (B) en dicha población mediante RT-PCR de tiempo real para ratones salvajes (wt, círculos negros) y ratones *tnfr1*<sup>-/-</sup> (círculos grises). Prueba de Mann Whitney. (C-D) Se determinó la presencia de Arg1 e iNOS mediante citometría de flujo en las células CD11b<sup>+</sup>Gr1<sup>+</sup> provenientes de ratones salvajes inoculados con *S. aureus* o PBS (control). (C) dIFM: Intensidad de Fluorescencia Media (IFM) infectado – IFM control. Barra gris: dIFM de Arginasa 1. Barra blanca: dIFM de iNOS. (D) Histograma representativo de la intensidad de fluorescencia media de Arg1 e iNOS. Línea negra, isotipo. Línea roja: control. Línea azul: inoculado con *S. aureus*.

#### 4.3.5. Posibles mecanismos de regulación *in vivo* de la acumulación y funcionalidad de las MDSC

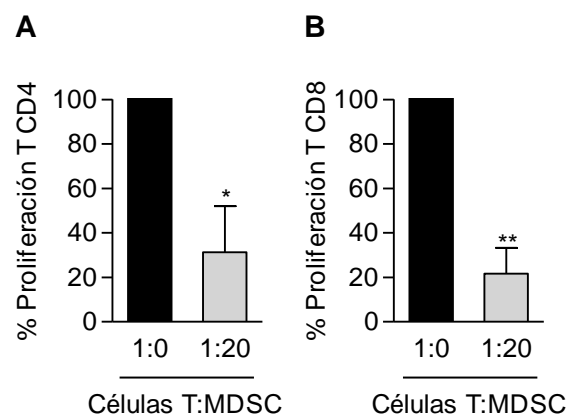
De acuerdo a los estudios realizados, la infección por *S. aureus* induce la acumulación de MDSC en bazo a los 8 días luego de la inoculación en forma independiente de la expresión de TNFR1. Entre las moléculas que pueden participar en el proceso de expansión de las MDSC se ha descrito en tumores a la IL-6. Durante la sepsis por *S. aureus*, se observó una correlación significativa entre el porcentaje de MDSC acumulado en el bazo y los niveles de IL-6 al inicio de la sepsis (Figura 28).



**Figura 28.** Correlación lineal entre los niveles de IL-6 en plasma de ratones C57BL/6 salvajes (puntos grises) y *tnfr1*<sup>-/-</sup> (puntos negros) a las 4 horas luego de la inoculación con *S. aureus* y el porcentaje de MDSC presentes en el bazo de cada animal a los 8 días luego de la inoculación. Prueba de Spearman.

Nuestros resultados indican además, que durante la sepsis por *S. aureus*, la señalización por TNFR1 resulta crítica en el proceso de adquisición de la funcionalidad inmunosupresora de las MDSC. A partir de este hallazgo, surgió el interrogante de si dicho proceso estaba relacionado con la señalización a través de TNFR1 en forma directa, o del microambiente que se generaba en el bazo en respuesta a la señalización vía TNFR1 durante la sepsis por *S. aureus*. A fin de comenzar a comprender dicho procesos se analizó la funcionalidad *in vitro* de las MDSC provenientes de animales deficientes en la expresión del TNFR1 infectados con *S. aureus*. Para ello, se purificaron MDSC a partir de suspensiones celulares de bazo provenientes de ratones *tnfr1*<sup>-/-</sup> a los 8 días luego de la inoculación con *S. aureus* mediante el uso de anticuerpos anti-Gr1 y perlas magnéticas. Las MDSC purificadas se co-cultivaron con esplenocitos vírgenes provenientes de animales *tnfr1*<sup>-/-</sup>. Para ello, los esplenocitos fueron marcados con CFSE y co-cultivados a razón de  $2 \times 10^5$  células por pocillo con diferentes proporciones de MDSC (célulasT:MDSC: 1:0, 1:20). Las células fueron estimuladas con ConA y se cuantificó la proliferación de células T a las 72 horas. Las células fueron cosechadas y teñidas con anticuerpos específicos anti-CD4 y anti-CD8. Se determinó la capacidad de las MDSC de inhibir la proliferación de células T evaluando la intensidad de fluorescencia del CFSE en células T CD4 y T CD8 en los co-cultivos con diferentes proporciones de MDSC respecto de los cultivos en ausencia de MDSC. Las células CD11b<sup>+</sup>Gr1<sup>+</sup> provenientes de ratones *tnfr1*<sup>-/-</sup> presentaron capacidad supresora sobre las células T CD4 y T CD8 (Figura 29A y 29B) en cultivos *in vitro*. El hallazgo que las MDSC provenientes de animales *tnfr1*<sup>-/-</sup> sépticos resultaran ser funcionales en los ensayos *in vitro* resultó sorprendente y sugiere fuertemente que el microambiente generado durante la infección por *S. aureus* define la funcionalidad de las MDSC.

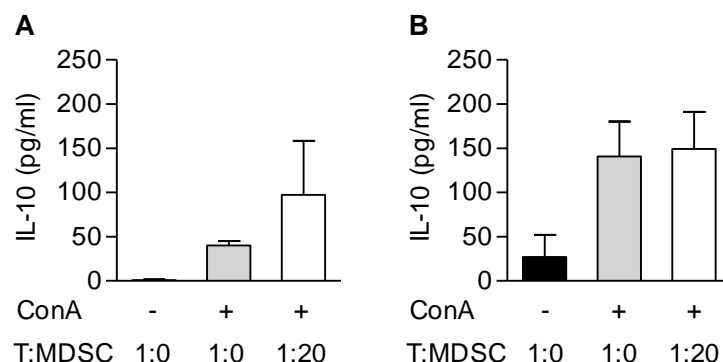




**Figura 29.** Grupos de ratones C57BL/6 *tnfr1*<sup>-/-</sup> fueron inoculados por ruta intraperitoneal con *S. aureus*. A los 8 días luego de la inoculación las células CD11b<sup>+</sup>Gr1<sup>+</sup> (MDSC) presentes en bazo fueron purificadas y posteriormente co-cultivadas con esplenocitos de ratón vírgenes de animales *tnfr1*<sup>-/-</sup> ( $2 \times 10^5$  células por pocillo) en una proporción 1:20 de linfocitos T:MDSC. Los cultivos fueron estimulados con ConA (10µg/ml). Las barras grises representan la proliferación relativa observada para células T CD4 (A) y células T CD8 (B) cultivadas en presencia de MDSC respecto de la proliferación observada en ausencia de células MDSC (barras negras). \*:  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$ ; Prueba *t* no pareada.

Entre las citoquinas que se ha propuesto que podría modular la funcionalidad de las MDSC se encuentra la IL-10 (Pinton L *et al.*, 2016). Esta citoquina no se produjo en el bazo de ratones *tnfr1*<sup>-/-</sup> durante la sepsis por *S. aureus* (Figura 22C), a diferencia de lo observado en los animales salvajes sugiriendo que podría ser responsable de la activación de MDSC *in vivo*. A fin de esclarecer el rol de la IL-10 en la activación de MDSC, en una primera instancia, se cuantificaron los niveles de IL-10 en el sobrenadante de los co-cultivos tanto de MDSC de tipo salvaje como de *tnfr1*<sup>-/-</sup> con esplenocitos vírgenes. Se observó el aumento en los niveles de IL-10 en respuesta a ConA en ambos grupos (Figura 30A y 30B), consistente con la capacidad de ConA para estimular las células T de forma independiente de TNFR1. La presencia de IL-10 en los co-cultivos podría explicar la capacidad supresora de MDSC de ratones *tnfr1*<sup>-/-</sup> sobre las células T observada *in vitro* (Figura 29).

En base a estos hallazgos preliminares, estudios futuros permitirán dilucidar el rol de la IL-10 en la modulación de la función supresora de las MDSC *in vivo*. Asimismo, otras moléculas presentes en el bazo y moduladas por TNFR1 podrían participar en dicho proceso.



**Figura 30.** Grupos de ratones C57BL/6 salvajes (A) y *tnfr1*<sup>-/-</sup> (B) fueron inoculados por ruta intraperitoneal con *S. aureus*. A los 8 días luego de la inoculación las células CD11b<sup>+</sup>Gr<sup>+</sup> (MDSC) presentes en bazo fueron purificadas y posteriormente co-cultivadas con esplenocitos de ratón vírgenes ( $2 \times 10^5$  células por pocillo) en una proporción 1:20 de linfocitos T:MDSC. Los cultivos fueron estimulados con ConA (10µg/ml). A las 72 horas luego del estímulo los niveles de IL-10 fueron medidos en los sobrenadantes de los co-cultivos mediante ELISA. Prueba de Mann Whitney.

#### 4.3.6 Conclusiones parciales

- La anergia observada en las células T CD4 durante la sepsis por *S. aureus* es dependiente de la señalización por TNFR1.
- La expansión y acumulación de MDSC en médula ósea y ganglios linfáticos es dependiente de la señalización por TNFR1.
- Por el contrario, la expansión y acumulación de MDSC en bazo inducida por la sepsis por *S. aureus* es independiente de la señalización por TNFR1 y podría estar regulada por la acción de IL-6.
- La actividad supresora de las MDSC *in vivo* es dependiente de la señalización por TNFR1 al igual que la producción de IL-10 en plasma y bazo.
- El microambiente generado *in vivo*, en respuesta a la señalización por TNFR1, determinaría la funcionalidad de las MDSC y la consiguiente anergia observada en las células T.

## *5. Discusión*

*Staphylococcus aureus* es un patógeno humano de gran importancia médica dado que coloniza e infecta a pacientes hospitalizados así como a individuos sanos inmunocompetentes de la comunidad. En la actualidad, *S aureus* se ha convertido en uno de los principales agentes causales de sepsis (Powers ME *et al.*, 2014).

La sepsis es una enfermedad de gran impacto en la salud pública dada la alta tasa de morbi-mortalidad que posee. Gracias a las mejoras en las medidas de cuidados intensivos en las últimas décadas, un porcentaje creciente de pacientes sobreviven durante el período inicial de respuesta inflamatoria sistémica, pero una proporción significativa de los pacientes finalmente sucumbe frente a infecciones nosocomiales tardías (Cuenca AG *et al.*, 2012). La alta tasa de mortalidad de la sepsis y el limitado éxito de múltiples ensayos clínicos dirigidos a modular la respuesta inmune del huésped (Russell JA, 2006) indican que existe una comprensión muy limitada de la compleja interacción huésped-patógeno que tiene lugar durante esta patología. Aunque existe un consenso creciente de que las muertes asociadas a la sepsis tardía están relacionadas con la inmunosupresión, los múltiples factores que dirigen la supresión de la respuesta inmune aún no han sido completamente dilucidados.

Entre los tipos celulares que podrían estar involucrados en la inmunosupresión durante la sepsis, estudios recientes sugieren que la acumulación de MDSC en órganos linfáticos secundarios y su presencia en circulación podría ser un componente importante de dicho proceso (Sander LE *et al.*, 2010; Cuenca AG *et al.*, 2011).

En el presente trabajo, usando un modelo experimental murino, se demostró que durante la sepsis por *S. aureus* las células CD11b<sup>+</sup>Gr1<sup>+</sup> se expanden y acumulan en médula ósea, bazo y ganglios linfáticos inguinales. La expansión de MDSC y su capacidad supresora sobre las células T durante la sepsis ha sido demostrada previamente utilizando un modelo murino de sepsis polimicrobiana por volcado de contenido intestinal en el cual la etiología del foco infeccioso difiere ampliamente de la estudiada en nuestro trabajo (Delano MJ *et al.*, 2007). Recientemente, en tres estudios diferentes realizados en pacientes sépticos, con infección por bacterias gram negativas o gram positivas, se ha demostrado la presencia de MDSC en circulación y la capacidad de dicha población de suprimir la proliferación de las células T determinada mediante ensayos *in vitro* (Janols H *et al.*, 2014; Uhel F *et al.*, 2017; Mathias B *et al.*, 2017). La expansión de MDSC observada durante la sepsis por *S. aureus* se confirmó utilizando, además de la cepa USA300 FPR3757, una cepa perteneciente al principal clon recuperado de pacientes de la comunidad con infecciones estafilocócicas invasivas con resistencia a meticilina en nuestro país (Sa30, genotipo: ST30, SCCmec tipo IVc, *spa* tipo 019, PVL positivo). En un estudio multicéntrico prospectivo realizado en Argentina en el cual se evaluaron las características clínicas y genotípicas de las cepas de *S. aureus* que

causan infecciones invasivas en la comunidad, se observó que dicho clon ha reemplazado al clon ST5, SCCmec tipo IVa, *spa* tipo 311 (Fernandez S *et al.*, 2013). La cepa Sa30 ha sido recientemente caracterizada en modelos de infección pulmonar, ósea y cutánea (Fernandez S *et al.*, 2017). En el presente trabajo se observó su capacidad de invadir desde un foco peritoneal, colonizando órganos distales. Este proceso se acompañó de la expansión y acumulación de MDSC en bazo y una marcada supresión de la respuesta T *in vivo*.

Considerando que las MDSC son una población heterogénea de células, los resultados de este trabajo permitieron evidenciar que durante la sepsis por *S. aureus* la población que se expandió fue la de tipo granulocítico (G-MDSC: CD11b<sup>+</sup>Ly6G<sup>+</sup>Ly6C<sup>low</sup>), lo cual coincidió con reportes previos sobre MDSC presentes en pacientes sépticos (Janols H *et al.*, 2014; Uhel F *et al.*, 2017; Mathias B *et al.*, 2017). De manera similar, se ha descrito que en infecciones crónicas por *S. aureus*, las MDSC de tipo granulocítico se expanden en mayor proporción que las de tipo monocítico (Tebartz C *et al.*, 2015). Sin embargo, durante la infección pulmonar por *K. pneumoniae* se observó la expansión de MDSC de tipo monocítico lo cual sugiere que el fenotipo que se expande dependerá del microambiente generado en cada nicho como resultado de la interacción de la bacteria con el huésped (Ahn D *et al.*, 2016).

Durante la infección crónica por *S. aureus*, de acuerdo a los estudios realizados en modelos experimentales de infección ósea, se observó que tanto la función de las células T CD4 como la de las células T CD8 resultó modulada negativamente por la actividad supresora de las MDSC (Tebartz C *et al.*, 2015). En el modelo de sepsis utilizado en este trabajo, se observó anergia de las células T CD4 pero la funcionalidad de las células T CD8 se encontró sólo levemente disminuida. Independientemente de la capacidad inhibitoria intrínseca de las MDSC, determinada durante los ensayos *in vitro*, los experimentos de depleción *in vivo* demostraron que las MDSC acumuladas en el bazo eran responsables de la anergia de las células T CD4, pero tenían un papel menor sobre la modulación de la función de las células T CD8. En este sentido, se observó que las MDSC provenientes de médula ósea presentaron, en los ensayos de co-cultivo *in vitro*, capacidad supresora tanto sobre células T CD4 como T CD8. Sin embargo, las MDSC purificadas a partir de bazo mostraron actividad supresora sólo sobre células T CD4, de manera correspondiente a lo observado *in vivo*. Estos resultados sugieren que las células mieloides inmaduras que emigran de médula ósea poseen propiedades supresoras que podrían ser modificadas en el órgano periférico en el cual se reclutan. Asimismo, los hallazgos indican que es probable que otros mecanismos regulatorios, diferentes de la actividad de las MDSC, estén implicados en la modulación de la proliferación de las células T CD8. La ausencia de expansión clonal de las células T durante la infección por

*S. aureus* se acompañó de una capacidad variable de los esplenocitos de producir IFN- $\gamma$  al ser estimulados *in vitro* con ConA. Interesantemente, los niveles de esta citoquina cuantificados en los sobrenadantes de cultivo de los esplenocitos provenientes de distintos animales se correlacionaron negativamente con el porcentaje de MDSC acumuladas en el bazo para cada animal. El impacto que la expansión de MDSC pueda tener sobre la producción de IFN- $\gamma$  tanto por células T como por otros tipos celulares es de particular interés ya que se ha observado que la administración de esta citoquina puede revertir las secuelas adversas de la inmunosupresión en pacientes sépticos (Döcke WD *et al.*, 1997).

A diferencia de lo observado en tumores, donde la presencia de MDSC resulta deletérea para el hospedador ya que disminuye la acción de las células T e impide la eliminación de las células tumorales (Gabrilovich DI *et al.*, 2009), el rol que las MDSC pueden tener en procesos infecciosos es variable y depende tanto del tipo de infección como del patógeno en cuestión (Ost M *et al.*, 2016). En infecciones por micobacterias, la acumulación de MDSC se correlacionó con el desarrollo y la gravedad de la enfermedad (Tsiganov EN *et al.*, 2014) demostrando el rol deletéreo de dicha población en tuberculosis. Por el contrario, en pacientes con infección pulmonar por *P. aeruginosa* se observó que el porcentaje de MDSC en circulación se correlacionaba positivamente con la función pulmonar, lo cual permitió sugerir que las MDSC podrían disminuir la inflamación exacerbada mejorando la funcionalidad del pulmón y destacando el posible rol protector que estas células podrían tener durante la neumonía. (Rieber N *et al.*, 2013). *K. pneumoniae* es agente causal de neumonía severa en el ambiente hospitalario. En modelos experimentales, se observó que la infección por esta bacteria promueve la expansión de MDSC en pulmón y el aumento de los niveles de IL-10. La actividad de dicha población dependiente de IL-10 juega un rol clave en la recuperación de la infección por esta bacteria (Poe SL *et al.*, 2013). En línea con el rol protector de las MDSC se encuentran los estudios realizados en infecciones parasitarias y fúngicas. En infecciones asociadas a parásitos de importancia clínica en Argentina, como *Trypanosoma cruzi*, utilizando un modelo de infección aguda se identificó que las MDSC son beneficiosas para el huésped ya que su presencia reduce la capacidad de replicación del parásito, promueve la resolución de la infección y disminuye la respuesta inflamatoria exacerbada (Arocena AR *et al.*, 2014). Asimismo, utilizando un modelo de infección sistémica por *C. albicans* se describió que las MDSC tiene un rol protector en la candidiasis (Rieber N *et al.*, 2015).

El rol de las MDSC en la inmunosupresión asociada a la sepsis por *S. aureus* no ha sido establecido hasta el presente. Sin embargo, se ha descrito que las MDSC facilitan la persistencia de la bacteria en forma de biopelícula en un modelo de infección

ósea dado que su función supresora impide la actividad proinflamatoria de monocitos y macrófagos (Heim CE *et al.*, 2014). Asimismo, la expansión de las MDSC durante la infección crónica por *S. aureus* se ha asociado con el aumento de la persistencia de la bacteria en el huésped (Tebartz C *et al.*, 2015). Además, ha sido reportado que *S. aureus* regularía negativamente la respuesta inmune cutánea mediante la inducción de MDSC en piel (Skabytska Y *et al.*, 2014). A fin de establecer el rol que las MDSC ejercen durante la inmunosupresión de la sepsis por *S. aureus* en este trabajo se realizaron ensayos de depleción farmacológica de dicha población celular observándose que en ausencia de las MDSC, las células T recuperaron su capacidad proliferativa. La restauración de la actividad de las células T *in vivo*, se acompañó de una menor formación de abscesos en la cavidad peritoneal y en órganos distales. Por lo tanto, los resultados obtenidos sugieren que durante la sepsis por *S. aureus* las MDSC tendrían un rol deletéreo impidiendo la resolución de la infección. En este sentido, en pacientes sépticos la expansión de las MDSC de tipo granulocítico se correlacionó con el mal pronóstico de la enfermedad (Mathias B *et al.*, 2017). A fin de demostrar fehacientemente la asociación entre la expansión de MDSC, la inmunosupresión que las mismas generan y el mayor riesgo de infecciones secundarias serán de gran importancia estudios futuros de coinfección con patógenos oportunistas. En ensayos preliminares de nuestro laboratorio se ha observado una mayor tasa de infección pulmonar por *P. aeruginosa* en ratones sépticos (con foco de infección peritoneal) respecto de ratones sanos. En este modelo será posible evaluar la participación de las MDSC en el desarrollo de infecciones secundarias mediante la depleción farmacológica de las mismas.

Respecto las señales necesarias para la expansión y acumulación de las MDSC se ha propuesto un modelo de dos señales. La primera señal es la responsable de la expansión de las células mieloides inmaduras, lo cual está asociado con la inhibición de su diferenciación terminal, y la segunda es la encargada de la activación funcional de las células mieloides inmaduras convirtiéndolas en MDSC (Figura 2, Condamine T *et al.*, 2011). En cuanto a la primera señal que dirige la expansión y acumulación de las MDSC, se ha observado que el incremento en la proporción de MDSC se correlaciona con un aumento en los niveles de IL-6 durante el desarrollo de cáncer (Mundy-bosse BL *et al.*, 2011; Tsukamoto H *et al.*, 2013; Chen MF *et al.*, 2014). En pacientes sépticos se observó que el porcentaje de MDSC en circulación se correlacionaba con los niveles de IL-6 cuantificados al momento del ingreso a la unidad hospitalaria (Darcy CJ *et al.*, 2014). En este trabajo de investigación, se observó un aumento significativo en los niveles de IL-6 en circulación a las 4 horas luego del desafío con *S. aureus*. Los niveles de IL-6 circulantes se correlacionaron positivamente con el porcentaje de MDSC acumuladas en

bazo a los 8 días luego del desafío sugiriendo un rol para esta citoquina en la expansión de dicha población durante la sepsis causada por *S. aureus*.

Muchas de las vías de señalización activadas por TNF- $\alpha$  participan en el desarrollo de la respuesta inflamatoria sistémica característica de la sepsis (Fournier B *et al.*, 2005). Nuestro grupo de trabajo y otros han demostrado previamente que el TNF- $\alpha$  es crítico para la eliminación de *S. aureus* (Nakane A *et al.*, 1995; Giai C *et al.*, 2013). Los resultados de este trabajo indican que la señalización de TNF- $\alpha$  a través de TNFR1 no es necesaria para la expansión y acumulación de MDSC en bazo. Sin embargo, se observó que el proceso de expansión de MDSC en médula ósea y su acumulación en ganglios linfáticos resultó dependiente de TNFR1. En ratones deficientes en TNFR1 se observó una gran expansión de MDSC en médula. Esto podría deberse en parte a la migración deficiente desde la médula a los ganglios linfáticos en los cuales no se detectaron MDSC. En este sentido, utilizando un modelo de sepsis por inoculaciones repetitivas de LPS, se demostró que en respuesta a la inflamación generada por la endotoxina, las MDSC adquieren su actividad supresora en médula ósea y luego migran a los ganglios linfáticos donde ejercen su función. El receptor que media el tráfico de MDSC hacia los ganglios es el CCR7, principal receptor involucrado en la migración de células hacia este órgano (Landoni VI *et al.*, 2015). Recientemente, se demostró que el TNF- $\alpha$  induce la expresión de CCR7 en líneas celulares de tumores de vesícula biliar. Como consecuencia, se produce la movilización de células tumorales de vesícula biliar al ganglio linfático generando metástasis (Hong H *et al.*, 2016). Por lo tanto, en base a estos trabajos y a nuestros resultados, es posible hipotetizar que durante la sepsis por *S. aureus* la señalización por TNFR1 podría estar involucrada en la modulación de la expresión de CCR7 promoviendo el tráfico de MDSC desde médula ósea hacia los ganglios linfáticos. Por el contrario, la migración de MDSC desde médula al bazo sería independiente de TNFR1. Asimismo, dado que el bazo en ratones es un órgano hematopoyético resta por determinar qué proporción de las MDSC que se encuentran en el órgano durante la sepsis por *S. aureus* corresponden a precursores que migran de médula ósea y cuántas son el resultado de la hematopoyesis local.

Respecto de la segunda señal, que media la actividad de las MDSC, las cascadas de señalización iniciadas por TNFR1 resultaron críticas para que las MDSC adquieran su función supresora *in vivo*. Respecto el rol del TNF- $\alpha$  en la activación funcional de las células CD11b<sup>+</sup>Gr1<sup>+</sup>, se ha descrito que durante la inflamación crónica inducida por antígenos de micobacterias, participa en la inhibición de la diferenciación de las células mieloides inmaduras así como también en la adquisición de la actividad supresora de las MDSC (Sade-Feldman M *et al.*, 2013). Ha sido propuesto que la señalización de TNF- $\alpha$  a través de TNFR2, inhibe la actividad de caspasa 8 promoviendo la supervivencia de las



MDSC en tumores. Asimismo, dicha interacción participa en la activación funcional de las MDSC ayudando a las células tumorales a evadir al sistema inmune (Zhao X *et al.*, 2012). La señalización a través de TNFR2 está principalmente impulsada por el TNF- $\alpha$  asociado a la membrana, mientras que la señalización por TNFR1 está controlada por el TNF- $\alpha$  soluble (Cabal-Hierro L *et al.*, 2012). En el modelo de sepsis, en respuesta a la inoculación de *S. aureus* se induce la activación de TACE y la producción de TNF- $\alpha$  soluble (Gómez MI *et al.*, 2007; Giai C *et al.*, 2013). Por lo tanto, no es inesperado que el TNFR1 esté involucrado en la activación de las MDSC. Asimismo, nuestro grupo de investigación ha demostrado que la proteína A de *S. aureus* mimetiza al TNF- $\alpha$  activando a TNFR1 (Gómez MI *et al.*, 2004; Giai C *et al.*, 2013). Por lo tanto, durante la sepsis por *S. aureus* la proteína A podría participar de los procesos de activación de las MDSC.

Un hallazgo sorprendente fue que a pesar de que la anergia de las células T durante la infección *in vivo* resultó ser dependiente de TNFR1, las MDSC acumuladas en el bazo de ratones deficientes en dicho receptor, al ser purificadas, presentaban actividad supresora *in vitro* sobre células T naive estimuladas con ConA. Este hecho sugiere que el microambiente generado *in vivo* en respuesta a la señalización por TNFR1 y no la expresión del receptor en las MDSC determinaría la funcionalidad de las mismas. Los resultados de este trabajo de tesis indican que durante la sepsis por *S. aureus*, la señalización a través de TNFR1 fue crítica para la inducción de IL-10 tanto sistémica como en el microambiente del bazo. Este hallazgo podría explicar la falta de actividad supresora de las MDSC en los ratones *tnfr1*<sup>-/-</sup> ya que se ha demostrado que la IL-10 producida localmente está implicada en la activación de MDSC en el modelo de infección ósea por *S. aureus* (Heim CE *et al.*, 2015). En este sentido, la IL-10 es una citoquina ampliamente asociada a procesos de inmunosupresión y se ha observado que en pacientes sépticos los niveles de la misma se encuentran elevados y que dichos niveles son predictivos de la mortalidad de los pacientes (Hotchkiss RS *et al.*, 2003). En nuestro modelo, a diferencia de otros (Heim CE *et al.*, 2015), las MDSC de bazo no serían la fuente de IL-10, ya que dicha citoquina no fue detectada en las MDSC purificadas (resultados no mostrados) y a su vez, los niveles de IL-10 no se vieron afectados cuando dicha población fue depletada farmacológicamente. Por lo tanto, el microambiente inducido en respuesta a las cascadas de señalización iniciadas por TNFR1 en células esplénicas podría proporcionar la "segunda señal" y determinaría la actividad de las MDSC durante la sepsis por *S. aureus*. Resta determinar qué células realizarían la señalización cruzada con las MDSC proveyendo la IL-10 y si otras citoquinas no evaluadas en este trabajo pero que se conoce se asocian a procesos de inmunosupresión como el TGF- $\beta$  se encuentran involucradas.

Los microorganismos patógenos han desarrollado diversas estrategias para sostener la expresión activa de los mecanismos inmunosupresores de forma tal de impedir la generación de la respuesta inmune apropiada para su eliminación (Tebartz C *et al.*, 2015). Entre las células del sistema inmune que ejercen esta actividad, además de las MDSC, se encuentran las células Treg (Belkaid Y, 2007; Majlessi L *et al.*, 2008), las células B regulatorias (Breg) (Majlessi L *et al.*, 2008; Mauri C *et al.*, 2008) y las células dendríticas tolerógenicas (Torres-Aguilar H *et al.*, 2010). Dado que las células Treg participan en los procesos de inmunosupresión descritos en el modelo de infección crónica por *S. aureus* (Tebartz C *et al.*, 2015) se evaluó si esta población estaba involucrada en la inmunosupresión asociada a la sepsis estafilocócica. Los resultados obtenidos sugieren que las Treg cumplirían un rol menor en la anergia de las células T ya que la pequeña expansión de esta población que se observó durante la infección con *S. aureus* fue independiente de la señalización a través de TNFR1 a diferencia de la supresión de la respuesta T. Es importante considerar, sin embargo, que la depleción farmacológica de las MDSC no restauró en su totalidad la respuesta T CD4, lo cual sugiere que otros mecanismos regulatorios, además de la expansión de MDSC, estarían involucrados en la inmunosupresión asociada a la sepsis por *S. aureus*. En este sentido, la anergia de las células T dependiente de TNFR1 podría deberse además al impacto directo de la expresión de este receptor en células T.

El rol de la señalización por TNFR1 en células T durante la fase de inmunosupresión de la sepsis se desconoce. La actividad de los linfocitos T se encuentra regulada por un complejo sistema de señales iniciadas tanto por receptores estimulatorios como inhibitorios (Probst HC *et al.*, 2005) lo cual le permite generar una respuesta ante antígenos foráneos e inhibirla frente a autoantígenos (Bardhan K *et al.*, 2016). Uno de los principales receptores inhibitorios es el PD-1 (del inglés: “programmed cell death-1”), el cual se expresa en células T y células B, células natural killer, monocitos y células dendríticas. Cuando PD-1 interacciona con su ligando, PD-L1 (del inglés: “programmed cell death-1 ligand”), se genera una señal inhibitoria, la cual tiene un rol clave en la inmunoregulación de la activación de las células T y en el mantenimiento de la tolerancia inmune (Okazaki T *et al.*, 2013). El eje PD-1/PD-1L también participa en la atenuación en la respuesta inmune frente a virus, bacterias y tumores (Chamoto K *et al.*, 2017) y se ha descrito que se encuentra regulado de forma positiva durante la sepsis (Huang X *et al.*, 2009; Zhang Y *et al.*, 2011; Monaghan SF *et al.*, 2012). La asociación entre niveles elevados de PD-1 y el incremento de infecciones nosocomiales y de la mortalidad en pacientes sépticos ha sido establecida (Guignant C *et al.*, 2011). Más aún, en un modelo de sepsis murina la inhibición de la expresión de PD-1 y PD-L1 se asoció

con un aumento en la supervivencia (Huang X *et al.*, 2009; Brahmamdam P *et al.*, 2010; Young WA *et al.*, 2017; Shindo Y *et al.*, 2017).

El TNF- $\alpha$  es una molécula que puede afectar tanto la expresión de PD-L1, según se observó en líneas celulares de cáncer de colon y próstata (Wuang X *et al.*, 2017), así como la expresión del PD-1 en linfocitos T, según se describió en infecciones virales (Beyer M *et al.*, 2016). En pacientes con cáncer, se observó que la interacción de PD-1 expresado en células T y el PD-L1 presente en las MDSC induce la disminución de la funcionalidad de las células T (Norde WJ *et al.*, 2011). En este sentido, utilizando un modelo animal de tumores, se demostró el potencial terapéutico de los inhibidores de PD-1 y PD-L1 los cuales bloquearon la inmunosupresión asociada a las MDSC (Ozao-Choy J *et al.*, 2009).

Por lo tanto, en base a los antecedentes y a nuestros resultados, es posible hipotetizar que durante la sepsis por *S. aureus*, a través de la interacción del TNF- $\alpha$  con TNFR1, se podría inducir la expresión de PD-1 en las células T y/o de PD-L1 en las MDSC o en otro tipo de esplenocitos, de forma que al interaccionar dichas moléculas se produzca la disminución de la respuesta T. Este mecanismo podría ser parte de las complejas interacciones que, junto con la acción inmunosupresora intrínseca de las MDSC, contribuyen a la inmunosupresión asociada a la sepsis por *S. aureus*.

La expansión de MDSC en condiciones patológicas conduce a un estado de inflamación persistente y al mismo tiempo provoca la anergia de células T lo cual impide el montaje de la respuesta inmune adaptativa. En este trabajo se demostró que las MDSC tienen un papel principal en la supresión de la funcionalidad de las células T CD4 durante la sepsis por *S. aureus*. Nuestro grupo de trabajo ha demostrado previamente que *S. aureus* impacta sobre el sistema TNF- $\alpha$ /TNFR1 a fin de evadir la respuesta inmune del hospedador. En etapas tempranas de la infección sistémica, induce el clivaje de TNFR1 de la membrana, un proceso dependiente de la proteína A, lo cual conduce a elevados niveles de receptor soluble en circulación y la consiguiente neutralización del TNF- $\alpha$ . Mediante este proceso, la bacteria escapa a los mecanismos de erradicación iniciados por TNF- $\alpha$  (Giai C *et al.*, 2013). En el presente trabajo, al evaluar estadios posteriores de la enfermedad, se observa que la señalización de TNF- $\alpha$  vía TNFR1, induce al microambiente que sustenta la actividad supresora de las MDSC, demostrando la importancia de esta citoquina no sólo en la fase proinflamatoria inicial de la sepsis sino también durante la inmunosupresión concomitante y posterior.

Hasta el presente, los reportes en la literatura que vinculan las MDSC con sepsis ascienden a sólo 29 publicaciones originales. Es de destacar que 24 de dichos trabajos fueron publicados dentro del período de desarrollo de esta tesis doctoral. Más aún, sólo recientemente se estudió a esta población en el contexto de las infecciones por *S. aureus*

con 9 trabajos publicados a partir del año 2014. Cabe entonces destacar que, nuestro trabajo constituye la primera evidencia acerca del rol inmunosupresor de las MDSC durante la sepsis por *S. aureus*. Los resultados obtenidos sugieren la potencialidad de considerar a las MDSC como posibles blancos terapéuticos para modular la respuesta inmune en esta patología. No obstante, el conocimiento del tema es aún incipiente y es clara la necesidad de continuar profundizando el estudio de esta área en el futuro.

## *6. Conclusiones*

### 6.1. Conclusiones

- La sepsis por *S. aureus* de origen peritoneal se acompaña de la expansión y acumulación de MDSC en médula ósea, bazo y ganglios linfáticos siendo el fenotipo mayoritario el de tipo granulocítico.
- Las MDSC presentes en médula ósea y bazo durante la sepsis por *S. aureus* poseen capacidad supresora de la proliferación de linfocitos T contribuyendo en forma relevante a la inmunosupresión y la anergia de células T CD4 *in vivo*.
- La expansión de MDSC contribuye a la patogenia de la infección sistémica por *S. aureus*.
- La anergia de las células T CD4 inducida durante la sepsis por *S. aureus* es dependiente de la señalización por TNFR1.
- La expansión y acumulación de MDSC en bazo durante la sepsis por *S. aureus* es independiente de la señalización por TNFR1 y podría estar modulada por la acción de IL-6.
- La señalización por TNFR1 es necesaria para la inducción de la actividad supresora de las MDSC *in vivo*.
- Las cascadas de señalización iniciadas por TNFR1 son críticas para la producción de IL-10 en plasma y bazo durante la sepsis por *S. aureus*.
- El microambiente generado *in vivo*, en respuesta a la señalización por TNFR1, determinaría la funcionalidad de las MDSC y la consiguiente anergia observada en las células T.

## 6.2. Conclusión general

El presente trabajo permitió demostrar por primera vez que las MDSC se encuentran implicadas en los procesos regulatorios que conducen a la inmunosupresión durante la sepsis por *S. aureus*. La expansión y acumulación de MDSC podría estar regulada por IL-6 mientras que el microambiente generado en el bazo en respuesta a la señalización por TNFR1 tendría un impacto significativo en el proceso de adquisición del fenotipo inmunosupresor de las MDSC.

Los resultados obtenidos contribuyen al entendimiento de la patogenia de la sepsis por *S. aureus* y sugieren que las MDSC podrían ser consideradas como potencial blanco de terapias inmunomoduladoras que complementen las terapias convencionales en pacientes sépticos.

## 6.3. Perspectivas futuras

Continuando con el propósito de evaluar la potencialidad de considerar a las MDSC como blanco terapéutico, es necesario obtener un mayor entendimiento de los mecanismos que determinan su funcionalidad durante la infección *in vivo* por *S. aureus*. Para ello, en la siguiente etapa de la investigación se propone establecer la participación del eje TNFR1/IL-10 en la adquisición del fenotipo inmunosupresor de las MDSC durante la sepsis por *S. aureus*. Asimismo, se considerará la participación de otras citoquinas asociadas a procesos de inmunosupresión como TGF- $\beta$  y moléculas co-estimuladoras como PD-1/PD-L1 en la modulación de la actividad de las MDSC. Paralelamente, se evaluará el impacto de la depleción farmacológica de las MDSC sobre la evolución de la sepsis utilizando un modelo de co-infección con *P. aeruginosa* en ratones con sepsis causada por *S. aureus*.

Camila Ledo

Marisa I. Gómez  
Directora de Tesis

Élida Álvarez  
Consejera de estudios

## *7. Referencias Bibliográficas*



- Abraham E, Anzueto A, Gutierrez G, Tessler S, San Pedro G, Wunderink R, Dal Nogare A, Nasraway S, Berman S, Cooney R, Levy H, Baughman R, Rumbak M, Light RB, Poole L, Allred R, Constant J, Pennington J, Porter S. Double-blind randomised controlled trial of monoclonal antibody to human tumour necrosis factor in treatment of septic shock. NORASEPT II Study Group. *Lancet*. 351(9107):929-33. 1998.
- Abraham E, Singer M. Mechanisms of sepsis-induced organ dysfunction. *Critical care medicine* 35(10) 2408-16. 2007.
- Ahn D, Peñaloza H, Wang Z, Wickersham M, Parker D, Patel P, Koller A, Chen EI, Bueno SM, Uhlemann AC, Prince A. Acquired resistance to innate immune clearance promotes *Klebsiella pneumoniae* ST258 pulmonary infection. *JCI Insight*. 1(17):e89704. 2016.
- Angus DC, van der Poll T. Severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med*. 369(21):2063. 2013.
- Arocena AR, Onofrio LI, Pellegrini AV, Carrera Silva AE, Paroli A, Cano RC, Aoki MP, Gea S. Myeloid-derived suppressor cells are key players in the resolution of inflammation during a model of acute infection. *Eur J Immunol*. 44(1):184-94. 2014.
- Bardhan K, Anagnostou T, Boussiotis VA. The PD1:PD-L1/2 Pathway from Discovery to Clinical Implementation. *Front Immunol*. 12;7:550. 2016.
- Barretti P, Moraes TMC, Camargo CH, Caramori JCT, Mondelli AL, Montelli AC, de da Cunha MLRS. Peritoneal dialysis-related peritonitis due to *Staphylococcus aureus*: A single-center experience over 15 years. *PLoS One* 7:1–7. 2012.
- Belkaid Y. Regulatory T cells and infection: a dangerous necessity. *Nat Rev Immunol*. 7(11):875-88. 2007.
- Beyer M, Abdullah Z, Chemnitz JM, Maisel D, Sander J, Lehmann C, Thabet Y, Shinde PV, Schmidleithner L, Köhne M, Trebicka J, Schierwagen R, Hofmann A, Popov A, Lang KS, Oxenius A, Buch T, Kurts C, Heikenwalder M, Fätkenheuer G, Lang PA, Hartmann P, Knolle PA, Schultze JL. Tumour-necrosis factor impairs CD4(+) T cell-mediated immunological control in chronic viral infection. *Nat Immunol*. 17(5):593-603. 2016.
- Black RA, Rauch CT, Kozlosky CJ, Peschon JJ, Slack JL, Wolfson MF, Castner BJ, Stocking KL, Reddy P, Srinivasan S, Nelson N, Boiani N, Schooley KA, Gerhart M, Davis R, Fitzner JN, Johnson RS, Paxton RJ, March CJ, Cerretti DP. A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor- $\alpha$  from cells. *Nature*. 385(6618):729-33. 1997.
- Boomer JS, To Kathleen, Chang Kathy C, Takasu Osamu, Osborne Dale F, Walton Andrew H, Bricker Traci L, Jarman Stephen D, Kreisel Daniel, Krupnick Alexander S, Srivastava Anil, Swanson Paul E, Green Jonathan M, Hotchkiss Richard S. Immunosuppression in patients who die of sepsis and multiple organ failure. *JAMA*. 306:2594–605. 2011.

- Borrelli E, Roux-Lombard P, Grau GE, Girardin E, Ricou B, Dayer J, Suter PM. Plasma concentrations of cytokines, their soluble receptors, and antioxidant vitamins can predict the development of multiple organ failure in patients at risk. *Critical Care Medicine*. 24(3):392–397. 1996.
- Brahmamdram P, Inoue S, Unsinger J, Chang KC, McDunn JE, Hotchkiss RS. Delayed administration of anti-PD-1 antibody reverses immune dysfunction and improves survival during sepsis. *J Leukoc Biol*. 88:233–240. 2010.
- Brudecki L, Ferguson DA, McCall CE, El Gazzar M. Myeloid-derived suppressor cells evolve during sepsis and can enhance or attenuate the systemic inflammatory response. *Infect Immun*. 80(6):2026-34. 2012.
- Brunskill EW, Bayles KW. Identification of LytSR-regulated genes from *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol*. 178:5810–5812. 1996.
- Bunke CM, Brier ME, Golper TA. Outcomes of single organism peritonitis in peritoneal dialysis: gram negatives versus gram positives in the Network 9 Peritonitis Study. *Kidney Int* 52:524–529. 1997.
- Cabal-Hierro L, Lazo PS. Signal transduction by tumor necrosis factor receptors. *Cell Signal*. 24(6):1297-305. 2012.
- Cabrera-Perez J, Condotta SA, Badovinac VP, Griffith TS. Impact of sepsis on CD4 T cell immunity. *J Leukoc Biol*. 96(5): 767–777. 2014.
- Calvano SE, McDonald-Smith GP, Schoenfeld DA, Storey JD, Cobb JP, Warren HS, Moldawer LL, Herndon DN, Lowry SF, Maier RV, Davis RW, Tompkins RG. A genomic storm in critically injured humans. *J Exp Med*. 208:2581–90. 2011.
- Chamoto K, Al-Habsi M, Honjo T. Role of PD-1 in Immunity and Diseases. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2017.
- Chen J, Ye Y, Liu P, Yu W, Wei F, Li H, Yu J. Suppression of T cells by myeloid-derived suppressor cells in cancer. *Hum Immunol*. 78(2):113-119. 2017.
- Chen MF, Kuan FC, Yen TC, Lu MS, Lin PY, Chung YH, Chen WC, Lee KD. IL-6-stimulated CD11b+ CD14+ HLA-DR- myeloid-derived suppressor cells, are associated with progression and poor prognosis in squamous cell carcinoma of the esophagus. *Oncotarget*. 5(18):8716-28. 2014.
- Cheung AL, Nishina KA, Trottonda MP, Tamber S. The SarA protein family of *Staphylococcus aureus*. *Int. J. Biochem. Cell Biol*. 40:355–61. 2008.
- Chiu YW, Mehrotra R. Can we reduce the cardiovascular risk in peritoneal dialysis patients? *Indian J Nephrol* 20:59–67. 2010.
- Claro T, Widaa A, McDonnell C, Foster TJ, O'Brien FJ, Kerrigan SW. *Staphylococcus aureus* protein A binding to osteoblast tumour necrosis factor receptor 1 results in activation of nuclear factor kappa B and release of interleukin-6 in bone infection. *Microbiology* 159:147–54. 2013.

- Cohen J, Abraham E. Microbiologic findings and correlations with serum tumor necrosis factor-alpha in patients with severe sepsis and septic shock. *J Infect Dis.* 180(1):116-21. 1999.
- Condamine T, Gabrilovich DI. Molecular mechanisms regulating myeloid-derived suppressor cell differentiation and function. *Trends Immunol.* 32(1): 19–25. 2011.
- Condamine T, Mastio J, Gabrilovich DI. Transcriptional regulation of myeloid-derived suppressor cells. *J Leukoc Biol.* 98(6):913-22. 2015.
- Cuenca AG , Delano MJ, Kelly-Scumpia KM, Moreno C, Scumpia PO, Laface DM, Heyworth PG, Efron PA, Moldawer LL. A paradoxical role for myeloid-derived suppressor cells in sepsis and trauma. *Mol Med.* 17(3-4):281-92. 2011.
- Cuenca AG, Moldawer LL. Myeloid-derived suppressor cells in sepsis: friend or foe? *Intensive Care Med.* 38(6):928-30. 2012.
- Darcy CJ, Minigo G, Piera KA, Davis JS, McNeil YR, Chen Y, Volkheimer AD, Weinberg JB, Anstey NM, Woodberry T. Neutrophils with myeloid derived suppressor function deplete arginine and constrain T cell function in septic shock patients. *Crit Care.* 18(4):R163. 2014.
- Delano MJ, Scumpia PO, Weinstein JS, Coco D, Nagaraj S, Kelly-Scumpia KM, O'Malley KA, Wynn JL, Antonenko S, Al-Quran SZ, Swan R, Chung CS, Atkinson MA, Ramphal R, Gabrilovich DI, Reeves WH, Ayala A, Phillips J, Laface D, Heyworth PG, Clare-Salzler M, Moldawer LL. MyD88-dependent expansion of an immature GR-1(+)CD11b(+) population induces T cell suppression and Th2 polarization in sepsis. *J Exp Med.* 204(6):1463-74. 2007.
- Felden B. The *Staphylococcus aureus* RNome and Its Commitment to Virulence 7:1–10. 2011.
- Fernandez S, de Vedia L, Lopez Furst MJ, Gardella N, Di Gregorio S, Ganaha MC, Prieto S, Carbone E, Lista N, Rotrying F, Stryjewski ME, Mollerach M. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST30-SCCmec IVc clone as the major cause of community-acquired invasive infections in Argentina. *Infect Genet Evol.* 14:401-5. 2013.
- Fernandez S, Ledo C, Lattar S, Noto Llana M, Bertelli AM, Di Gregorio S, Sordelli DO, Gómez MI, Mollerach ME. High virulence of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* ST30-SCCmecIVc-spat019, the dominant community-associated clone in Argentina. *Int J Med Microbiol.* 307(4-5):191-199. 2017.
- Foster TJ, Geoghegan J, Ganesh V, Höök M. Adhesion, invasion and evasion : the many functions of the surface proteins of *Staphylococcus aureus*. *Nat Rev Microbiol* 12:49–62. 2014.
- Fournier B, Philpott DJ. Recognition of *Staphylococcus aureus* by the innate immune system. *Clin Microbiol Rev.* 18(3):521-40. 2005.
- Gabrilovich DI, Nagaraj S. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat Rev Immunol.* 9(3):162-74. 2009.

- George SM, Harrison DA, Welch CA, Nolan KM, Friedmann PS. Dermatological conditions in intensive care: a secondary analysis of the Intensive Care National Audit and Research Centre (ICNARC) Case Mix Programme database. *Crit Care*.12 Suppl 1:S1. 2008.
- Giai C, Gonzalez C, Ledo C, Garofalo A, Di Genaro MS, Sordelli DO, Gomez MI. Shedding of tumor necrosis factor receptor 1 induced by protein A decreases tumor necrosis factor alpha availability and inflammation during systemic *Staphylococcus aureus* infection. *Infect Immun*. 81(11):4200-7. 2013.
- Giai C, Gonzalez CD, Sabbione F, Garofalo A, Ojeda D, Sordelli DO, Trevani AS, Gómez MI. *Staphylococcus aureus* Induces Shedding of IL-1RII in Monocytes and Neutrophils. *J Innate Immun*. 8(3):284-98. 2016.
- Gilroy DW, Vallance P. Resolution for sepsis? *Circulation*. 111(1):2-4. 2005.
- Goldie SJ, Kiernan-Tridle L, Torres C, Gorban-Brennan N, Dunne D, Kliger AS, Finkelstein FO. Fungal peritonitis in a large chronic peritoneal dialysis population: a report of 55 episodes. *Am. J. Kidney Dis*. 28:86–91. 1996.
- Gómez MI, Lee A, Reddy B, Muir A, Soong G, Pitt A, Cheung A, Prince A. *Staphylococcus aureus* protein A induces airway epithelial inflammatory responses by activating TNFR1. *Nat Med*. 10(8):842-8. 2004.
- Gómez MI, Seaghdha MO, Prince AS. *Staphylococcus aureus* protein A activates TACE through EGFR-dependent signaling. *EMBO J*. 26:701–9. 2007.
- Goodwin AJ, Rice DA, Simpson KN, Ford DW. Frequency, cost, and risk factors of readmissions among severe sepsis survivors. *Crit Care Med*. 43(4):738-46. 2015.
- Guignant C, Lepape A, Huang X, Kherouf H, Denis L, Poitevin F, Malcus C, Chéron A, Allaouchiche B, Gueyffier F, Ayala A, Monneret G, Venet F. Programmed death-1 levels correlate with increased mortality, nosocomial infection and immune dysfunctions in septic shock patients. *Crit Care*. 15:R99. 2011.
- Guillet J, Hallier M, Felden B. Emerging Functions for the *Staphylococcus aureus* RNome. *PLoS Pathog*. 9:e1003767. 2013.
- Hack CE, De Groot ER, Felt-Bersma RJ, Nuijens JH, Strack Van Schijndel RJ, Eerenberg-Belmer AJ, Thijs LG, Aarden LA. Increased plasma levels of interleukin-6 in sepsis. *Blood*. 74(5):1704-10. 1989.
- Harwell CM, Newman LN, Cacho CP, Mulligan DC, Schulak JA, Friedlander MA. Abdominal catastrophe: visceral injury as a cause of peritonitis in patients treated by peritoneal dialysis. *Perit Dial Int* 17:586–594. 1997.
- Hehlgans T, Pfeffer K. The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily:players, rules and the games. *Immunology*. 115(1):1-20. 2005.

- Heim CE, Vidlak D, Scherr TD, Kozel JA, Holzapfel M, Muirhead DE, Kielian T. Myeloid-derived suppressor cells contribute to *Staphylococcus aureus* orthopedic biofilm infection. *J Immunol*. 192(8):3778-92. 2014.
- Heim CE1, Vidlak D, Kielian T. Interleukin-10 production by myeloid-derived suppressor cells contributes to bacterial persistence during *Staphylococcus aureus* orthopedic biofilm infection. *J Leukoc Biol*. 98(6):1003-13. 2015.
- Heim CE2, Vidlak D, Scherr TD, Hartman CW, Garvin KL, Kielian T. IL-12 promotes myeloid-derived suppressor cell recruitment and bacterial persistence during *Staphylococcus aureus* orthopedic implant infection. *J Immunol*. 194(8):3861-3872. 2015.
- Holthoff JH, Wang Z, Patil NK, Gokden N, Mayeux PR. Rolipram improves renal perfusion and function during sepsis in the mouse. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 347(2) 357-64. 2013.
- Hong H, He C, Zhu S, Zhang Y, Wang X, She F, Chen Y. CCR7 mediates the TNF- $\alpha$ -induced lymphatic metastasis of gallbladder cancer through the "ERK1/2 - AP-1" and "JNK - AP-1" pathways. *J Exp Clin Cancer Res*. 35:51. 2016.
- Horiuchi K, Kimura T, Miyamoto T, Takaishi H, Okada Y, Toyama Y, Blobel CP. Cutting edge: TNF-alpha-converting enzyme (TACE/ADAM17) inactivation in mouse myeloid cells prevents lethality from endotoxin shock. *J Immunol*. 179(5):2686-9. 2007.
- Hotchkiss RS, Swanson PE, Freeman BD, Tinsley KW, Cobb JP, Matuschak GM, Buchman TG, Karl IE. Apoptotic cell death in patients with sepsis, shock, and multiple organ dysfunction. *Crit Care Med*. 27(7):1230-51. 1999.
- Hotchkiss RS, Tinsley KW, Swanson PE, Schmiege RE Jr, Hui JJ, Chang KC, Osborne DF, Freeman BD, Cobb JP, Buchman TG, Karl IE. Sepsis-induced apoptosis causes progressive profound depletion of B and CD4+ T lymphocytes in humans. *J Immunol*. 166(11):6952-63. 2001.
- Hotchkiss RS, Tinsley KW, Swanson PE, Grayson MH, Osborne DF, Wagner TH, Cobb JP, Coopersmith C, Karl IE. Depletion of dendritic cells, but not macrophages, in patients with sepsis. *J Immunol*. 168(5):2493-500. 2002.
- Hotchkiss, RS, Karl IE. The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med*. 348(2):138-50. 2003.
- Hotchkiss RS, Nicholson DW. Apoptosis and caspases regulate death and inflammation in sepsis. *Nat Rev Immunol*. 6(11):813-22. 2006.
- Hotchkiss RS, Coopersmith CM, McDunn JE, Ferguson TA. The sepsis seesaw: Tilting toward immunosuppression. *Nat Med*. 15(5): 496–497. 2009.
- Hu X, Li B, Li X, Zhao X, Wan L, Lin G, Yu M, Wang J, Jiang X, Feng W, Qin Z, Yin B, Li Z. Transmembrane TNF- $\alpha$  Promotes Suppressive Activities of Myeloid-Derived Suppressor Cells via TNFR2. *J Immunol*. 192 (3) 1320-1331. 2014.

- Huang X, Venet F, Wang YL, Lepape A, Yuan Z, Chen Y, Swan R, Kherouf H, Monneret G, Chung CS, Ayala A. PD-1 expression by macrophages plays a pathologic role in altering microbial clearance and the innate inflammatory response to sepsis. *Proc Natl Acad Sci U A*. 106:6303–6308. 2009.
- Ilkovitch D. Role of immune-regulatory cells in skin pathology. *J Leukoc Biol*. 89(1):41-9. 2011.
- Janols H, Bergenfelz C, Allaoui R, Larsson AM, Rydén L, Björnsson S, Janciauskiene S, Wullt M, Bredberg A, Leandersson K. A high frequency of MDSCs in sepsis patients, with the granulocytic subtype dominating in gram-positive cases. *J Leukoc Biol*. 96(5):685-93. 2014.
- Kelliher MA, Grimm S, Ishida Y, Kuo F, Stanger BZ, Leder P. The death domain kinase RIP mediates the TNF-induced NF-kappaB signal. *Immunity*. 8(3):297-303. 1998.
- Kern EO, Newman LN, Cacho CP, Schulak JA, Weiss MF. Abdominal Catastrophe Revisited : the Risk and Outcome. *Perit. Dial. Int*. 22:323–334. 2002.
- Klaus G. Prevention and Treatment of Peritoneal Dialysis-Associated Peritonitis in Pediatric Patients. *Perit. Dial. Int*. 25:S117–S119. 2005.
- Klevens RM, Morrison MA, Nadle J, Petit S, Gershman K, Ray S, Harrison LH, Lynfield R, Dumyati G, Townes JM, Craig AS, Zell ER, Fosheim GE, McDougal LK, Carey RB, Fridkin SK. Active Bacterial Core surveillance (ABCs) MRSA Investigators. Invasive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in the United States. *JAMA*. 298(15):1763-71. 2007.
- Krishnan M, Thodis E, Ikonopoulou D, Vidgen E, Chu M, Bargman JM, Vas SI, Oreopoulos DG. Predictors of outcome following bacterial peritonitis in peritoneal dialysis. *Perit Dial Int* 22:573–581. 2002.
- Landoni VI, Martire-Greco D, Rodriguez-Rodriguez N, Chiarella P, Schierloh P, Isturiz MA, Fernández GC. Immature myeloid Gr-1+ CD11b+ cells from lipopolysaccharide-immunosuppressed mice acquire inhibitory activity in the bone marrow and migrate to lymph nodes to exert their suppressive function. *Clin Sci (Lond)*. 130(4):259-71. 2015.
- Lauderdale KJ, Boles BR, Cheung AL, Horwill AR. Interconnections between Sigma B, agr, and Proteolytic Activity in *Staphylococcus aureus* Biofilm Maturation. *Infect. Immun*. 77:1623–1635. 2009.
- Lechner MG, Liebertz DJ, Epstein AL. Characterization of cytokine-induced myeloid-derived suppressor cells from normal human peripheral blood mononuclear cells. *J Immunol*. 185(4):2273-84. 2010.
- Leppänen H, Metsärinne KP, Nikoskelainen J, Tertti R. Three-year analysis of microbial aetiology and antimicrobial susceptibilities of PD peritonitis. *Scand. J. Infect. Dis*. 38:645–9. 2006.

- Long C, Wang Y, Herrera AH, Horiuchi K, Walcheck B. In vivo role of leukocyte ADAM17 in the inflammatory and host responses during E. coli-mediated peritonitis. *J Leukoc Biol.* 87(6):1097-101. 2010.
- Lorente JA, Marshall JC. Neutralization of tumor necrosis factor in preclinical models of sepsis. *Shock. Suppl 1*:107-19. 2005.
- Lowy FD. *Staphylococcus aureus* infections. *N Engl J Med.* 339(8):520-32. 1998.
- Lowy FD. Secrets of a superbug. *Nat Med* 13(12):1418-20. 2007.
- Lui SL, Lo CY, Choy BY, Chan TM, Lo WK, Cheng IK. Optimal treatment and long-term outcome of tuberculous peritonitis complicating continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Am J Kidney Dis* 28:747–751. 1996.
- Majlessi L, Lo-Man R, Leclerc C. Regulatory B and T cells in infections. *Microbes Infect.* 10:1030–1035. 2008.
- Martin FJ, Gomez MI, Wetzel DM, Memmi G, Seaghdha MO, Soong G, Schindler C, Prince A. *Staphylococcus aureus* activates type I IFN signaling in mice and humans through the Xr repeated sequences of protein A. *J. Clin. Invest.* 119:1931–1939. 2009.
- Martire-Greco D, Landoni VI, Chiarella P, Rodriguez-Rodrigues N, Schierloh P, Rearte B, Isturiz MA, Fernandez GC. all-trans-retinoic acid improves immunocompetence in a murine model of lipopolysaccharide-induced immunosuppression. *Clin Sci (Lond).* 126(5):355-65. 2014.
- Mathias B, Delmas AL, Ozrazgat-Baslanti T, Vanzant EL, Szpila BE, Mohr AM, Moore FA, Brakenridge SC, Brumback BA, Moldawer LL, Efron PA and the Sepsis, Critical Illness Research Center Investigators. Human Myeloid-derived Suppressor Cells are Associated With Chronic Immune Suppression After Severe Sepsis/Septic Shock. *Annals of Surgery.* 265(4):827–834. 2017.
- Mauri C, Ehrenstein MR. The ‘short’ history of regulatory B cells. *Trends Immunol.* 29: 34–40. 2008.
- McClure C, McPeak MB, Youssef D, Yao ZQ, McCall CE, El Gazzar M. Stat3 and C/EBP $\beta$  synergize to induce miR-21 and miR-181b expression during sepsis. *Immunol Cell Biol.* 95(1):42-55. 2017.
- McIlwain DR, Lang PA, Maretzky T, Hamada K, Ohishi K, Maney SK, Berger T, Murthy A, Duncan G, Xu HC, Lang KS, Häussinger D, Wakeham A, Itie-Youten A, Khokha R, Ohashi PS, Blobel CP, Mak TW. iRhom2 regulation of TACE controls TNF-mediated protection against Listeria and responses to LPS. *Science.* 335(6065):229-32. 2012.
- McPeak MB, Youssef D, Williams DA, Pritchett C, Yao ZQ, McCall CE, El Gazzar M. Myeloid Cell-Specific Knockout of NFI-A Improves Sepsis Survival. *Infect Immun.* 85(4). 2017.
- Monaghan SF, Thakkar RK, Tran ML, Huang X, Cioffi WG, Ayala A, Heffernan DS. Programmed death 1 expression as a marker for immune and physiological dysfunction in the critically ill surgical patient. *Shock.* 38:117–122. 2012.

- Moss ML, Jin SL, Milla ME, Bickett DM, Burkhart W, Carter HL, Chen WJ, Clay WC, Didsbury JR, Hassler D, Hoffman CR, Kost TA, Lambert MH, Leesnitzer MA, McCauley P, McGeehan G, Mitchell J, Moyer M, Pahel G, Rocque W, Overton LK, Schoenen F, Seaton T, Su JL, Becherer JD. Cloning of a disintegrin metalloproteinase that processes precursor tumour-necrosis factor-alpha. *Nature*. 385(6618):733-6. 1997.
- Movahedi K, Guillems M, Van den Bossche J, Van den Bergh R, Gysemans C, Beschin A, De Baetselier P, Van Ginderachter JA. Identification of discrete tumor-induced myeloid-derived suppressor cell subpopulations with distinct T cell-suppressive activity. *Blood*. 111(8):4233-44. 2008.
- Muenzer JT, Davis CG, Chang K, Schmidt RE, Dunne WM, Coopersmith CM, Hotchkiss RS. Characterization and modulation of the immunosuppressive phase of sepsis. *Infect Immun*. 78(4):1582-92. 2010.
- Mundy-Bosse BL, Young GS, Bauer T, Binkley E, Bloomston M, Bill MA, Bekaii-Saab T, Carson WE 3rd, Lesinski GB. Distinct myeloid suppressor cell subsets correlate with plasma IL-6 and IL-10 and reduced interferon-alpha signaling in CD4<sup>+</sup> T cells from patients with GI malignancy. *Cancer Immunol Immunother*. 60(9):1269-79. 2011.
- Munford RS, Pugin J. Normal responses to injury prevent systemic inflammation and can be immunosuppressive. *Am J Respir Crit Care Med*. 163:316–21. 2001.
- Nagaraj S, Gabrilovich DI. Myeloid-derived suppressor cells in human cancer. *Cancer J*. 16(4):348-53. 2010.
- Nakane A, Okamoto M, Asano M, Kohanawa M, Minagawa T. Endogenous gamma interferon, tumor necrosis factor, and interleukin-6 in *Staphylococcus aureus* infection in mice. *Infect Immun*. 63(4):1165-72. 1995.
- Norde WJ, Maas F, Hobo W, Korman A, Quigley M, Kester MG, Hebeda K, Falkenburg JH, Schaap N, de Witte TM, van der Voort R, Dolstra H. PD-1/PD-L1 interactions contribute to functional T-cell impairment in patients who relapse with cancer after allogeneic stem cell transplantation. *Cancer Res*. 71(15):5111-22. 2011.
- Novick RP. Autoinduction and signal transduction in the regulation of staphylococcal virulence. *Mol. Microbiol*. 48:1429–1449. 2003.
- Okazaki T, Chikuma S, Iwai Y, Fagarasan S, Honjo T. A rheostat for immune responses: the unique properties of PD-1 and their advantages for clinical application. *Nat Immunol*. 14(12):1212-8. 2013
- Opal SM, Fisher CJ Jr, Dhainaut JF, Vincent JL, Brase R, Lowry SF, Sadoff JC, Slotman GJ, Levy H, Balk RA, Shelly MP, Pribble JP, LaBrecque JF, Lookabaugh J, Donovan H, Dubin H, Baughman R, Norman J, DeMaria E, Matzel K, Abraham E, Seneff M. Confirmatory interleukin-1 receptor antagonist trial in severe sepsis: a phase III, randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter trial. The Interleukin-1 Receptor Antagonist Sepsis Investigator Group. *Crit Care Med*. (7):1115-24. 1997.
- Ost M, Singh A, Peschel A, Mehling R, Rieber N, Hartl D. Myeloid-Derived Suppressor Cells in Bacterial Infections. *Front Cell Infect Microbiol*. 6:37. 2016.



Otto GP, Sossdorf M, Claus RA, Rödel J, Menge K, Reinhart K, Bauer M, Riedemann NC. The late phase of sepsis is characterized by an increased microbiological burden and death rate. *Crit Care*.15(4):R183. 2011.

Ozao-Choy J, Ma G, Kao J, Wang GX, Meseck M, Sung M, Schwartz M, Divino CM, Pan PY, Chen SH. The novel role of tyrosine kinase inhibitor in the reversal of immune suppression and modulation of tumor microenvironment for immune-based cancer therapies. *Cancer Res*. 69:2514–2522. 2009

Patil NK, Parajuli N, MacMillan-Crow LA, Mayeux PR. Inactivation of renal mitochondrial respiratory complexes and manganese superoxide dismutase during sepsis: mitochondria-targeted antioxidant mitigates injury. *Am J Physiol Renal Physiol*. 306(7) F734-43. 2014.

Peacock SJ, Howe PA, Day NPJ, Crook DWM, Winearls CG, Berendt AR. Outcome following Staphylococcal peritonitis. *Perit. Dial. Int*. 20:215–219. 2000.

Peranzoni E, Zilio S, Marigo I, Dolcetti L, Zanovello P, Mandruzzato S, Bronte V. Myeloid-derived suppressor cell heterogeneity and subset definition. *Curr Opin Immunol*. 22(2):238-44. 2010.

Pfeffer K. Biological functions of tumor necrosis factor cytokines and their receptors. *Cytokine Growth Factor Rev*. 14(3-4):185-91. 2003.

Pichon C, Felden B. Small RNA genes expressed from *Staphylococcus aureus* genomic and pathogenicity islands with specific expression among pathogenic strains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*. 102:14249–54. 2005.

Piraino B, Hamburger RJ. Complicated multiorganism peritonitis. *Perit. Dial. Int*. 15:394–400. 1995.

Piraino B, Bernardini J, Brown E, Figueiredo A, Johnson DW, Lye WC, Price V, Ramalakshmi S, Szeto CC. ISPD position statement on reducing the risks of peritoneal dialysis-related infections. *Perit. Dial. Int*. 31:614–630. 2011.

Pinton L, Solito S, Damuzzo V, Francescato S, Pozzuoli A, Berizzi A, Mocellin S, Rossi CR, Bronte V, Mandruzzato S. Activated T cells sustain myeloid-derived suppressor cell-mediated immune suppression. *Oncotarget*. 7(2):1168-84. 2016.

Poe SL, Arora M, Oriss TB, Yarlagadda M, Isse K, Khare A, Levy DE, Lee JS, Mallampalli RK, Chan YR, Ray A, Ray P. STAT1-regulated lung MDSC-like cells produce IL-10 and efferocytose apoptotic neutrophils with relevance in resolution of bacterial pneumonia. *Mucosal Immunol*. 6(1):189-99. 2013.

Polz J, Remke A, Weber S, Schmidt D, Weber-Steffens D, Pietryga-Krieger A, Müller N, Ritter U, Mostböck S, Männel DN. Myeloid suppressor cells require membrane TNFR2 expression for suppressive activity. *Immun Inflamm Dis*. 2(2):121-30. 2014.

Powers ME, Bubeck Wardenburg J. Igniting the fire: *Staphylococcus aureus* virulence factors in the pathogenesis of sepsis. *PLoS Pathog*. 10(2):e1003871. 2014.

- Probst HC, van den Broek M. Priming of CTLs by lymphocytic choriomeningitis virus depends on dendritic cells. *J Immunol.* 1;174(7):3920-4. 2005.
- Remick DG, Bolgos GR, Siddiqui J, Shin J, Nemzek JA. Six at six: interleukin-6 measured 6 h after the initiation of sepsis predicts mortality over 3 days. *Shock.*;17(6):463-7. 2002.
- Rieber N, Brand A, Hector A, Graepler-Mainka U, Ost M, Schäfer I, Wecker I, Neri D, Wirth A, Mays L, Zundel S, Fuchs J, Handgretinger R, Stern M, Hogardt M, Döring G, Riethmüller J, Kormann M, Hartl D. Flagellin induces myeloid-derived suppressor cells: implications for *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis lung disease. *J Immunol.* 190(3):1276-84. 2013.
- Rieber N, Singh A, Öz H, Carevic M, Bouzani M, Amich J, Ost M, Ye Z, Ballbach M, Schäfer I, Mezger M, Klimosch SN, Weber AN, Handgretinger R, Krappmann S, Liese J, Engeholm M, Schüle R, Salih HR, Marodi L, Speckmann C, Grimbacher B, Ruland J, Brown GD, Beilhack A, Loeffler J, Hartl D. Pathogenic fungi regulate immunity by inducing neutrophilic myeloid-derived suppressor cells. *Cell Host Microbe.* 17(4):507-14. 2015.
- Rittirsch D, Flierl MA, Ward PA. Harmful molecular mechanisms in sepsis. *Nat Rev Immunol.* 8(10):776-87. 2008.
- Russell JA. Management of sepsis. *N Engl J Med.* 355(16):1699-713. 2006.
- Sade-Feldman M, Kanterman J, Ish-Shalom E, Elnekave M, Horwitz E, Baniyash M. Tumor necrosis factor- $\alpha$  blocks differentiation and enhances suppressive activity of immature myeloid cells during chronic inflammation. *Immunity.* 38(3):541-54. 2013.
- Sander LE, Sackett SD, Dierssen U, Beraza N, Linke RP, Müller M, Blander JM, Tacke F, Trautwein C. Hepatic acute-phase proteins control innate immune responses during infection by promoting myeloid-derived suppressor cell function. *J Exp Med.* 207(7):1453-64. 2010.
- Saravanan S, Thirugnanasambantham K, Hanieh H, Karikalan K, Sekar D, Rajagopalan R, Islam HVI. Mirna-24 and mirna-466i-5p controls inflammation in rat hepatocytes. *Cell Mol Immunol.* 12 113–115. 2015.
- Secher T, Vasseur V, Poisson DM, Mitchell JA, Cunha FQ, Alves-Filho JC, Ryffel B. Crucial role of TNF receptors 1 and 2 in the control of polymicrobial sepsis. *J Immunol.* 182(12):7855-64. 2009.
- Sheng B, Zhao L, Zang X, Zhen J, Chen W. miR-375 ameliorates sepsis by downregulating miR-21 level via inhibiting JAK2-STAT3 signaling. *Biomed Pharmacother.* 86:254-261. 2017.
- Shindo Y, McDonough JS, Chang KC, Ramachandra M, Sasikumar PG, Hotchkiss RS. Anti-PD-L1 peptide improves survival in sepsis. *J Surg Res.* 208:33–39. 2017.
- Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, Bellomo R, Bernard GR, Chiche JD, Coopersmith CM, Hotchkiss RS, Levy MM, Marshall JC, Martin GS, Opal SM, Rubenfeld GD, van der Poll T, Vincent JL, Angus DC. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA.* 315(8): 801–810. 2016.

- Skabytska Y, Wölbing F, Günther C, Köberle M, Kaesler S, Chen KM, Guenova E, Demircioglu D, Kempf WE, Volz T, Rammensee HG, Schaller M, Röcken M, Götz F, Biedermann T. Cutaneous innate immune sensing of Toll-like receptor 2-6 ligands suppresses T cell immunity by inducing myeloid-derived suppressor cells. *Immunity*. 41(5):762-75. 2014.
- Skinner, D, Keefer, CS. Significance of bacteremia caused by *Staphylococcus aureus*. *Arch intern med*. 68: 851-75. 1941.
- Szeto CC, Kwan BCH, Chow KM, Law MC, Pang WF, Leung CB, Li PKT. Repeat peritonitis in peritoneal dialysis: Retrospective review of 181 consecutive cases. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol*. 6:827–833. 2011.
- Tang F, Zhang R, He Y, Zou M, Guo L, Xi T. MicroRNA-125b induces metastasis by targeting stard13 in mcf-7 and mda-mb-231 breast cancer cells. *PLoS One*. 7(5): e35435 2012.
- Tebartz C, Horst SA, Sparwasser T, Huehn J, Beineke A, Peters G, Medina E. A major role for myeloid-derived suppressor cells and a minor role for regulatory T cells in immunosuppression during *Staphylococcus aureus* infection. *J Immunol*. 194(3):1100-11. 2015.
- Torgersen C, Moser P, Luckner G, Mayr V, Jochberger S, Hasibeder WR, Dünser MW. Macroscopic postmortem findings in 235 surgical intensive care patients with sepsis. *Anesth Analg*.108(6):1841-7. 2009.
- Torres-Aguilar H, Aguilar-Ruiz SR, González-Pérez G, Munguía R, Bajaña S, Meraz-Ríos MA, Sánchez-Torres C. Tolerogenic dendritic cells generated with different immunosuppressive cytokines induce antigen-specific anergy and regulatory properties in memory CD4+ T cells. *J. Immunol*. 184:1765–1775. 2010.
- Tracey KJ, Fong Y, Hesse DG, Manogue KR, Lee AT, Kuo GC, Lowry SF, Cerami A. Anti-cachectin/TNF monoclonal antibodies prevent septic shock during lethal bacteraemia. *Nature*. 330(6149):662-4. 1987.
- Troidle L, Gorban-Brennan N, Kliger A, Finkelstein F. Differing outcomes of gram-positive and gram-negative peritonitis. *Am. J. kidney Dis*. 32:623–628. 1998.
- Troidle L, Finkelstein F. Treatment and outcome of CPD-associated peritonitis. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob*. 5:6. 2006.
- Tsiganov EN, Verbina EM, Radaeva TV, Sosunov VV, Kosmiadi GA, Nikitina IY, Lyadova IV. Gr-1dimCD11b+ immature myeloid-derived suppressor cells but not neutrophils are markers of lethal tuberculosis infection in mice. *J Immunol*. 192(10):4718-27. 2014.
- Tsukamoto H, Nishikata R, Senju S, Nishimura Y. Myeloid-derived suppressor cells attenuate TH1 development through IL-6 production to promote tumor progression. *Cancer Immunol Res*. 1(1):64-76. 2013.
- Tzamaloukas AH, Murata GH, Fox L. Peritoneal catheter loss and death in continuous ambulatory peritoneal dialysis peritonitis: correlation with clinical and biochemical parameters. *Perit Dial Int* 13 Suppl 2:S338–40. 1993.

- Uhel F, Azzaoui I, Grégoire M, Pangault C, Dulong J, Tadié JM, Gacouin A, Camus C, Cynober L, Fest T, Le Tulzo Y, Roussel M, Tarte K. Early Expansion of Circulating Granulocytic Myeloid-derived Suppressor Cells Predicts Development of Nosocomial Infections in Patients with Sepsis. *Am J Respir Crit Care Med.* 196(3):315-327. 2017.
- Vallabhapurapu S, Karin M. Regulation and function of NF-kappaB transcription factors in the immune system. *Annu Rev Immunol.* 27:693-733. 2009.
- van der Poll T, Opal SM. Host-pathogen interactions in sepsis. *Lancet Infect Dis.* 8(1):32-43. 2008.
- van Dissel JT, van Langevelde P, Westendorp RG, Kwappenberg K, Frölich M. Anti-inflammatory cytokine profile and mortality in febrile patients. *Lancet.* 351(9107):950-3. 1998.
- Vincent JL, Rello J, Marshall J, Silva E, Anzueto A, Martin CD, Moreno R, Lipman J, Gomersall C, Sakr Y, Reinhart K; EPIC II Group of Investigators. International study of the prevalence and outcomes of infection in intensive care units. *JAMA.* 302(21):2323-2329. 2009.
- Vincent J, Mignot G, Chalmin F, Ladoire S, Bruchard M, Chevriaux A, Martin F, Apetoh L, Rébé C, Ghiringhelli F. 5-Fluorouracil selectively kills tumor-associated myeloid-derived suppressor cells resulting in enhanced T cell-dependent antitumor immunity. *Cancer Res.* 70(8):3052-61. 2010.
- Wang AY, Yu AW, Li PK, Lam PK, Leung CB, Lai KN, Lui SF. Factors predicting outcome of fungal peritonitis in peritoneal dialysis: analysis of a 9-year experience of fungal peritonitis in a single center. *Am. J. Kidney Dis.* 36:1183–1192. 2000.
- Wang L, Song G, Liu M, Chen B, Chen Y, Shen Y, Zhu J, Zhou X. MicroRNA-375 overexpression influences P19 cell proliferation, apoptosis and differentiation through the Notch signaling pathway. *Int J Mol Med.* 37(1):47-55. 2016.
- Wang X, Yang L, Huang F, Zhang Q, Liu S, Ma L, You Z. Inflammatory cytokines IL-17 and TNF- $\alpha$  up-regulate PD-L1 expression in human prostate and colon cancer cells. *Immunol Lett.* 184:7-14. 2017.
- Warady BA, Bakkaloglu S, Newland J, Cantwell M, Verrina E, Neu A, Chadha V, Yap H-K, Schaefer F. Consensus Guidelines for the Prevention and Treatment of Catheter-related Infections and Peritonitis in Pediatric Patients Receiving Peritoneal Dialysis: 2012 Update. *Perit. Dial. Int.* 32:S32–S86. 2012
- Wichterman KA, Baue AE, Chaudry IH. Sepsis and septic shock--a review of laboratory models and a proposal. *J Surg Res.* 29(2):189-201. 1980.

Xiao W, Mindrinos MN, Seok J, Cuschieri J, Cuenca AG, Gao H, Hayden DL, Hennessy L, Moore EE, Minei JP, Bankey PE, Johnson JL, Sperry J, Nathens AB, Billiar TR, West MA, Brownstein BH, Mason PH, Baker HV, Finnerty CC, Jeschke MG, López MC, Klein MB, Gamelli RL, Gibran NS, Arnoldo B, Xu W, Zhang Y, Stearns-Kurosawa DJ, Osuchowski MF, Valentine C, Kurosawa S, Remick DG. The pathogenesis of sepsis. *Annu Rev Pathol.* 6:19–48. 2011.

Xu L, Wen T, Liu Z, Xu F, Yang L, Liu J, Feng G, An G. MicroRNA-375 suppresses human colorectal cancer metastasis by targeting frizzled 8. *Oncotarget.* 7(26):40644-40656. 2016.

Yeh WC, Shahinian A, Speiser D, Kraunus J, Billia F, Wakeham A, de la Pompa JL, Ferrick D, Hum B, Iscove N, Ohashi P, Rothe M, Goeddel DV, Mak TW. Early lethality, functional NF-kappaB activation, and increased sensitivity to TNF-induced cell death in TRAF2-deficient mice. *Immunity.* 7(5):715-25. 1997.

Young WA, Fallon EA, Heffernan DS, Efron PA, Cioffi WG, Ayala A. Improved survival after induction of sepsis by cecal slurry in PD-1 knockout murine neonates. *Surgery.* 161:1387–1393. 2017.

Zhang XM, Guo L, Chi MH, Sun HM, Chen XW. Identification of active mirna and transcription factor regulatory pathways in human obesity-related inflammation. *BMC Bioinf.* 16:76. 2015.

Zhang Y, Li J, Lou J, Zhou Y, Bo L, Zhu J, Zhu K, Wan X, Cai Z, Deng X. Upregulation of programmed death-1 on T cells and programmed death ligand-1 on monocytes in septic shock patients. *Crit Care.* 15:R70. 2011.

Zhao X, Rong L, Zhao X, Li X, Liu X, Deng J, Wu H, Xu X, Erben U, Wu P, Syrbe U, Sieper J, Qin X. TNF signaling drives myeloid-derived suppressor cell accumulation. *J Clin Invest.* 122(11): 4094–4104. 2012.

Zheng L, Li X, Gu Y, Lv X, Xi T. The 3'utr of the pseudogene cyp4z2p promotes tumor angiogenesis in breast cancer by acting as a cerna for cyp4z1. *Breast Cancer Res. Treat.* 150 105–118. 2015.