



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

“Evaluación de la activación de STAT3, STAT5 y p38 a nivel unicelular en leucocitos humanos”

TESIS QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA

GRACIELA LIBIER CABRERA RIVERA



MÉXICO, D.F.

2014



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: PROFESOR: Rodolfo Pastelin Palacios

VOCAL: PROFESOR: Mónica Berenice Heras Chavarría

SECRETARIO: PROFESOR: Lourdes Andrea Arriaga Pizano

1er SUPLENTE: PROFESOR: Mario Adán Moreno Eutimio

2° SUPLENTE: PROFESOR: Julio Cesar Martínez Álvarez

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

UNIDAD DE INVESTIGACIÓN MÉDICA EN INMUNOQUÍMICA (UIMIQ) DEL HOSPITAL DE ESPECIALIDADES DEL CENTRO MÉDICO NACIONAL SIGLO XXI DEL INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL (IMSS)

ASESOR DEL TEMA: DRA. LOURDES ANDREA ARRIAGA PIZANO

(Nombre y firma)

SUPERVISOR TÉCNICO: M.en.C. ESTEBAN DOMÍNGUEZ CEREZO

(Nombre y firma)

SUSTENTANTE: GRACIELA LIBIER CABRERA RIVERA

(Nombre y firma)

Trabajo financiado por el Fondo Sectorial de investigación en Salud y Seguridad Social SS/IMSS/ISSSTE/CONACyT con el proyecto clave SALUD-2013-01-202621.

ABREVIATURAS

ACCP-SCCM	<i>American College of Chest Physicians and Society of Critical Care Medicine</i> ó Colegio Americano de Médicos del Tórax / Sociedad de Medicina de Cuidados Críticos
APC	<i>Antigen Presenting Cell</i> ó Célula Presentadora de Antígeno
CARS	<i>Compensatory Anti-inflammatory Response Syndrome</i> ó Síndrome de Respuesta Anti-inflamatoria Compensatoria
CLP	<i>Cecal Ligation and Puncture</i> ó Ligadura y Punción Cecal
CLR	<i>C-type Lectin Receptors</i> ó Receptores de Lectina tipo C
PBMC	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i> ó Células Mononucleares de Sangre Periférica
DAMPs	<i>Damage-associated molecular patterns</i> ó Patrones Moleculares Asociados a Daño
GM-CSF	<i>Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor</i> ó Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos y Monocitos
GM-CSFR	<i>Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor Receptor</i> ó Receptor del Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos y Monocitos
HLA	<i>Human Leukocyte Antigen</i> o Antígeno Leucocitario Humano
IL-10	<i>Interleukin 10</i> ó Interleucina 10
IL-10R1	<i>Interleukin 10 Receptor</i> ó Receptor de Interleucina 10
IL-13	<i>Interleukin 13</i> ó Interleucina 13
IL-1β	<i>Interleukin 1β</i> ó Interleucina 1 β
IL-1R1	<i>Interleukin-1 Receptor 1 β</i> ó Receptor 1 de interleucina 1 β
IL-1R2	<i>Interleukin-1 Receptor 2 β</i> ó Receptor 2 de interleucina 1 β
IL-4	<i>Interleukin 4</i> ó Interleucina 4
IL-6	<i>Interleukin 6</i> ó Interleucina 6
IL-6Rα	<i>Interleukin 6 Receptor α</i> ó Receptor α de interleucina 6
JAK-STAT	<i>Janus Activated Kinase / Signal Transducer and activator transcription</i> ó Janus cinasa activada / Transductores de señal y activadores de la transcripción
LLO	<i>Listeriolysin O</i> u Listeriolisina O
LPS	<i>Lipopolysaccharide</i> ó Lipopolisacárido
MAPK	<i>Mitogen activated protein kinase</i> ó Cinasas Activadas por Mitógenos
MARS	<i>Mixed Antagonist Response Syndrome</i> ó Síndrome de Respuesta Antagonista Mixta
NfκB	<i>Nuclear factor-Kβ</i> ó Factor Nuclear-kB
NLR	<i>NOD-like receptor</i> ó Receptor tipo NOD
PAMPs	<i>Pathogen-Associated Molecular Patterns</i> ó Patrones Moleculares Asociados a Patógenos
PRR	<i>Pattern Recognition Receptor</i> ó Receptor de Reconocimiento de Patron
RLR	<i>RIG-like receptor</i> ó Receptor tipo RIG
SIRS	<i>Systemic Inflammatory Response Syndrome</i> ó Síndrome de Respuesta Inflamatoria Sistémica
TGF-β	<i>Transforming Growth Factor-β</i> ó Factor de Crecimiento Transformante β
TLR	<i>Toll-like Receptor</i> ó Receptor tipo Toll

TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i> ó Factor de Necrosis Tumoral
TNF-R1	<i>Receptor 1 Tumor Necrosis Factor</i> ó Receptor 1 del Factor de Necrosis Tumoral
TNF-R2	<i>Receptor 2 Tumor Necrosis Factor</i> ó Receptor 2 del Factor de Necrosis Tumoral

ÍNDICE

Resumen.....	1
Introducción	
-Vías de señalización JAK- STAT Y MAPK	3
-Vías de señalización e inflamación.....	6
-Vías de señalización activadas por citocinas	8
- Inflamación sistémica y redireccionamiento transduccional.....	9
-Técnicas para evaluar vías de señalización.....	15
-Ventajas de la citometría de flujo para la evaluación de las vías de señalización.....	16
Objetivo general.....	20
Objetivo particular.....	20
Material y Métodos.....	21
Resultados.....	23
Discusión.....	38
Conclusión.....	44

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

<i>Figura 1.</i> Esquema general de la señalización por citocinas.....	5
<i>Figura 2.</i> Entidades clínicas definidas por la ACCP / SCCM que muestra la progresión a formas más graves de sepsis y el desarrollo de la disfunción múltiple de órganos.....	11
<i>Tabla 1.</i> Definición de signos de SIRS de la American College of Chest Physicians y la Society of Critical Care Medicine (ACCP/SCCM)	10
<i>Figura 3.</i> Evolución de la respuesta inflamatoria en sepsis.....	12
<i>Figura 4.</i> Estrategia de análisis para la identificación de las poblaciones activadas con los diferentes estímulos utilizados.....	24
<i>Figura 5.</i> La fosforilación de STAT-3, p38 y STAT-5 aumenta en células estimuladas con IL-10, LPS y GM-CSF respectivamente	26
<i>Figura 6.</i> El uso de patrones de tamaño, complejidad y activación son insuficientes para caracterizar las poblaciones mieloides	27
<i>Figura 7.</i> PECy7 no es un fluorocromo adecuado para uso de identificación de monocitos	28
<i>Figura 8.</i> GM-CSF induce la fosforilación de STAT-5 en monocitos y granulocitos.....	30
<i>Figura 9.</i> IL-10 induce la fosforilación de STAT-3 en monocitos y linfocitos.....	32
<i>Figura 10.</i> LPS induce la fosforilación de p38 en monocitos y granulocitos.....	34
<i>Figura 11.</i> Monocitos de pacientes con SIRS, pero no sepsis, fosforilan STAT-5 de manera basal en comparación con los voluntarios sanos	35
<i>Figura 12.</i> Monocitos de pacientes con sepsis fosforilan STAT-3 de manera basal en comparación con los voluntarios sanos o pacientes con SIRS.....	36
<i>Figura 13.</i> Monocitos de pacientes con SIRS o sepsis disminuyen la activación basal de p38 de manera basal en comparación con los voluntarios sanos.....	37

Resumen

La capacidad de respuesta de las células a diferentes estímulos depende de que expresen receptores que, al unirse con su ligando, activan vías de señalización que derivan, en algunas ocasiones, en cambios en la expresión génica. Durante la respuesta inflamatoria en leucocitos y otras células de estirpe no inmunológica, el lipopolisacárido (LPS) de bacterias Gram-, así como otros patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), pueden ser reconocidos por receptores de patrones moleculares asociados a patógenos o daño (PRRs), con lo que se fosforila p38 que activa al factor de transcripción AP-1, favoreciendo así la expresión de quimiocinas y citocinas pro-inflamatorias. Por otro lado, citocinas como GM-CSF e IL-10 que al unirse a sus receptores, inducen la fosforilación de transductores de señal como STAT-5 y STAT-3 que activan la expresión de diversos genes, incluyendo los involucrados en proliferación y diferenciación celular, apoptosis, y aquellos relacionados con la respuesta inflamatoria. Varias evidencias sugieren que la respuesta inflamatoria se modifica si se exponen previamente las células a otros estímulos. Así, en procesos como el síndrome de respuesta inflamatoria (SIRS) o en sepsis, se sugiere que el ambiente pro-inflamatorio sistémico induce alteraciones funcionales de los leucocitos que condiciona a los pacientes a mayor susceptibilidad a infecciones agregadas. Sin embargo, al momento se ignora si en pacientes con SIRS o sepsis estas alteraciones funcionales incluyen el re-direccionamiento de las vías de señalización activadas por PAMPs o citocinas. El Western Blot es un método frecuentemente utilizado para estudiar las proteínas fosforiladas a partir de homogeneizados o lisados celulares, que entre sus desventajas presenta el requerimiento de gran número de células, así como que los niveles de fosforilación detectados representan el valor promedio de todas estas células, por lo que, en muestras con celularidad heterogénea, es imposible discriminar la activación diferencial de cada tipo celular. La técnica de citometría de flujo permite evaluar los estados de fosforilación en células íntegras e individualmente, por ejemplo, en sangre periférica, se puede evaluar la respuesta que cada leucocito tiene ante diferentes estímulos inflamatorios. Como primer paso para evaluar la señalización en leucocitos de pacientes con SIRS/sepsis, nos planteamos estandarizar la técnica de

citometría de flujo para detectar las formas fosforiladas de STAT-3, STAT-5 y p38 en leucocitos humanos de sangre periférica. Se estimularon 50 μ L de sangre periférica de un voluntario sano o paciente con SIRS/sepsis, con IL-10, GM-CSF ó LPS durante 15 minutos. Se permeabilizaron las células con metanol al 70% y se incuban 1 h con los anticuerpos de identificación α -CD45, α -CD14 y α -STAT-3, α -STAT-5 ó α -p38, de acuerdo al estímulo. Se observó que con LPS se induce la fosforilación de p38 tanto en monocitos como en granulocitos, mientras que la fosforilación de STAT-3 en respuesta a IL-10 se da tanto en monocitos como linfocitos. En los granulocitos y monocitos, aunque no en los linfocitos, se induce la fosforilación de STAT-5 por GM-CSF. Pudimos comprobar en pacientes con sepsis que, en referencia a sujetos sanos, es menor la activación de p38 ante LPS y mayor la fosforilación de STAT-3 y 5. En conclusión, la estandarización lograda de la metodología nos permitirá, con pequeños volúmenes de sangre periférica como muestra, analizar a nivel unicelular la respuesta de diferentes leucocitos circulantes de sujetos sanos y de aquellos con patologías inflamatorias complejas.

Introducción

Los procesos celulares pueden ser activados por estímulos extracelulares, los cuales en algunas ocasiones son reconocidos por receptores ubicados en las membranas de estas células. Este reconocimiento ligando-receptor puede derivar en modificaciones en la permeabilidad o arquitectura de la membrana plasmática, así como también puede tener efectos sobre otros organelos como mitocondrias, aparato de Golgi, retículos o el núcleo, en donde se asocia con activación o inhibición de la expresión génica. Aún cuando el ligando extracelular no sea internalizado en la célula, estas respuestas son posibles gracias a las llamadas vías de señalización, de segundos mensajeros o transducción de señales, que se caracterizan por la activación o inactivación secuencial de proteínas efectoras que derivan en la modificación de la función celular. En varias de estas vías de señalización la activación de las proteínas efectoras depende de la fosforilación o defosforilación de las mismas, por lo que uno de los primeros efectos del estímulo inicial será sobre la actividad de las cinasas y/o fosfatasas que participan en la vía acoplada al receptor, lo que a su vez modificará los estados de fosforilación de sus sustratos. De allí que varias de las técnicas que estudian la transducción de señales se enfoquen en las fosfoproteínas o formas fosforiladas de estas proteínas efectoras. Algunas de las vías de transducción mejor descritas corresponden al sistema receptor/efector/segundo mensajero. Por ello es frecuente tanto nombrar como estudiar las vías de acuerdo a estos componentes.

- Vías de señalización JAK-STAT y MAPK

Los receptores tirosin-cinasa (ó RTK por *Receptor Tyrosine Kinases*) medían las respuestas de las células ante distintos inductores, como factores de crecimiento, hormonas, quimiocinas y citocinas. Estos RTK son glicoproteínas transmembranales que poseen un dominio tirosina cinasa intracelular, que activa a las proteínas efectoras mediante fosforilación. Existen principalmente cuatro vías de señalización que se inducen por miembros de la familia de los RTK: 1) cinasas activadas por mitógenos (ó

MAPK por *Mitogen activated protein kinase*), 2) Fosfotidilinositol 3 cinasa (ó PI3K por *Phosphatidylinositol 3 kinase*), 3) JAK-STAT (ó por *Janus Activated Kinase y Signal Transducers and Activators of Transcription*) y 4) Fosfolipasa C γ (ó PLC γ por Phospholipase C γ).¹

La vía de JAK-STAT, se induce principalmente con la presencia de citocinas y factores de crecimiento. Participa en múltiples respuestas, entre las que se incluyen proliferación, diferenciación, migración, apoptosis, y supervivencia de las células, dependiendo de la señal, el tejido, y el contexto celular. Así, las vías JAK-STAT son esenciales para procesos como génesis de glándulas mamarias, hematopoyesis, desarrollo de células del sistema inmunológico, y la respuesta inflamatoria².

En la actualidad se conocen cuatro miembros de la familia de JAKs en los mamíferos: JAK-1, JAK-2, JAK-3 y Tyk-2, las cuales se constituyen por aproximadamente mil aminoácidos³.

Cuando algún receptor acoplado a estas proteínas efectoras se une a su ligando, ocurren cambios conformacionales que favorecen que las JAK, puedan fosforilarse entre sí (la una a la otra). Las proteínas JAK fosforiladas ejercen su actividad de cinasa sobre las proteínas STATs (STAT-1 , STAT-2. STAT-3 , STAT-4, STAT-5a , STAT-5b ó STAT-6) las cuales se dimerizan y entran al núcleo , en donde se unen directamente al ADN para modular la transcripción de diferentes genes (Figura 1)⁴

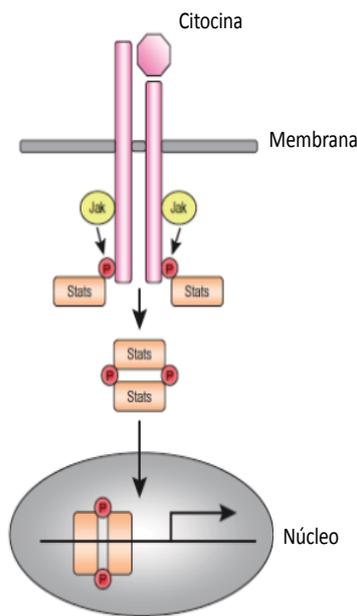


Figura 1: Esquema general de la señalización por citocinas
(Modificado de Matsukawa 2007)

Como se mencionó previamente, la vía de señalización de MAPK es parte de los RTK. Está es una vía ubicua, utilizada en diferentes tipos de células eucariotas. Al momento se han descrito cinco tipos de cinasas MAP (ó MAPK) : MAP4K, MAP3K, MAP2K, MAPK y cinasas activadoras de proteínas MAPK (ó MAPKAPK por *MAPK- activated protein kinases*). Dependiendo el miembro de la familia MAPK que es activado, las vías se clasifican en: (i) cinasas relacionadas con señales extracelulares (ó ERK por *extracellular signal-related kinases*) 1 y 2 (ii) cinasas Jun amino -terminal (ó JNK por *jun amino-terminal kinases*) 1, 2 y 3, (iii) de p38-MAPK y (iv) ERK5 .⁵

Diferentes estímulos, activan diferentes vías MAPK. Así, mientras los factores de crecimiento se consideran los principales inductores de la cascada ERK1 / 2, el estrés celular es el principal inductor de la JNK y p38-MAPK ,así como también factores de crecimiento o el estrés celular como activadores de ERK 5. Existe evidencia que las diferentes vías de señalización pueden cooperar entre ellas para transmitir ciertas señales ante diferentes inductores⁶.

En cuanto a p38, se induce por estrés celular y citocinas inflamatorias (como IL-1 β , TNF- α e IL-6) o PAMP's (como LPS), así mismo los factores de crecimiento son capaces de activar débilmente esta vía. La cinasa p38 juega un papel central en la regulación de la respuesta inflamatoria ante las citocinas y PAMPs ya mencionados, como por ejemplo en la expresión de otros mediadores pro-inflamatorios (como IL-8), adhesión leucocitaria durante el reclutamiento de células hacia los tejidos, estallido respiratorio y degranulación; así como también desempeña un papel importante en el control de punto de verificación del ciclo celular, en G0, G1 / S y G2 / M, de una manera específica en la célula. Hay cuatro miembros de la familia p38-MAPK: MAPK11 (p38- α), MAPK12 (p38- β), MAPK13 (p38- δ) y MAPK14 (p38- γ), que muestran expresión diferencial en los tejidos y llevan a cabo funciones diferentes.⁷

Se puede clasificar a p38-MAPK como un supresor de tumor o un oncogen, ya que tiene un papel importante en la prevención de la proliferación celular en respuesta a estrés celular, así como el aumento de la angiogénesis en respuesta a un ambiente hipóxico causado por una masa tumoral. Las mutaciones en la vía de señalización de p38-MAPK son poco comunes, sin embargo se ha demostrado que la vía p38-MAPK se desregula en presencia de tumores malignos hematológicos, cáncer de mama, próstata, gástrico y de pulmón⁸.

-Vías de señalización e inflamación

La inflamación es la respuesta de tejidos vascularizados ante una lesión, infección o situación de estrés, la cual es un mecanismo de protección, que participa en la eliminación de los agentes nosológicos, limita el daño y media el proceso de reparación del tejido dañado⁹. En la respuesta inflamatoria aguda localizada, las células residentes del tejido liberan quimiocinas y citocinas, que activan a las células endoteliales y reclutan a leucocitos de circulación¹⁰. Esta respuesta inicial depende del reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (ó PAMPs por *Pathogen Associated*

Molecular Patterns) o daño (ó DAMPs por *Damage Associated Molecular Patterns*). Los receptores que reconocen a estos patrones (ó PRRs por *Pattern Recognition Receptor*) se expresan tanto en la membrana como el citoplasma de leucocitos, células epiteliales y queratinocitos entre otras estirpes celulares¹¹. Los PRRs se clasifican en diferentes tipos como son: receptores tipo Toll (ó TLR por *Toll Like Receptor*), receptores tipo RIG (ó RLR por *RIG Like Receptor*), NLR (ó por *Nod Like Receptor*) y receptores tipo lectina C (ó CLR por *C-type Lectin Receptors*). En el caso de los TLRs se han descrito 11 tipos, los cuales reconocen diferentes componentes de membrana o intracelulares de bacterias, como el ácido lipoteicoico que activa TLR2, LPS que se une a TLR4, flagelina a TLR5 y DNA o RNA que se unen a TLR3 y TLR9.¹²

Así como reconocen diferentes tipos de ligandos, los TLRs pueden activar distintas proteínas efectoras de señalización. TLR4 junto con CD14 forma parte del receptor que reconoce a lipopolisacárido (LPS) en monocitos¹³. La unión de LPS a la porción externa de TLR4 induce la unión del dominio TIR con una proteína adaptadora conocida como MyD88 (por *Myeloid differentiation primary response gene 88*). La activación de MyD88 activa cinasas que seguirán simultáneamente dos diferentes vías de señalización, una que permite la formación de un dímero de la cinasa IKK (por *I kappa B kinase*) que fosforila a una proteína de inhibición conocida como IκB (por *inhibitor of kappa B*), la que, en condiciones basales, se encuentra unida a NF-κB (por *Nuclear Factor κB*) e inhibe la traslocación de este último al núcleo. Así, una vez fosforilada IκB, NFκB se transloca al núcleo, activando la transcripción génica¹⁴. La otra vía que activa TLR4 depende de la activación de TAK1 (por *TGF-β-activated kinase 1*) que activa MAPK, como JNK y p38, que tienen efecto sobre el factor de transcripción AP-1. Tanto la activación de NFκB (por la degradación de su inhibidor) como de AP-1 favorece la transcripción de genes implicados en la respuesta inflamatoria a LPS como TNF-α, IL1β, IL6, GM-CSF, IL10 e IL-12¹⁵. Cabe señalar que NF-κB puede estar constituido por diferentes unidades y que tendrán diferentes consecuencias en la expresión génica. Así si es un heterodímero p50/p65 se

inducen genes que expresarán a IL-1 α , IFN- γ , GM-CSF e IL-1 β mientras que los homodímeros p50/p50 inhiben esta función de p50/p65¹⁶.

-Vías de señalización activadas por citocinas

Otros mediadores inflamatorios, como las citocinas IFN- γ , IL-10, IL-12, IL-13 y GM-CSF activan las vías de señalización de las proteínas JAK y STAT¹⁷. Los receptores que reconocen a citocinas pueden expresarse en la membrana de las células o encontrarse de forma soluble. Estos receptores están formados por dos a tres proteínas, las cuales reconocen a la misma citocina con diferente afinidad. Estos diferentes tipos de receptores suelen encontrarse asociados a diferentes vías de señalización. Así por ejemplo, el factor de necrosis tumoral α (ó TNF- α por *Tumor Necrosis Factor α*) actúa a través de sus receptores TNF-R1 ó TNF-R2, que se expresan en neutrófilos, macrófagos, monocitos y células endoteliales¹⁸. Estos dos receptores a TNF llevan a cabo dos eventos de señalización opuestos. En general, cuando TNF- α se une al TNF-R1 desencadena una cascada de señalización que resulta en apoptosis. En contraste, la activación dada por TNF-R2, especialmente en las células T activadas, induce la activación de vías de señalización como NF- κ B y vía de las MAPK las cuales desencadenan señales de supervivencia de las células que pueden resultar en la proliferación celular¹⁹. Dependiendo entonces del tipo de receptor para TNF- α que expresen las células, es que esta citocina puede promover una gran variedad de respuestas²⁰.

Para la interleucina 1 (IL-1) existen dos receptores: IL-1R1 o IL-1R2. El tipo 1 (IL-1R1), se describe como un receptor que tiene la capacidad de señal de transmisión, provocada tanto por IL-1 α y IL-1 β . El dominio intracelular de IL-1R1 es responsable de iniciar los procesos de señalización en las células diana, activando principalmente la vía de NF- κ B, lo que promueve la co-estimulación, activación y secreción de otras citocinas así como también de proteínas de fase aguda; su acción en células del hipotálamo produce fiebre. Los de tipo 2 (IL-1R2) son receptores señuelo, ya que carecen del dominio de transmisión de señales intracelulares. IL-1R2 se puede encontrar asociado a

la membrana plasmática y en formas solubles secretadas. Ambas formas del receptor se unen fuertemente a IL-1 β ; sin embargo, no son capaces de iniciar vías de señalización^{20,21}.

El factor estimulante de colonias granulocitos- macrófagos (GM-CSF) regula la supervivencia, proliferación, y diferenciación de los monocitos/macrófagos, al activar a JAK2 y STAT-5, después de unirse a su receptor (GM-CSFR) presente en estas células. GM-CSFR se compone de una cadena α de unión al ligando y la cadena β_c común de la familia de receptores de citocinas²².

La interleucina 10 (IL-10), a través de su receptor IL-10R presente en la membrana de monocitos, macrófagos, linfocitos T, linfocitos B y células dendríticas, activa, por fosforilación, a la molécula JAK1 que a su vez activa a STAT-3. IL-10 suprime la respuesta inmunológica, al disminuir la expresión en la membrana de las células de las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (ó MHC II por *Major Histocompatibility Complex II*), de moléculas de co-estimulación como CD86 y de adhesión como CD54^{20,23}.

-Inflamación sistémica y redireccionamiento transduccional

A diferencia de la respuesta inflamatoria aguda, en la inflamación sistémica, los mediadores inflamatorios se pueden encontrar en circulación y la activación endotelial estar generalizada; además se activa el sistema del complemento y las cascadas de coagulación.

Este tipo de inflamación sistémica, da lugar a lo que clínicamente se conoce como síndrome de respuesta inflamatoria sistémica ó SIRS (por *Systemic Inflammatory Response Syndrome*)²⁴. Para el diagnóstico de SIRS se requiere de que presenten dos o más de los siguientes signos: Fiebre o hipotermia, taquicardia, taquipnea o hipoxia y leucocitosis, leucopenia o bandemia (Tabla 1)^{25,26}.

Síndrome de Respuesta Inflamatoria Sistémica (SIRS)

Fiebre: Temperatura corporal mayor a 38°C

Hipotermia: Temperatura corporal menor a 36°C

Taquicardia: Frecuencia cardíaca mayor a 90 latidos/min

Taquipnea: Frecuencia Respiratoria mayor a 20 respiraciones /min o PaCO₂ menor a 32 torr (menor a 4.3 kPa).

Leucocitosis: cuenta leucocitaria mayor a 12,000 células /mm³

Leucopenia: cuenta leucocitaria menor a 4,000 células /mm³

Bandemia: Formas inmaduras(bandas) de más del 10%

Tabla 1: Definición de signos de SIRS de la American College of Chest Physicians y la Society of Critical Care Medicine (ACCP / SCCM) (Nyström 1998).

Si el paciente manifiesta dos o más de los criterios ya mencionados de SIRS y además se encuentra evidencia de infección, se denomina sepsis (Figura 2)²⁷.

La sepsis es causada tanto por infecciones bacterianas, fúngicas o virales y los sitios más frecuentes en donde se localizan estos focos infecciosos son pulmones, abdomen y vías urinarias. A pesar de que se creía que las bacterias Gram-positivas eran los principales agentes que causan sepsis (52,1%), en la actualidad hay cada vez más pruebas de que la sepsis causada por bacterias Gram-negativas ocurre también con alta frecuencia (37,6%)²⁸.

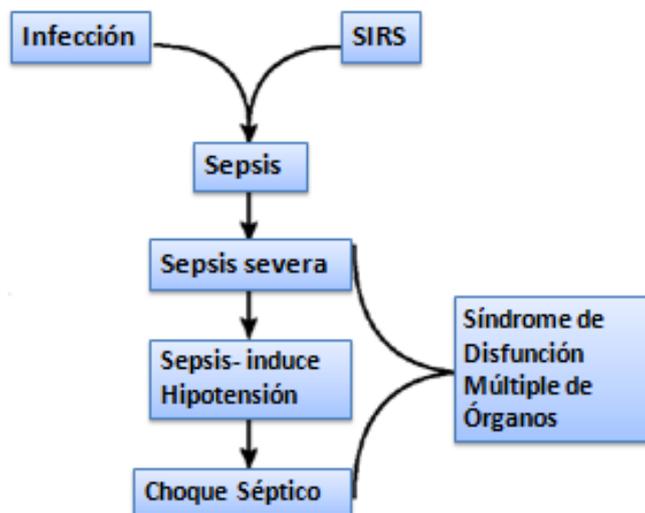


Figura 2 : Entidades clínicas definidas por la ACCP / SCCM que muestra la progresión a formas más graves de sepsis y el desarrollo de la disfunción múltiple de órganos. (Modificado : Nyström 1998).

De acuerdo a su severidad, la sepsis se clasifica en sepsis grave, la cual se caracteriza por la presencia de disfunción orgánica o hipo-perfusión tisular; y en choque séptico en donde persiste la hipotensión a pesar del tratamiento médico²⁹.

La respuesta inmunológica en sepsis, se plantea que se desarrolla en diferentes etapas, una pro y otra anti-inflamatoria, (Figura 3). En la fase inicial de la sepsis se propone que prevalece una respuesta inflamatoria hiperactiva donde células endoteliales, epiteliales, neutrófilos, macrófagos y linfocitos secretan mediadores pro-inflamatorios como el factor de necrosis tumoral (TNF- α) e interleucinas (IL- 1 β , 6 y 8)³⁰. En respuesta a esta fase inflamatoria y como parte de los mecanismos de compensación, se propone que se desarrolla el Síndrome de Respuesta Anti-inflamatoria Compensatoria ó

CARS (por *Compensatory Anti-inflammatory Syndrome*), durante el cual se producen mediadores anti-inflamatorios como IL-10, IL-13 y TGF- β , así como disminuye la expresión en macrófagos de moléculas del complejo principal de histocompatibilidad tipo II (ó HLA-DR por *Human Leukocyte Antigen-DR*)³¹.

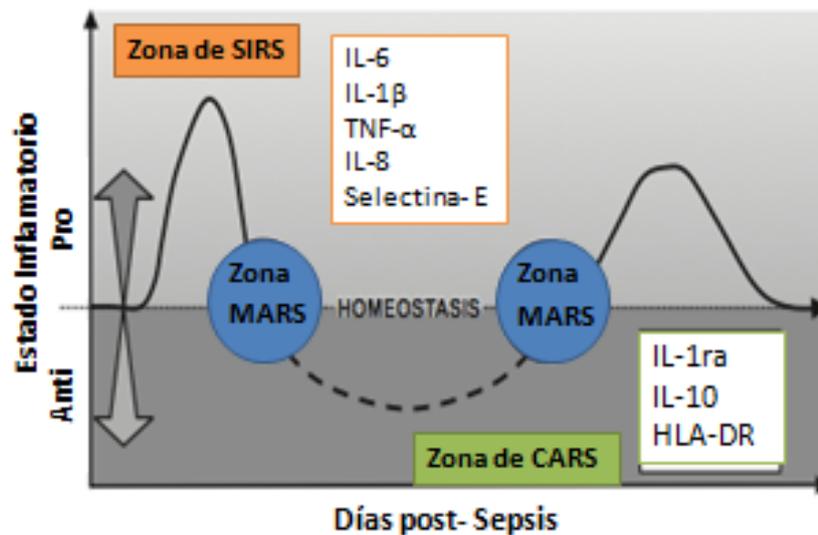


Figura 3: Evolución de la respuesta inflamatoria en sepsis. Durante la sepsis, hay un cambio inmediato y fuerte hacia un estado de hiper-inflamación (SIRS) definido por una liberación excesiva de las citocinas pro-inflamatorias en sangre. Tras el curso del tiempo SIRS disminuye gradualmente y cambia a un estado hipo-inflamatorio (CARS) que se caracteriza por una liberación de citocinas anti-inflamatorias. El período de transición temporal entre SIRS y CARS se define como MARS y cuenta con un equilibrio entre los mediadores pro-y anti-inflamatorios.³²

Algunos autores proponen que la prevalencia del estado anti-inflamatorio condiciona a los pacientes a un estado de inmunosupresión transitoria, denominada “parálisis inmune”³³ durante el cual, primordialmente los leucocitos son incapaces de responder a PAMPs, lo que se asociaría con una mayor susceptibilidad a infecciones por agentes oportunistas.

Así, por ejemplo, en el modelo de ligadura y punción cecal (ó CLP por *Cecal Ligation and Puncture*), en el cual se induce sepsis en ratones, estos disminuyen su capacidad para eliminar *Pseudomona aeruginosa* en comparación con los ratones controles. Estos mismos especímenes tienen mayor susceptibilidad para desarrollar aspergilosis³⁴. En otro estudio con ratones se demostró que la neutralización de IL-10 utilizando anticuerpos anti-IL-10 disminuye la frecuencia de infección pulmonar secundaria con *Pseudomona aeruginosa*³⁵. También se ha reportado que los niveles de IL-10 se correlacionan con resultados fatales en pacientes con sepsis³⁶.

Entre los mecanismos celulares y moleculares que se desarrollan durante el fenómeno de “inmunosupresión” en padecimientos como sepsis, se encuentran tanto la disminución de poblaciones de leucocitos así como de sus funciones. Por ejemplo en modelos de CLP, en el cual se induce sepsis en animales, se observa una pérdida importante de células dendríticas (ó DC por *Dendritic Cells*) esplénicas lo cual puede explicar la parálisis inmunológica causada por este padecimiento ya que estas células, son un vínculo crítico entre el sistema inmune innato y el sistema inmune adaptativo, la cual funciona como célula presentadora de antígeno profesional (ó APC por *Antigen Presenting Cell*), lo que conduce a un compromiso significativo en la función de linfocitos T. Las anomalías en la homeostasis de las DC, han sido relacionadas con varias enfermedades humanas incluyendo el cáncer, enfermedades autoinmunes, alergia e infecciones³⁷.

En cuanto a los linfocitos T, se ha descrito una menor respuesta a mitógenos como concanavalina A o Fitohemaglutinina después de un traumatismo en ratas; esta disminución en la proliferación de linfocitos se caracteriza por una mayor expresión de co-receptores inhibitorios (PD-1, CD47, CTLA4) en estas células, así como también una disminución en la expresión de moléculas co-activadoras (CD28). Por lo tanto estas anomalías en los mecanismos de defensa que involucran a células del sistema inmunológico, puede contribuir a una mayor incidencia de sepsis después de un traumatismo o hemorragia

31,38

Otro mecanismo que se encuentra involucrado en la disminución de la respuesta por parte de las células del sistema inmunológico en pacientes con sepsis es la apoptosis. El reconocimiento de estas células apoptóticas, por macrófagos y células dendríticas, estimula la liberación de citocinas anti-inflamatorias, incluyendo IL-10 y TGF- β , creando un ambiente anti-inflamatorio que finalmente conduce a la supresión de citocinas pro-inflamatorias³¹.

Además de la disminución en cantidad o en las funciones de diferentes tipos celulares, se ha descrito al fenómeno de "tolerancia" el cual puede definirse como la falta de respuesta transitoria de células a la estimulación repetida o prolongada con algún estímulo específico, el cual podría estar involucrado en pacientes con sepsis en donde se observa una respuesta refractaria, donde las células de los pacientes no responden de manera eficiente ante estímulos pro-inflamatorios *in vitro*²⁴. Un ejemplo de esto es la llamada "tolerancia al LPS", en donde se ha observado que una activación repetida de macrófagos *in vitro* con LPS puede provocar un estado de "tolerancia", ya que a pesar de que la expresión de genes como el TNF α , son inducibles con LPS, si la estimulación es continua la producción de su mRNA disminuye ante una segunda exposición con una concentración mayor de LPS³⁹, este fenómeno también se ha descrito con otros ligandos de TLR, incluyendo el ácido lipoteicoico y flagelina⁴⁰. Sin embargo, también hay genes inducibles por LPS que continúan expresándose aun después de la estimulación continua con el PAMP y puede aumentar su expresión en una segunda exposición con una concentración mayor del activador²⁴.

El llamado "redireccionamiento" de las vías de transducción, puede ser una alternativa que puede explicar este fenómeno de susceptibilidad a la infección en pacientes con SIRS/sepsis. En un estudio reciente en ratones, en los que se les desarrolla bacteremia por bacterias Gram negativas (con *Escherichia coli*) ó Gram positivas (con *Listeria monocytogenes*), se estudiaron los estados de fosforilación inducidos por ligandos de TLR o citocinas en linfocitos, monocitos/macrófagos y células dendrítica. Nolan y colaboradores encontraron que la exposición previa a bacterias Gram+ activan las

moléculas STAT-1, STAT-3 , STAT-5 y p38, pero que disminuye su capacidad de respuesta ante estimulaciones posteriores con IL-6 o GM-CSF. Además encontraron que la disminución de la respuesta se debía, al menos en parte, a la endocitosis de los receptores a IL-6 en linfocitos T. En síntesis, estos autores proponen que la exposición a mediadores pro-inflamatorios, como las citocinas o ligandos de TLRs, más que simplemente hiper-estimular al sistema, pueden redireccionar las vías de señalización involucradas en la respuesta inflamatoria, generando estados refractarios que comprometen la eficiencia de la respuesta inmune⁴¹.

- *Técnicas para evaluar vías de señalización*

El análisis de las vías de señalización en sistemas con tipos de células heterogéneas como células mononucleares de sangre periférica humana (ó PBMC por *Peripheral Blood Mononuclear Cells*) , esplenomegalocitos murinos, células de médula ósea o sangre periférica, revelan la respuesta promedio del tejido , sin diferenciar entre la actividad de cada tipo celular presente en la muestra, ya que para esto se requiere de la evaluación de vías de señalización en tipos celulares purificados.⁴²

Para obtener resultados específicos de una determinada población celular, la utilización de métodos tradicionales como el Western Blot, requiere de la separación y clasificación de las células antes de su análisis por lo que se modifican las condiciones, que pueden afectar tanto la activación como los estados de fosforilación de las células. Además de requerirse una gran cantidad de muestra si las poblaciones a analizarse tienen poca frecuencia y /o proporción en el tejido ⁴³.

Una ventaja de la aplicación de técnicas de análisis citómico que permiten analizar célula por célula, como la citometría de flujo, es que se pueden identificar los eventos de señalización en cada una de estas células y por lo tanto identificar entre las poblaciones celulares que reaccionan o no a los estímulos. Además, se puede caracterizar si existe sincronía o no en las respuestas de estas células ante la misma condición que activa la señalización. Y todo ello se puede analizar concentrados celulares que no

necesariamente requirieron purificarse ni antes ni después de la estimulación aunque sí se requiere que las células se encuentren en suspensión, por lo que tejidos sólidos debes de pasar por un proceso de disgregación. Así, por ejemplo se pueden activar linfocitos de sangre periférica con diversas citocinas y posteriormente evaluar la fosforilación de MAPK tales como ERK, p38, y JNK o STAT en diferentes tipos de células (Linfocitos T, Linfocitos B, células NK)^{43,44}.

El análisis de subconjuntos de células complejas o heterogéneas y de células que comprenden menos del 1% del total de células, como por ejemplo los precursores de células B, suele ser costoso por Western Blot debido a la utilización de reactivos a utilizar para la separación y clasificación de las células (separación magnética), además de que esta manipulación excesiva de las células puede ocasionar cambios involuntarios en los estados de fosforilación de las proteínas a evaluar⁴³.

-Ventajas de la citometría de flujo para la evaluación de vías de señalización

Los recientes avances en el marcaje de epítopos intracelulares tales como los receptores de estrógeno, citocinas y proteínas específicas como Bcl-2 y la ciclooxigenasa, nos puede dar una idea de las respuestas celulares ante estímulos a largo plazo, sin embargo no producen información sobre los eventos de señalización que ocurren rápidamente después de la estimulación de células o cuando se les induce un estado de estrés^{45,46}.

Por lo que una de las técnicas que analiza con alta eficiencia a nivel unicelular poblaciones heterogéneas (como los leucocitos de sangre periférica), es la citometría de flujo, la cual permite no solo identificar a los diferentes leucocitos circulantes, sino también caracterizarlos por inmunofenotipo y funcionalidad, aprovechando dos de sus principales ventajas: su capacidad de hacer análisis multiparámetros así como la evaluación célula a célula⁴³

El análisis mediante citometría de flujo permite utilizar anticuerpos específicos para antígenos con grupos fosfato en PBMC previamente purificadas

después de un gradiente de densidad con Ficoll, los cuales caracterizan los estado de fosforilación de proteínas, además que se agregan anticuerpos específicos de membrana para obtener el inmunofenotipo de las células. De esta manera, se pueden tanto identificar como caracterizar tipos celulares de interés (tales como linfocitos T, Linfocitos B y monocitos) ⁴⁷.

Así varios grupos de investigación han demostrado que la utilización de anticuerpos fosfo-específicos junto con el análisis de citometría de flujo es aplicable para la evaluación en PBMC obtenidas de líneas celulares, de moléculas tales como STAT-1, STAT-3, STAT-5, STAT-4, AKT, ERK, MEK, c-Jun, p38, las cuales participan en vías de señalización como MAPK y JAK-STAT ⁴³.

Esta técnica también se puede emplear directamente en sangre periférica. Esto permite que la evaluación de vías de señalización se encuentren en un ambiente no manipulado por otros procedimientos como la separación por gradiente de densidad, ya que se se determina directamente en el tejido completo, además que este modelo es especialmente atractivo para estudios directamente en las muestras de pacientes o para el diagnóstico de enfermedades ⁴⁷.

Los resultados ya obtenidos sobre la aplicación de esta técnica en diferentes modelos, demuestran que será posible extender aún más la técnica para el análisis de subconjuntos celulares dentro de poblaciones complejas o poblaciones de células que son difíciles de estudiar bioquímicamente, así como también para establecer ensayos de diagnóstico utilizando citometría de flujo en muestras patológicas humanas, basados en el estado de fosforilación de proteínas que participan en las principales vías de señalización. Así mismo mejorar y ampliar este tipo de técnicas con anticuerpos intracelulares para que se puedan evaluar modificaciones posteriores a la traducción como por ejemplo ubiquitinación, glicosilación, acetilación, metilación o incluso interacciones proteína-proteína ⁴².

El objetivo del presente trabajo es el análisis de la activación de vías de señalización (MAPK y JAK-STAT) en leucocitos humanos , en un modelo de sangre periférica utilizando como técnica la citometría de flujo, la cual nos permite identificar a los diferentes leucocitos circulantes y caracterizarlos funcionalmente como es el caso de los estados de fosforilación. Esto se realizó como primer paso para la estandarización de este método de evaluación de vías de transducción a nivel unicelular, para posteriormente aplicarlo directamente en muestras de pacientes con SIRS/sepsis, ya que a pesar de que existen estudios previos donde se evalúan tales vías de señalización en estos padecimientos, solo se han empleado modelos de ratón.

Planteamiento del problema:

La activación diferencial de las vías de señalización en leucocitos circulantes podría estar relacionado con los estados de desequilibrio funcional como la parálisis inmune o respuestas hiper-inflamatorias que se dan en diferentes etapas en los pacientes con SIRS o sepsis. La evaluación de estas vías de señalización en cada población leucocitaria por métodos como el Western Blot requeriría de la separación de estas poblaciones por gradientes, columnas magnéticas ó “sort”, lo cual demanda una gran cantidad de sangre periférica como muestra inicial, imposible de obtener en pacientes comprometidos como los de SIRS/sepsis. Una alternativa metodológica para analizar, en prácticamente todos los tipos de leucocitos circulantes, la activación de diferentes vías de señalización, es el análisis unicelular por citometría de flujo.

Justificación

Evidencias recientes sugieren que durante la exposición de leucocitos a desencadenantes o mediadores de la respuesta inflamatoria, se “redireccionan” o “reprograman” las vías de señalización, lo que se podría reflejar en menor capacidad de eliminación de los agentes infecciosos y/o de contención de la respuesta inflamatoria potencialmente dañina para los tejidos. A fin de poder evaluar si hay diferencias en la activación de las vías de señalización dependientes de STAT-3, STAT-5 y p38, en respuesta a IL-10, GM-CSF y LPS en leucocitos circulantes de pacientes con sepsis respecto a sujetos sanos, primero es necesario estandarizar en nuestro laboratorio la técnica de citometría de flujo que nos permitirá determinar en la misma muestra, sin manipulación excesiva de la misma, la activación de estas vías de señalización de monocitos y otros leucocitos.

Hipótesis

Con la técnica de citometría de flujo se podrá analizar individualmente en monocitos y otros leucocitos circulantes, el nivel de fosforilación de STAT-3, STAT-5 y p38 en respuesta a IL-10, GM-CSF y LPS respectivamente.

Objetivo general

Determinar la activación de STAT-3, STAT-5 y p38 en leucocitos humanos de sangre periférica humana expuestos a IL-10, GM-CSF y LPS .

Objetivos particulares

- Evaluar la fosforilación de STAT-3 en leucocitos de sangre periférica humana de voluntarios sanos y pacientes con SIRS/sepsis estimulados o no con IL-10.
- Evaluar la fosforilación de STAT-5 en leucocitos de sangre periférica humana de voluntarios sanos y pacientes con SIRS/sepsis estimulados o no con GM-CSF.
- Evaluar la fosforilación de p38 en leucocitos de sangre periférica humana de voluntarios sanos y pacientes con SIRS/sepsis estimulados o no con LPS.

Material y Métodos

Obtención de la muestra:

De 3 voluntarios adultos aparentemente sanos y de 3 pacientes adultos con diagnóstico de SIRS/sepsis, se colectaron por venopunción humeral, previa sepsia y antisepsia de la zona, 6mL de sangre periférica en tubos Vacutainer (BD Biosciences®) con heparina de litio como anticoagulante(95 UI/mL).

Activación ex vivo:

De cada muestra obtenida se repartieron 400 µL en ocho tubos de poliestireno con tapa estériles de 5 mL (BD® FALCON) diferentes (50µL de sangre completa por tubo) y se incubaron a 37°C y 5% CO₂ por 15 min para mantener la muestra a 37°C. A continuación, en un par tubos se agregaron alguno de los siguientes estímulos: 1) sin estímulo (SE); 2) 5µL de GM-CSF (500ng/mL) (PreproTech); 3) 5µL de LPS (100ng/mL) (PreproTech); y 4) 10µL de IL-10 (100ng/mL) (PreproTech). Se colocan las tapas permitiendo la entrada de aire, y se agitan sutilmente con el vortex. Se incuban por 30 minutos a 37°C y 5% CO₂.

Identificación de leucocitos y detección de fosfoproteínas mediante citometría de flujo:

Pasado el tiempo de incubación se procede a realizar la inmunofenotipificación para la identificación de leucocitos y caracterización de estados de fosforilación. A cada tubo se agregaron 500µL de Lyse/Fix 1x (BD™ Phosflow) (se preparó previamente, con una dilución 1:5 del stock con agua bi-destilada y se precalentó a 37°C), se agitaron gentilmente (sin vortex) y se incubaron por 15 minutos a 37°C.

A continuación se centrifugaron los tubos de citometría a 1500rpm por 5 minutos a temperatura ambiente y se decantaron los sobrenadantes. Se elimino el exceso de Lyse/Fix 1x agregando un 1mL de PBS 1X no estéril previamente frío, se agitaron sutilmente con vortex y se centrifugaron a 1500

rpm por 5min. Se decantaron los sobrenadantes y se resuspendió el paquete celular. Para permeabilizar las células se agregaron 500µL de metanol al 70% frío a cada tubo de citometría, mientras se agita con vortex; se sellan los tubos con su tapa y se incubaron por 20 minutos en frío. Se eliminó el exceso de metanol 70% agregando un 1 mL de medio de tinción (PBS 1x + 0.5% de albúmina y 0.02% de NaN₃) se centrifugaron a 1500 rpm por 5 minutos, se decantó el sobrenadante y se resuspendió el paquete celular agitando sutilmente sin vortex (este paso se llevó a cabo dos veces).

Una vez eliminado el exceso de metanol 70%, se llevó a cabo tanto la identificación como caracterización de las células con anticuerpos de los cuales se añadió el siguiente volumen:

0.5µL de anti **CD45 Pacific Orange** (*Invitrogen®*) (*Clona: HI30*)

0.5µL de anti **CD14 PE- Cy7** (*Biolegend®*) (*Clona: M5E2*)

0.5µL de anti **CD14 PE** (*Biolegend®*)(*Clona: HCD14*)

2.0µL de anti **p-p38 Alexa Fluor 488** (*BD Biosciences®*) (*Clona: 36/p38*)

2.0µL de anti **p-STAT3 Alexa Fluor 488** (*BD Biosciences®*)
(*Clona:4/p-STAT3*)

2.0µL de anti **p-STAT5 Alexa Fluor 647** (*BD Biosciences®*)(*Clona: 47*)

Se agitaron sutilmente los tubos sin vortex y se incubaron por 60 min en oscuridad. Una vez transcurrido el tiempo de incubación se agrega 1mL de medio de tinción para eliminar el exceso de anticuerpos, se centrifugaron a 1500 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente, se decantó el sobrenadante y se resuspendió el paquete celular. Finalmente se adquirieron las muestras en un citómetro de flujo FACS Aria, (*BD® Biosciences*), con el software FACSDiva versión 6.0 para Windows (*BD® Biosciences*), con láseres rojo, verde y violeta encendidos y detectores FITC, PE-Cy7 y APC activados. Se adquirieron al menos de 5-10 X10⁴ eventos sencillos de la población CD14+. Los datos obtenidos se analizaron con el software Infinicyt® para Windows (*Cytognos®*).

Resultados

Como primera parte de este trabajo, se realizó la estimulación de las células de sangre periférica de voluntarios sanos con IL-10, GM-CSF y LPS, para evaluar si la concentración de estos estímulos así como el tratamiento de la muestra y la técnica de tinción nos permiten observar los estados de fosforilación de las moléculas STAT-3, STAT-5 y p38.

Utilizando un algoritmo de análisis de datos en gráficas de puntos, se proyectan en una gráfica de puntos las señales pico y área del parámetro de tamaño (FCS-H y FCS-A respectivamente, Figura 4a), para seleccionar solo a las células analizadas individualmente (sin agregados); además se utiliza una gráfica de tamaño (FSC-A) vs complejidad (SSC-A) para identificar a las células completas y potencialmente viables, excluyendo a los detritus (Figura 4b) y fluorescencia correspondiente a las moléculas fosforiladas (ej. p-STAT5), observamos dos poblaciones, correspondiente a linfocitos (Figura 4c) y a células mieloides (granulocitos y monocitos Figura 4d) de sangre periférica, con un patrón muy definido en ausencia de estimulación (Figura 4e). Utilizando histogramas para determinar la intensidad media de fluorescencia (IMF) de las moléculas fosforiladas se observa un desplazamiento a la derecha(alejándose del punto de origen) y por ende incrementos en la MIF de células las estimuladas vs las no estimuladas en diferentes poblaciones celulares (Figura 4g). Esto se interpreta como un aumento de la fosforilación de la proteína efectora correspondiente a esa fluorescencia.

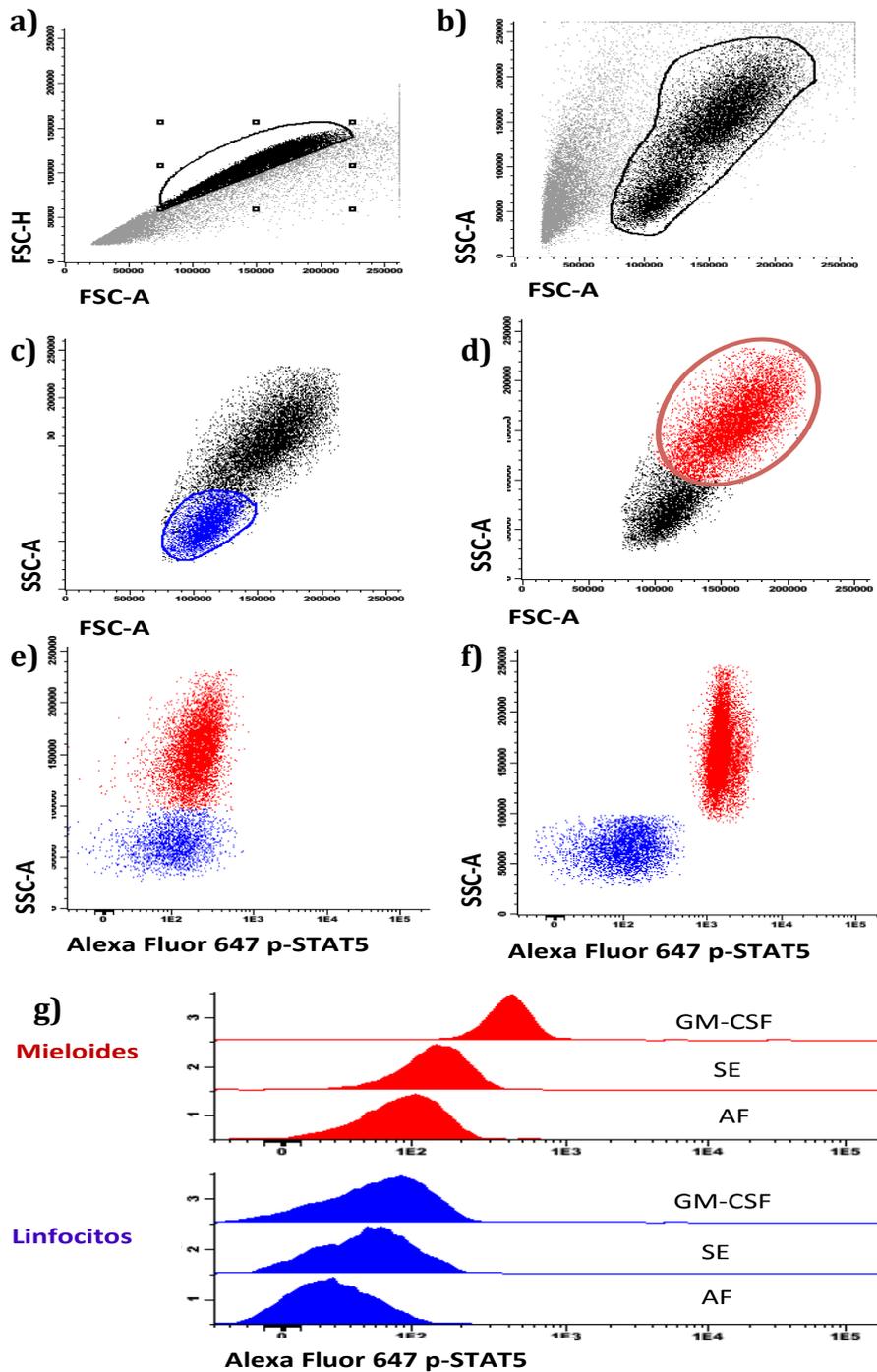


Figura 4: Estrategia de análisis para la identificación de las poblaciones activadas con los diferentes estímulos utilizados. Selección de eventos sencillos (a). Selección del patrón correspondiente a leucocitos (b). Selección del área correspondiente a linfocitos (c). Selección del área correspondiente a células mieloides (d). Células tanto mieloides como linfocitos sin estímulo (e). Son las células mieloides en las que se observa una mayor fosforilación de STAT5 en comparación con los linfocitos (f). Histograma en donde se comparan las diferentes condiciones de cada una de las poblaciones Autofluorescencia (AF) , sin estímulo (SE) y con GM-CSF (g). Sanos n=3, Sépticos n=2 y SIRS n=1.

IL-10 activa principalmente a los linfocitos (IMF 439.17) con una mayor fosforilación de STAT-3 en comparación con las células mieloides (IMF 424.80) (Figura 5a). La sangre estimulada con LPS muestra activación de p38 en las células mieloides (IMF 603.77), sin embargo se pueden observar dos poblaciones una con un mayor grado de activación que la otra. Dado que no se incluyó en esta parte de la estandarización la detección de marcadores para identificación de las diferentes poblaciones leucocitarias y que la activación con las citocinas modifica los parámetros de FCS-A y SSC-A, no podemos identificar si son monocitos o granulocitos; los linfocitos (IMF 131.27) no responden ante este estímulo (Figura 5b)..Mientras que GM-CSF activa a la población de células mieloides, aumentando la fosforilación de STAT5 (IMF 1533.20), y no así en los linfocitos (IMF 156.30) (Figura 5c).

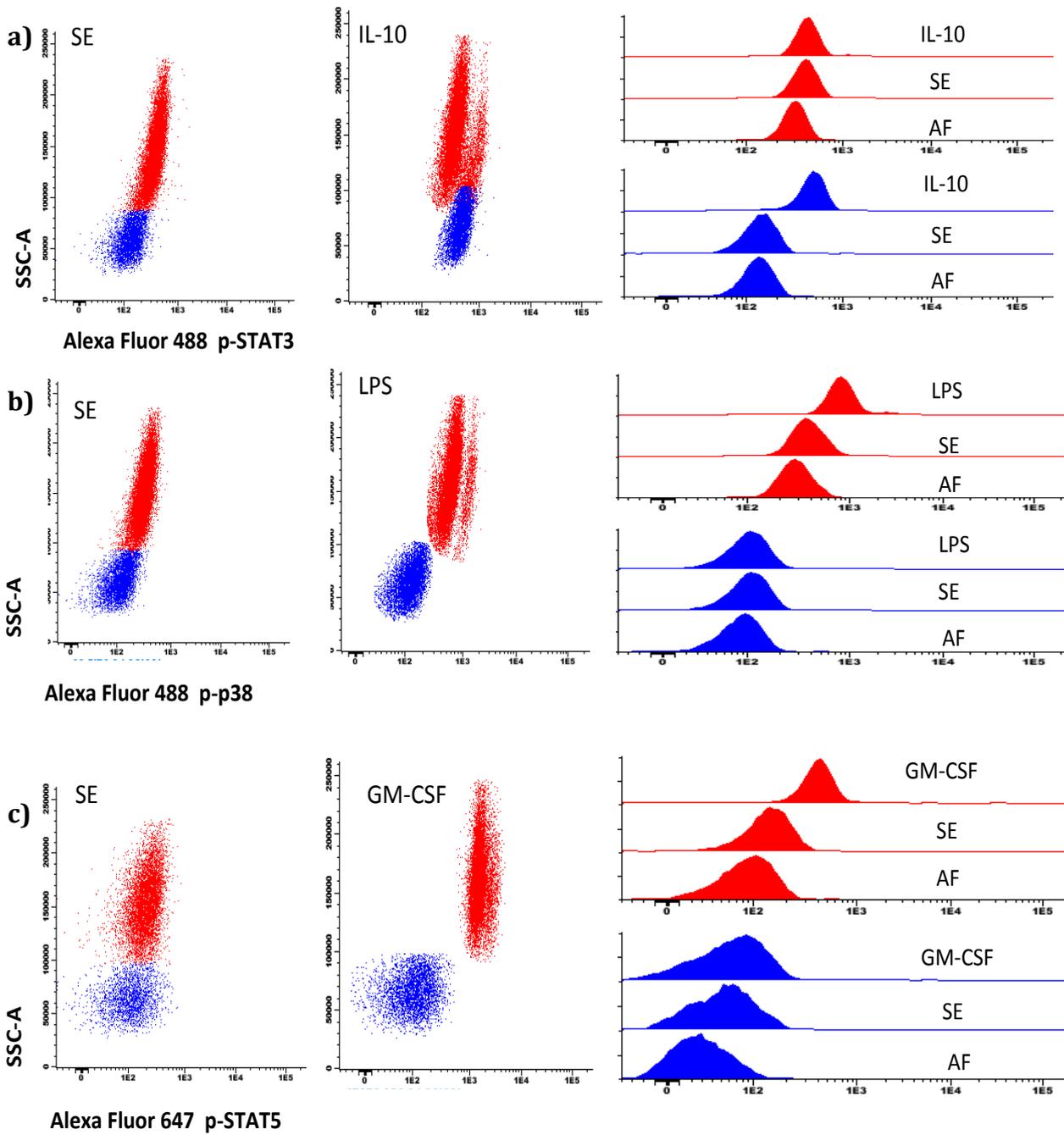


Figura 5 : La fosforilación de STAT3, p38 y STAT5 aumenta en células estimuladas con IL-10, LPS y GM-CSF respectivamente. Sangre periférica de voluntarios sanos fueron estimulados o no con IL-10, LPS y GM-CSF. Se muestran las gráficas de puntos (SSC vs Fluorescencia) de células sin estímulo (SE) en comparación con las células estimuladas con IL-10 (a), LPS (b) y GM-CSF (c) histograma en donde se comparan las diferentes condiciones de cada una de las poblaciones. Imagen representativa de un voluntario sano.

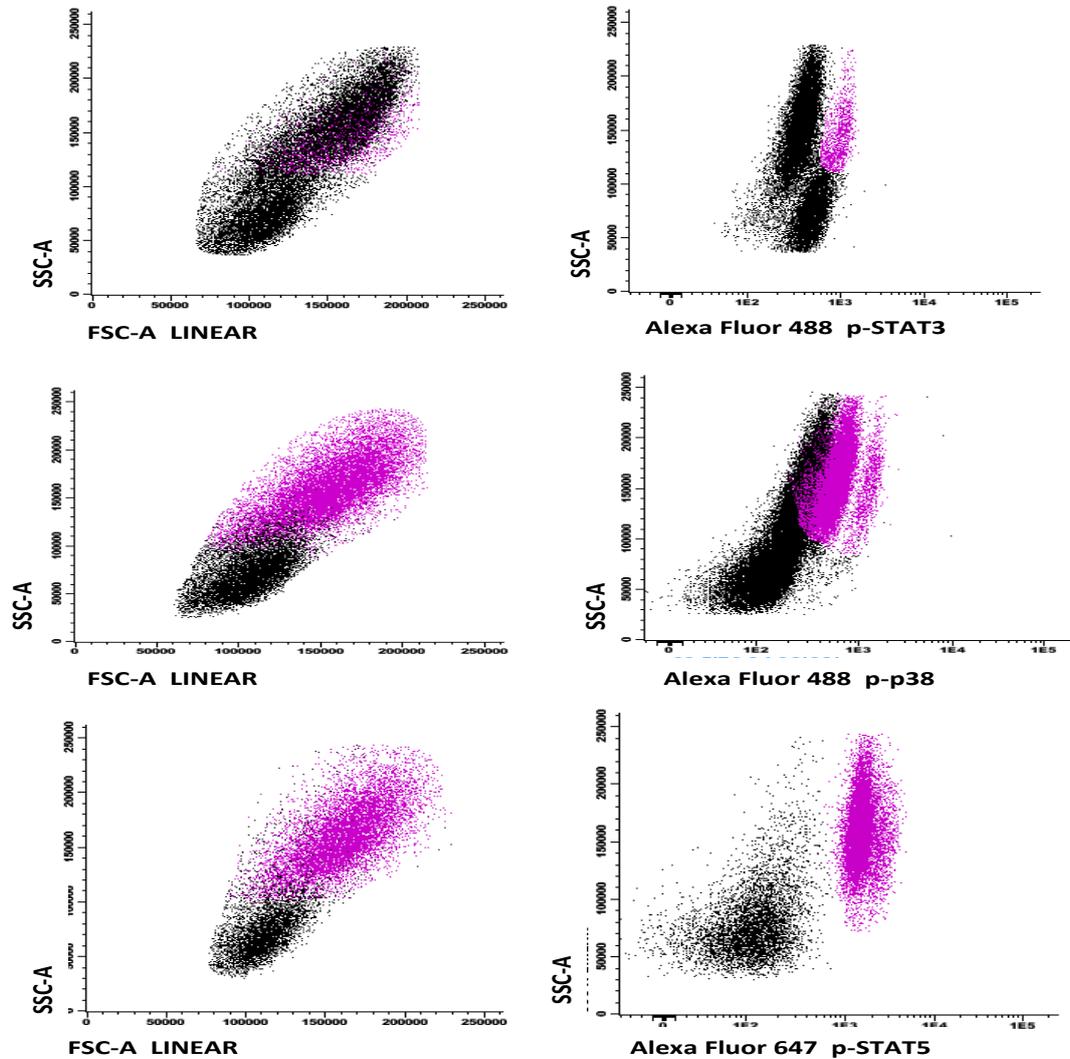


Figura 6 : El uso de patrones de tamaño, complejidad y activación son insuficientes para caracterizar las poblaciones mieloides. Al seleccionar la(s) población(es) que aparece tras la activación con IL-10, LPS y GM-CSF, se observa que proviene de células mieloides, sin embargo no se pueden diferenciar adecuadamente entre monocitos y granulocitos. Imagen representativa de un voluntario sano.

Al comprobar que podíamos distinguir la activación diferencial entre células mieloides y linfoides, decidimos utilizar anti-CD14 acoplado a ficoeritrina con cianina en la posición 7 (PECy7), para identificar a los monocitos y así demostrar si hay diferencia de activación entre estas células y los granulocitos. Sin embargo, como se puede observar en la Figura 7, el uso del fluorocromo PECy7 no identificó claramente eventos CD14+, en células estimuladas y no estimuladas, a pesar de que sí se observa la activación de p38 por parte de LPS. Se optó por cambiar el fluorocromo del marcador

CD14 a Ficoeritrina (PE), que a diferencia de PECy7 no es un fluorocromo "tandem" y se añadió anti-CD45 acoplado a Pacific Orange para identificar mejor a los leucocitos totales.

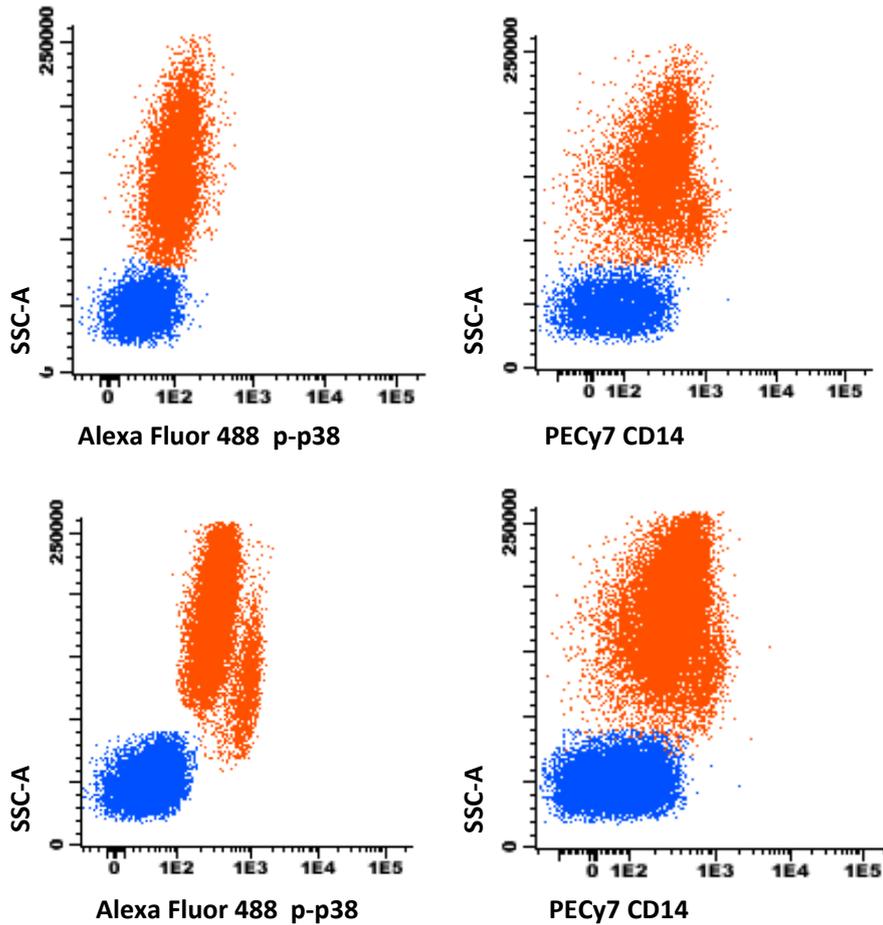


Figura 7: PECy7 no es un fluorocromo adecuado para uso de identificación de monocitos. Células que no se estimularon (a) o estimuladas con LPS (b) fueron teñidas con CD14 PECy7 para identificación de monocitos. Aunque la fosforilación de p38 se mantiene, la identificación de monocitos no es la adecuada. Imagen representativa de un voluntario sano.

El resultado de la combinación de estos dos marcadores de superficie fue una mejor identificación de las poblaciones de monocitos, granulocitos y linfocitos, tanto de sangre con como sin estímulo(Figura 8a y Figura 8b).

Utilizando los patrones de las gráficas de tamaño y complejidad, CD45 y CD14 para identificar las poblaciones, se caracterizó la activación de las vías de señalización. En la Figura 8 se puede observar la activación por parte de los granulocitos ante la exposición con GM-CSF (IMF 320.79); en los monocitos se encuentra mayor fluorescencia (IMF 593.56) y por lo tanto mayor fosforilación, de STAT-5 (Figura 8b). En cambio y tal como se ha reportado²², los linfocitos no responden ante este estímulo (IMF 62.91) y esto también se corrobora en el histograma en donde se comparan la condición SE con el estimulado con GM-CSF de cada una de las poblaciones.

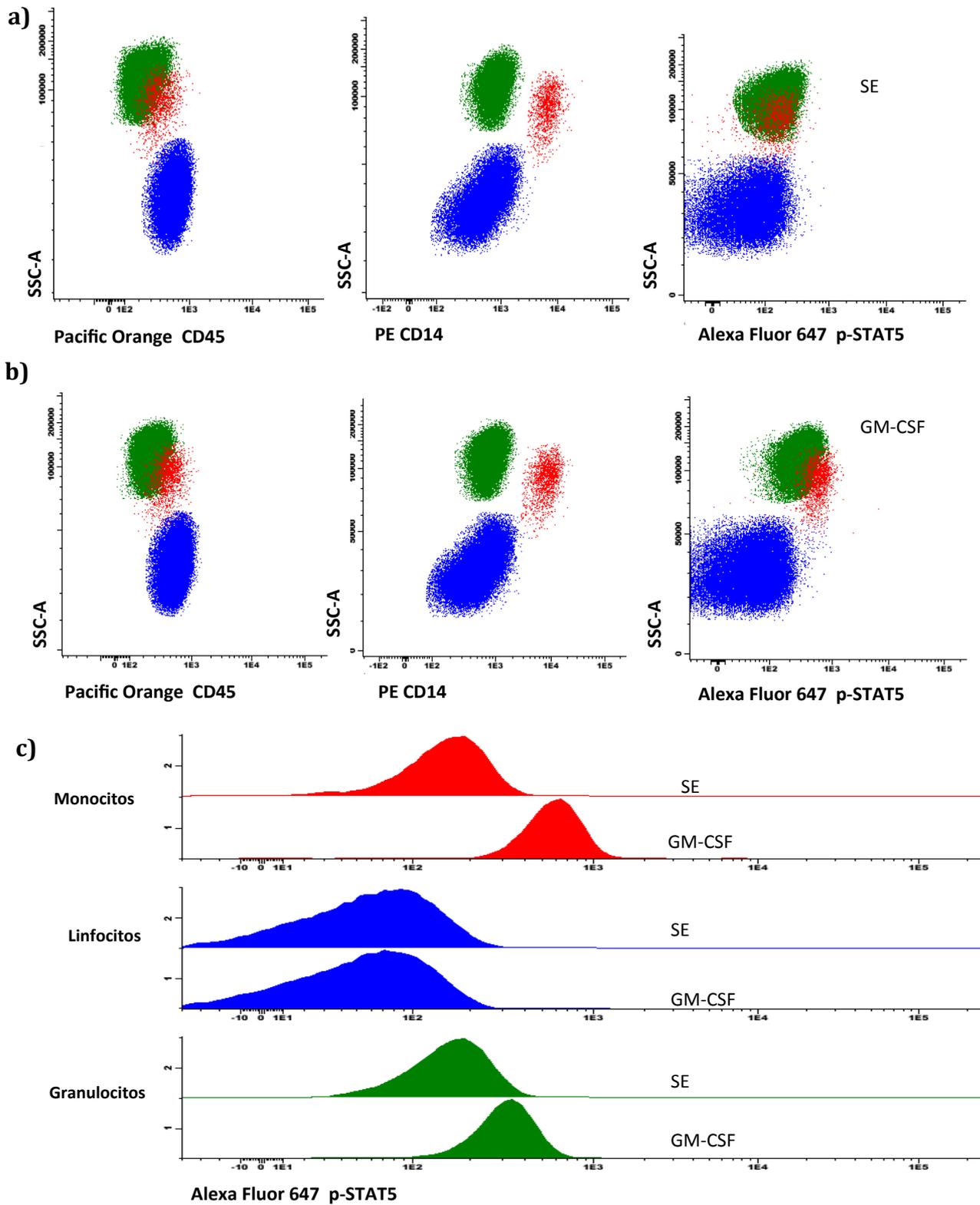


Figura 8 : GM-CSF induce la fosforilación de STAT-5 en monocitos y granulocitos. Monocitos ($CD45^{dim} CD14^+ SSC^{mid}$) y granulocitos ($CD45^{low} CD14^- SSC^{high}$) muestran fosforilación de STAT-5 al estar en contacto con GM-CSF, mayor en monocitos (IMF 574) que en granulocitos . Los linfocitos ($CD45^{dim} CD14^- SSC^{low}$) no responden ante este estímulo. Sanos n=3.

Mientras que en células de sangre periférica estimuladas con IL-10 mostrado en la Figura 9 se encuentra mayor fluorescencia en los monocitos (IMF 159.45) y por lo tanto se obtuvo mayor fosforilación de STAT-3, en comparación con los granulocitos (IMF 108.46) y los linfocitos (IMF 52.21), así mismo esto se observa en el histograma en donde se compara la condición SE con el estimulado con IL-10 de cada una de las poblaciones (Figura 9c).

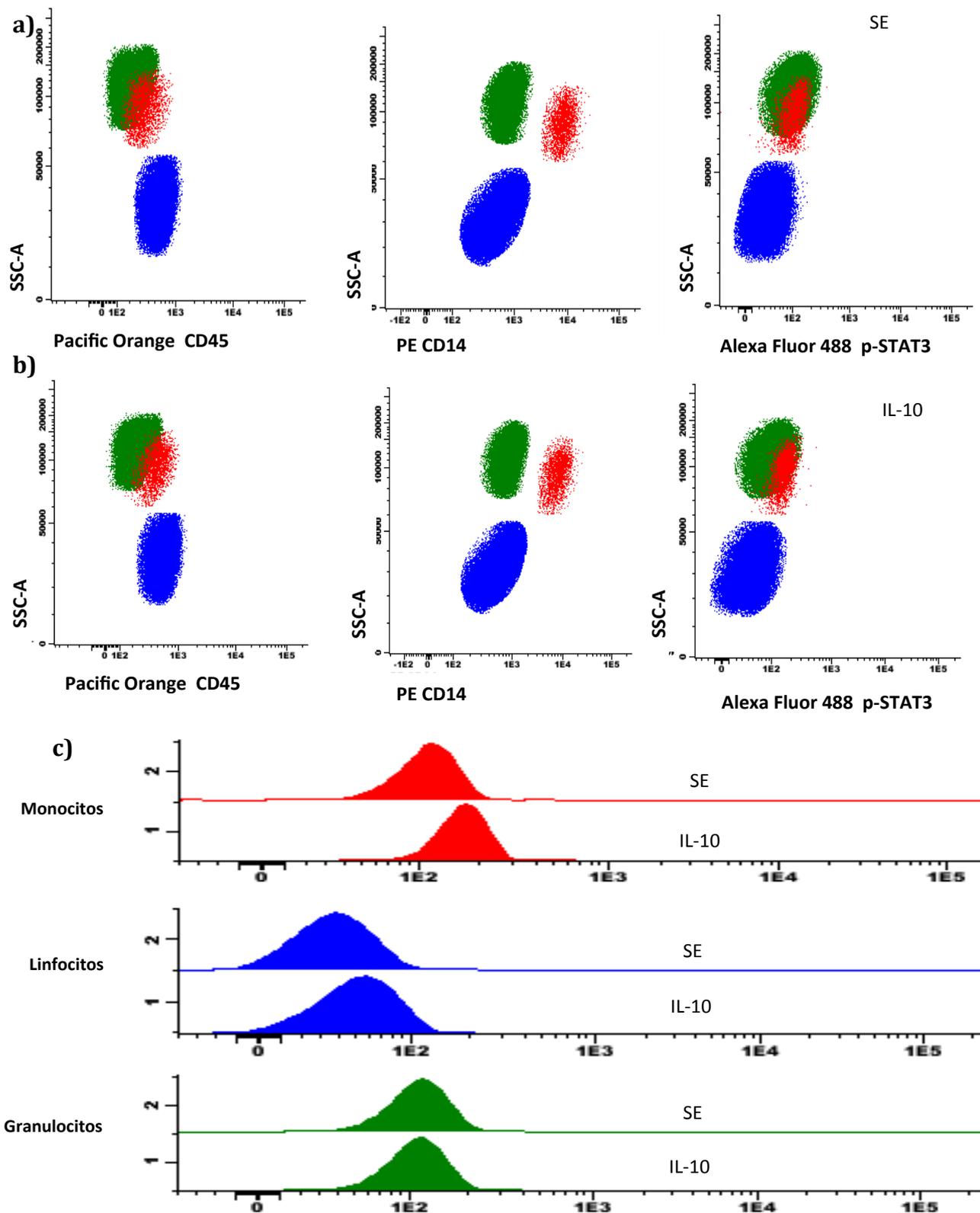


Figura 9: IL-10 induce la fosforilación de STAT3 en monocitos y linfocitos. Monocitos (CD45^{dim} CD14⁺ SSC^{mid}) y linfocitos (CD45^{dim} CD14⁻ SSC^{low}) muestran fosforilación de STAT-3 al estar en contacto con IL-10, mayor por parte de los monocitos en comparación con los granulocitos y los linfocitos. Imagen representativa de un voluntario sano.

En la Figura 10b se observa activación por parte de los granulocitos (IMF 189.42) por el estímulo LPS sin embargo se encuentra mayor fluorescencia por parte de los monocitos (IMF 373.50) y por lo tanto se obtuvo mayor fosforilación de p38, mientras que en los linfocitos (IMF 37.57) no responden ante este estímulo, esto también se puede observar en el histograma en donde se compara la condición SE con el estimulado con LPS de las diferentes poblaciones (Figura 10c).

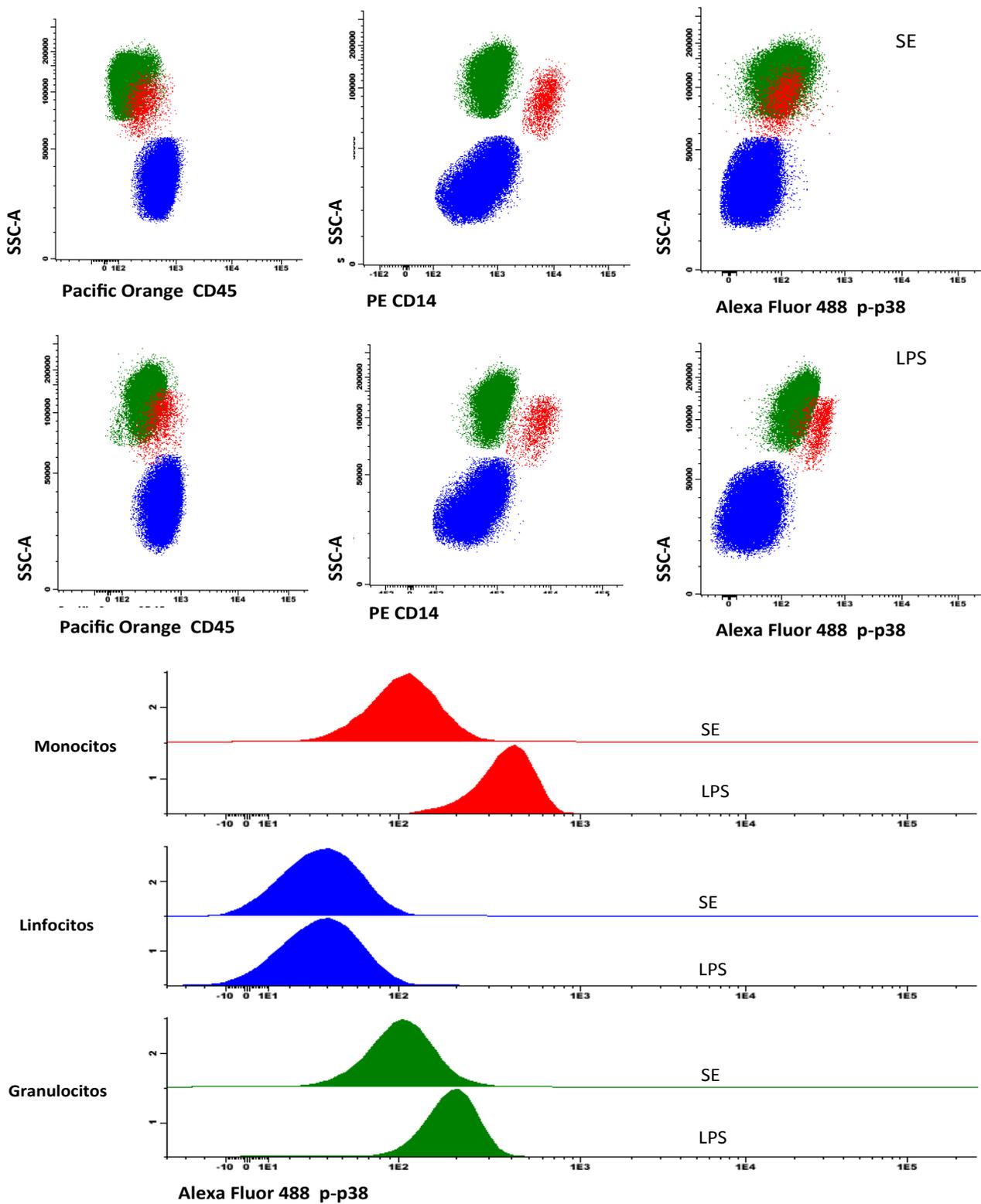


Figura 10: LPS induce la fosforilación de p38 en monocitos y granulocitos. Monocitos ($CD45^{dim} CD14^{+} SSC^{mid}$) y granulocitos ($CD45^{dim} CD14^{-} SSC^{high}$) muestran fosforilación de p38 al estar en contacto con LPS, mayor por parte de los monocitos (IMF 372.85) en comparación con los granulocitos (IMF 186.20). Los linfocitos ($CD45^{dim} CD14^{-} SSC^{low}$) no responden ante este estímulo. Imagen representativa de un voluntario sano.

Una vez estandarizada la tinción de leucocitos de sangre periférica, utilizando los marcadores de identificación CD14 y CD45 y de identificación p-STAT-3, p-STAT-5 y p-p38, se aplicó a muestras de pacientes con SIRS/sepsis. La activación de STAT-5 es mayor en pacientes con SIRS (IMF 1362.31) en comparación con sangre de voluntarios sanos estimulada con GM-CSF (IMF 1138.69), aunque en los pacientes con sepsis se observó una disminución en la activación de esta molécula (IMF 946.55) (Figura 11).

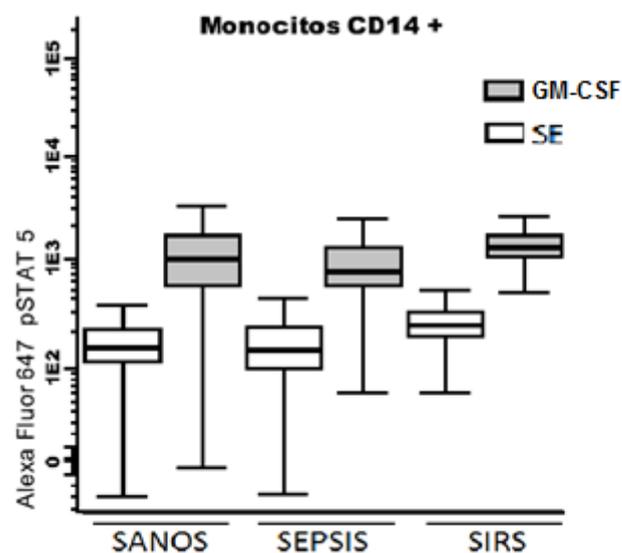


Figura 11 . Monocitos de pacientes con SIRS, pero no sepsis, fosforilan STAT5 de manera basal en comparación con los voluntarios sanos. Sangre estimulada o no con GM-CSF de voluntarios sanos y pacientes con inflamación sistémica fue analizada con la técnica estandarizada para observar fosforilación de STAT5. La activación de STAT5 en pacientes con SIRS es mayor en comparación con sangre de voluntarios sanos estimulada con GM-CSF sin embargo en los pacientes con sepsis se observó una menor activación de STAT 5. Sanos n=3, Sépticos n=2 y SIRS n=1

Tanto en pacientes con SIRS (IMF 261.21) como en pacientes con sepsis (IMF 584.70) se obtuvo una mayor activación de STAT-3 en comparación con los sangre estimulada con LPS de voluntarios sanos (IMF 216.50) de manera basal (Figura 12).

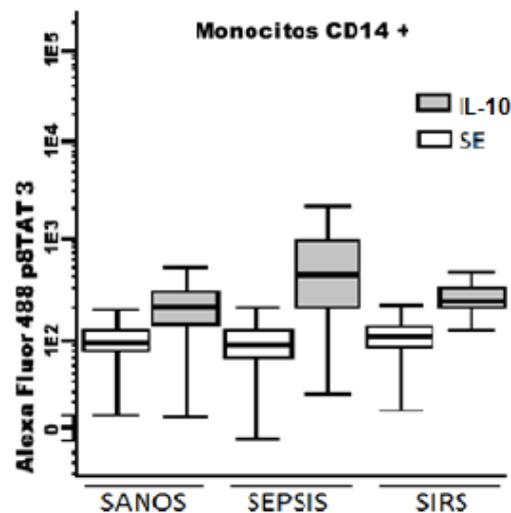


Figura 12 . Monocitos de pacientes con sepsis fosforilan STAT3 de manera basal en comparación con los voluntarios sanos o pacientes con SIRS. Sangre estimulada o no con IL-10 de voluntarios sanos y pacientes con inflamación sistémica fue analizada con la técnica estandarizada para observar fosforilación de STAT3. En pacientes con SIRS como en pacientes con sepsis se obtuvo una mayor activación de STAT3 en comparación con sangre de voluntarios sanos estimulada con IL-10. Sanos n=3, Sépticos n=2 y SIRS n=1

Por último, tanto en los pacientes con SIRS (IMF 412.29) y sepsis (IMF 577.77) se obtuvo menor fluorescencia correspondiente a p38 en comparación con sangre estimulada con LPS de voluntarios sanos (IMF 690.65) (Figura 13).

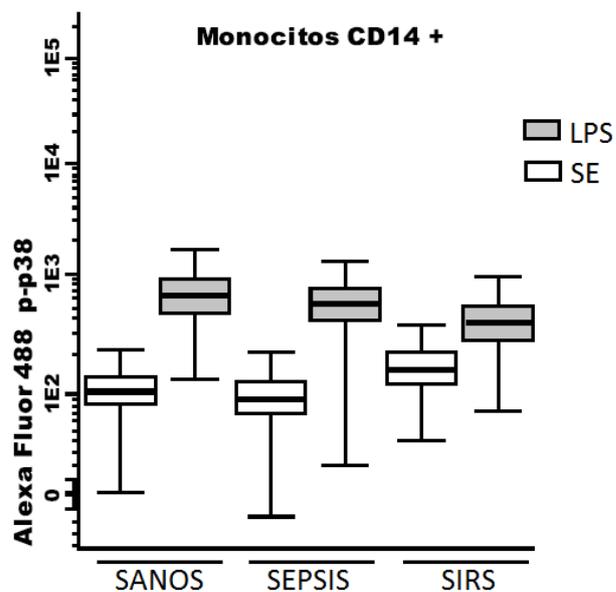


Figura 13 . Monocitos de pacientes con SIRS o sepsis disminuyen la activación basal de p38. Sangre estimulada o no con LPS de voluntarios sanos y pacientes con inflamación sistémica fue analizada con la técnica estandarizada para observar fosforilación de p38. En los monocitos de sangre periférica de pacientes con SIRS y sepsis se obtuvo una menor activación de p38 en comparación con sangre de voluntarios sanos estimulada con LPS. Sanos n=3, Sépticos n=2 y SIRS n=1

Discusión

El análisis de vías de señalización en gran medida se ha limitado al uso de métodos como Western Blot o ELISA, que requieren de una gran cantidad de muestra ⁴⁴ lo que dificulta su uso en muestras de pacientes críticos. Otra desventaja de las técnicas anteriores recae en que, si se analiza al tejido en su totalidad, no se sabrá cuál tipo celular enciende la vía de señalización de interés, ni su intensidad. Sistemas con tipos de células heterogéneas, como PBMC, esplenocitos móridos, células de médula ósea o sangre periférica, han mostrado resultados contradictorios al evaluar los estados de fosforilación en señalización. Se ha propuesto que esto puede deberse a que los resultados de las técnicas mencionadas son el promedio de la respuesta de todas las células involucradas, independientemente de su estirpe o grado de diferenciación⁴³.

Sin embargo una de las técnicas que analiza con alta eficiencia a nivel unicelular poblaciones heterogéneas (leucocitos de sangre periférica), es la citometría de flujo, la cual permite caracterizarlos por inmunofenotipo, utilizando marcadores de superficie y/o intracelulares para su identificación, y funcionalidad, como es el caso de los estados de fosforilación de ciertas proteínas de vías de señalización^{42,44}. Otra ventaja de la citometría de flujo en comparación con métodos tradicionales, es la capacidad de analizar subconjuntos de células complejas, como por ejemplo se pueden analizar rutinariamente células que comprenden menos del 1% del total de la población celular, así como también precursores de células B⁴³.

Esta técnica, proporciona además una plataforma única para analizar los eventos de señalización en condiciones que mejor simulen lo que sucede *in vivo*: permitiendo la presencia de otros tipos de células y su interacción directa (célula-célula), así como del ambiente creado por mediadores liberados durante la activación celular como citocinas⁴⁷.

En técnicas como el Western blot o ELISA, se utilizan métodos para la purificación de las poblaciones de células complejas que pueden ser costosos además que la separación de estas poblaciones celulares por

métodos químicos puede desencadenar cambios involuntarios en vías de señalización o modificar el estado de la proteína a evaluar⁴³.

Para este trabajo, las vías de señalización MAPK y JAK-STAT se utilizó el modelo de estimulación de sangre periférica *ex vivo* de voluntarios sanos para la estandarización de la técnica de citometría de flujo utilizada para la detección de moléculas intracelulares (fosfo-antígenos y marcadores de identificación).

Como primer paso, se estimuló sangre periférica total de voluntarios sanos con IL-10, GM-CSF y LPS, esto para evaluar si la concentración de estos estímulos y el tratamiento de la muestra nos permitían observar aumento en la fosforilación de STAT-3, STAT-5 y p38 respectivamente. Como se observa en la Figura 4, es posible la identificación de las poblaciones celulares de sangre periférica utilizando los parámetros de tamaño relativo (FCS-A) y complejidad relativa (SSC-A), así como eliminar las células agregadas al utilizar el gráfico FSC-A vs FSC-H⁴⁸. En sangre periférica suelen aparecer tres poblaciones mayoritarias: granulocitos, monocitos y linfocitos. Sin embargo las propiedades de tamaño relativo o de complejidad relativa de las células pueden cambiar por el procedimiento de fijación (formaldehído) y permeabilización (metanol 70%) que requiere la técnica, por lo que en este primer experimento solo se identificaron dos poblaciones, una de alto tamaño y complejidad (FSC^{high} SSC^{high}), correspondiente a células mieloides, y otra de tamaño y complejidad bajos (FSC^{low} SSC^{low}) correspondiente a linfocitos, independientemente de la condición de estimulación⁴⁹.

Al utilizar el parámetro correspondiente a los anticuerpos “fosfo”-específicos, se observa que solo la sangre que estuvo en contacto con GM-CSF, IL-10 o LPS aumenta su IMF en las poblaciones de linfocitos y/o de células mieloides, lo que nos da la capacidad de reconocer a estas proteínas activadas y distinguir el estado de activación- desactivación de los eventos de señalización⁴⁷. Además, aparece una población adicional que parece derivarse de la población mieloides. Esto indica que los estímulos están aumentando la fosforilación de su correspondiente vía de señalización

(STAT-5, STAT-3 y p38 respectivamente), y que existe una activación diferencial dentro de la población mielóide.

Dado que no podíamos, por tamaño y complejidad diferenciar que tipo de células mieloides eran las que respondían a los estímulos utilizados (Figura 6), se optó por incluir el anticuerpo de identificación anti-CD14 acoplado a un fluorocromo en tándem PECy7, útil en tinciones de marcadores de superficie de las células (extracelulares). Como se puede observar en la Figura 7, PECy7 no nos permitió la identificación de los eventos CD14⁺, esto podría deberse por la exposición de este fluorocromo ante la solución de Lyse/Fix 1x, la cual es una solución que permite tanto el fijado de los leucocitos y el lisado de eritrocitos, y/o a la exposición al metanol utilizado para la permeabilización. Un fluorocromo en tándem se define como una combinación de dos fluorocromos (un donante y un aceptor de fluorescencia), en este caso la molécula donante es Ficoeritrina (PE) y la molécula aceptora, cianina 7 (Cy7). El delicado equilibrio entre el donante y el aceptor en este tipo de fluorocromos es la razón por la que los espectros de emisión se ven afectados tanto por la fabricación como por los procesos de conjugación con los anticuerpos, lo que ocasiona una inestabilidad en sus características de fluorescencia. Así mismo se degradan rápidamente por su exposición a la luz y a altas temperaturas así como también por procesos como la fijación y permeabilización de las células⁵⁰. Se decidió cambiar el anticuerpo a un anti-CD14 acoplado a PE, además de incluir anti-CD45 Pacific Orange. CD45 es una molécula que se expresa en la membrana de todos los leucocitos, pero no en los eritrocitos, además de que permite la identificación de granulocitos, monocitos y linfocitos por su expresión diferencial de esta molécula⁵¹. Como se puede observar en la Figura 8 la combinación de ambos anticuerpos resultó en la adecuada identificación de las subpoblaciones de leucocitos, permitiendo observar a los granulocitos (CD45^{low} CD14⁻), monocitos (CD45^{mid} CD14⁺) y por último a los linfocitos (CD45^{mid} CD14⁻).

En la Figura 8, además de la óptima identificación de las poblaciones celulares, se observa la activación de STAT-5 inducida por GM-CSF, distinguiéndose que los granulocitos y monocitos responden ante este

estímulo con mayor fosforilación de STAT-5, mientras que en los linfocitos no se activan ante este estímulo. La presencia de GM-CSF activa su complejo receptor (GM-CSFR) heterodimérico que se encuentra en la superficie de las células mieloides (granulocitos y monocitos), iniciando múltiples vías de señalización entre la que se encuentra la vía de JAK-STAT, las cuales controlan funciones clave tales como supervivencia y activación celular. Evidencias recientes sugieren que GM-CSF desempeña un papel importante en la mielopoyesis de emergencia en respuesta a una infección⁵².

En cuanto a la estimulación con IL-10, se puede observar en la Figura 9b que hay mayor activación de la molécula STAT-3 en los monocitos en comparación con los granulocitos y los linfocitos. La expresión del receptor (IL-10R1) para IL-10 se ha encontrado expresado en la superficie de gran variedad de tipos celulares, principalmente en linfocitos y en células mieloides. Sin embargo en el caso de los granulocitos la expresión del receptor de IL-10 es menor en comparación con los monocitos y linfocitos^{53,54}. Esto nos podría explicar por qué en la población de granulocitos se encuentra una menor fosforilación de STAT-3 por lo tanto una menor activación de esta vía de señalización, en comparación con los monocitos. Aunque se ha reportado la expresión en linfocitos de este receptor para IL-10, en este experimento no obtuvimos la activación de STAT-3 inducida por esta citocina.

Finalmente con la estimulación con LPS, aunque se observó activación de la molécula p38 por parte de los granulocitos, fueron los monocitos donde se obtuvo una mayor activación, mientras que los linfocitos no responden ante este estímulo. El LPS es el principal componente en la membrana externa de las bacterias Gram-negativas, estudios recientes han tratado de explicar cómo es reconocido el LPS por monocitos y macrófagos. Esta endotoxina es reconocida principalmente por el receptor TLR-4 en donde también participa la molécula CD14, la cual se expresa principalmente en monocitos. Una vez reconocido se activan diferentes vías de señalización que incluye la ruta para la activación de NFκB y la vía de MAPK que activa a ERK 1, 2, JNK o p38⁵⁵.

Los resultados anteriores indican que la técnica de análisis de antígenos fosforilados en sangre periférica puede ser inducida por los activadores utilizados, por lo que pueden ser utilizados como controles positivos para pruebas posteriores. El uso de marcadores de identificación potencia el poder de la prueba, debido a que las células no se activan igual por los mismos ligandos, y esto solo puede ser analizado con anticuerpos acoplados a fluorocromos que no sean sensibles a los tratamientos de fijación y permeabilización.

Una vez estandarizada esta técnica se aplicó este método en muestras de pacientes con SIRS /sepsis, ya que en trabajos recientes se ha demostrado que la presencia de activación de las vías de señalización como MAPK o JAK-STAT, previo al desarrollo de la segunda infección, provoca que la respuesta de macrófagos, células dendríticas y linfocitos T sea mucho menor⁴¹. Estos resultados apoyan la hipótesis de que ocurra un fenómeno similar en leucocitos humanos de pacientes con SIRS/sepsis y por lo tanto se pueda explicar la alta susceptibilidad a infecciones secundarias, sin embargo esto solo se ha descrito en modelos de ratón.

Al observar que la principal población en donde se observó mayor activación de las moléculas STAT-3, STAT-5 y p38 fueron los monocitos, se optó por enfocar el análisis en este tipo celular para la comparación de las muestras de voluntarios sanos con respecto a las muestras de pacientes con SIRS /sepsis. Los pacientes con SIRS tienen mayor fosforilación de STAT-5 en comparación con los voluntarios sanos (Figura 11), sin embargo en los pacientes con sepsis se observó menor activación de esta molécula. En cuanto a la activación de STAT-3 (Figura 12), pacientes con SIRS y con sepsis mostraron mayor activación de STAT-3 en comparación con los voluntarios sanos. Finalmente en pacientes con SIRS y con sepsis se observó menor activación de p38 en comparación con los voluntarios sanos. (Figura 13).

Los monocitos son de las principales células efectoras del sistema inmunológico durante un proceso inflamatorio. Entre las funciones que llevan

a cabo son la fagocitosis de los agentes infecciosos, así como también son la principal fuente de mediadores inflamatorios, que a su vez activan y reclutan a otras células del sistema inmune innato. También pueden ejercer efectos antimicrobianos directos a través de la actividad bactericida y activar la respuesta inmune adaptativa, al participar en la presentación de antígeno⁵⁶. Se ha observado que los monocitos de pacientes con sepsis pierden su capacidad de generar una respuesta inflamatoria después de una estimulación por productos bacterianos, en cambio aumentan la producción de mediadores anti-inflamatorios tales como IL-10⁵⁷.

Otra característica importante de los monocitos en sepsis son los bajos niveles de expresión de la molécula de clase II del complejo mayor de histocompatibilidad (HLA-DR), esto podría correlacionar con la alta producción de IL-10 por parte de estas células ya que una de las funciones anti-inflamatorias de esta citocina es la inhibición de la expresión en la superficie de la molécula HLA-DR por parte los monocitos, lo que repercute en la disminución de algunas de las funciones de estas células , tales como la capacidad de producir citocinas pro-inflamatorias e inducir la respuesta de los linfocitos T por la disminución en la presentación de anígeno mediante esta molécula⁵⁸.

Los resultados de las muestras de los pacientes podrían indicar fallas en la capacidad de respuesta de los monocitos. Debido a la exposición prolongada a agentes pro-inflamatorios (PAMPs, citocinas, etc) los monocitos de los pacientes con SIRS o sepsis no tienen la capacidad de responder ante estímulos pro-inflamatorios como lo es el LPS y por lo tanto se observa una disminución en la activación de la molécula p38 en comparación con los voluntarios sanos. Pero son capaces de encender STAT-3 y STAT-5, cuyas consecuencias son dependientes de si el estímulo se encuentra en circulación. Aunque es importante recalcar que en este trabajo por el número de pacientes(n=2) comparados con sujetos sanos, solo podemos hablar de tendencias al no poder realizar pruebas estadísticas para verificar significancia.

En este trabajo estandarizamos la técnica de citometría de flujo para evaluar los estados de fosforilación en leucocitos estimulados con LPS o citocinas, no solo para sangre periférica de sujetos sanos, sino también para aplicarla en pacientes con SIRS/sepsis. Sin embargo para obtener una conclusión sobre alteraciones de vías de señalización como MAPK y JAK-STAT en pacientes con SIRS/sepsis en comparación con voluntarios sanos es necesario ampliar el número de muestras.

Conclusión:

Se estandarizó el método de evaluación de vías de señalización a nivel unicelular en leucocitos humanos de voluntarios sanos, los cuales se identificaron y caracterizaron por los estados de fosforilación de STAT-3 , STAT-5 y p38, así mismo se aplicó este método en muestras de pacientes con SIRS /sepsis, esto utilizando como técnica la citometría de flujo.

Bibliografia:

- 1 Pritchard, A. L. & Hayward, N. K. Molecular pathways: mitogen-activated protein kinase pathway mutations and drug resistance. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **19**, 2301-2309, doi:10.1158/1078-0432.CCR-12-0383 (2013).
- 2 Kisseleva, T., Bhattacharya, S., Braunstein, J. & Schindler, C. W. Signaling through the JAK/STAT pathway, recent advances and future challenges. *Gene* **285**, 1-24 (2002).
- 3 O'Shea, J. J., Gadina, M. & Schreiber, R. D. Cytokine signaling in 2002: new surprises in the Jak/Stat pathway. *Cell* **109 Suppl**, S121-131 (2002).
- 4 Rawlings, J. S., Rosler, K. M. & Harrison, D. A. The JAK/STAT signaling pathway. *Journal of cell science* **117**, 1281-1283, doi:10.1242/jcs.00963 (2004).
- 5 Seger, R. & Krebs, E. G. The MAPK signaling cascade. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **9**, 726-735 (1995).
- 6 Johnson, G. L. & Lapadat, R. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science* **298**, 1911-1912, doi:10.1126/science.1072682 (2002).
- 7 Herlaar, E. & Brown, Z. p38 MAPK signalling cascades in inflammatory disease. *Molecular medicine today* **5**, 439-447 (1999).
- 8 Cuenda, A. & Rousseau, S. p38 MAP-kinases pathway regulation, function and role in human diseases. *Biochimica et biophysica acta* **1773**, 1358-1375, doi:10.1016/j.bbamcr.2007.03.010 (2007).
- 9 Kumar, V., Abbas, A. K., Fausto, N. & Aster, J. C. *Robbins & Cotran Pathologic Basis of Disease*. (Elsevier Health Sciences, 2009).
- 10 Medzhitov, R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* **454**, 428-435, doi:10.1038/nature07201 (2008).
- 11 Akira, S., Uematsu, S. & Takeuchi, O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* **124**, 783-801, doi:10.1016/j.cell.2006.02.015 (2006).
- 12 Akira, S. & Takeda, K. Toll-like receptor signalling. *Nature reviews. Immunology* **4**, 499-511, doi:10.1038/nri1391 (2004).
- 13 Lu, Y. C., Yeh, W. C. & Ohashi, P. S. LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine* **42**, 145-151, doi:10.1016/j.cyto.2008.01.006 (2008).
- 14 Oeckinghaus, A. & Ghosh, S. The NF-kappaB family of transcription factors and its regulation. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **1**, a000034, doi:10.1101/cshperspect.a000034 (2009).
- 15 Takeuchi, O. & Akira, S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* **140**, 805-820, doi:10.1016/j.cell.2010.01.022 (2010).
- 16 Li, Q. & Verma, I. M. NF-kappaB regulation in the immune system. *Nature reviews. Immunology* **2**, 725-734, doi:10.1038/nri910 (2002).
- 17 Matsukawa, A. STAT proteins in innate immunity during sepsis: lessons from gene knockout mice. *Acta medica Okayama* **61**, 239-245 (2007).

- 18 MacEwan, D. J. TNF ligands and receptors--a matter of life and death. *British journal of pharmacology* **135**, 855-875, doi:10.1038/sj.bjp.0704549 (2002).
- 19 Faustman, D. & Davis, M. TNF receptor 2 pathway: drug target for autoimmune diseases. *Nature reviews. Drug discovery* **9**, 482-493, doi:10.1038/nrd3030 (2010).
- 20 Curfs, J. H., Meis, J. F. & Hoogkamp-Korstanje, J. A. A primer on cytokines: sources, receptors, effects, and inducers. *Clinical microbiology reviews* **10**, 742-780 (1997).
- 21 Dinarello, C. A. Interleukin-1. *Cytokine & growth factor reviews* **8**, 253-265 (1997).
- 22 Lehtonen, A., Matikainen, S., Miettinen, M. & Julkunen, I. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)-induced STAT5 activation and target-gene expression during human monocyte/macrophage differentiation. *Journal of leukocyte biology* **71**, 511-519 (2002).
- 23 Benkhart, E. M., Siedlar, M., Wedel, A., Werner, T. & Ziegler-Heitbrock, H. W. Role of Stat3 in lipopolysaccharide-induced IL-10 gene expression. *Journal of immunology* **165**, 1612-1617 (2000).
- 24 Foster, S. L., Hargreaves, D. C. & Medzhitov, R. Gene-specific control of inflammation by TLR-induced chromatin modifications. *Nature* **447**, 972-978, doi:10.1038/nature05836 (2007).
- 25 Nystrom, P. O. The systemic inflammatory response syndrome: definitions and aetiology. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* **41 Suppl A**, 1-7 (1998).
- 26 Bone, R. C. *et al.* Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. 1992. *Chest* **136**, e28 (2009).
- 27 Riedemann, N. C., Guo, R. F. & Ward, P. A. The enigma of sepsis. *The Journal of clinical investigation* **112**, 460-467, doi:10.1172/JCI19523 (2003).
- 28 Martin, G. S., Mannino, D. M., Eaton, S. & Moss, M. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *The New England journal of medicine* **348**, 1546-1554, doi:10.1056/NEJMoa022139 (2003).
- 29 Nduka, O. O. & Parrillo, J. E. The Pathophysiology of Septic Shock. *Critical Care Clinics* **25**, 677-702, doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.ccc.2009.08.002> (2009).
- 30 Hoesel, L. M. & Ward, P. A. Mechanisms of inflammatory response syndrome in sepsis. *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms* **1**, 345-350, doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.ddmec.2004.11.003> (2004).
- 31 Ward, N. S., Casserly, B. & Ayala, A. The compensatory anti-inflammatory response syndrome (CARS) in critically ill patients. *Clinics in chest medicine* **29**, 617-625, viii, doi:10.1016/j.ccm.2008.06.010 (2008).
- 32 Iskander, K. N. *et al.* Sepsis: multiple abnormalities, heterogeneous responses, and evolving understanding. *Physiological reviews* **93**, 1247-1288, doi:10.1152/physrev.00037.2012 (2013).

- 33 Wang, T. S. & Deng, J. C. Molecular and cellular aspects of sepsis-induced immunosuppression. *Journal of molecular medicine* **86**, 495-506, doi:10.1007/s00109-007-0300-4 (2008).
- 34 Benjamim, C. F., Hogaboam, C. M., Lukacs, N. W. & Kunkel, S. L. Septic mice are susceptible to pulmonary aspergillosis. *The American journal of pathology* **163**, 2605-2617, doi:10.1016/S0002-9440(10)63615-2 (2003).
- 35 Steinhauser, M. L. *et al.* IL-10 is a major mediator of sepsis-induced impairment in lung antibacterial host defense. *Journal of immunology* **162**, 392-399 (1999).
- 36 Gogos, C. A., Drosou, E., Bassaris, H. P. & Skoutelis, A. Pro- versus anti-inflammatory cytokine profile in patients with severe sepsis: a marker for prognosis and future therapeutic options. *The Journal of infectious diseases* **181**, 176-180, doi:10.1086/315214 (2000).
- 37 Guisset, O. *et al.* Decrease in circulating dendritic cells predicts fatal outcome in septic shock. *Intensive care medicine* **33**, 148-152, doi:10.1007/s00134-006-0436-7 (2007).
- 38 Abraham, E. & Chang, Y. H. The effects of hemorrhage on mitogen-induced lymphocyte proliferation. *Circulatory shock* **15**, 141-149 (1985).
- 39 Hume, D. A. *et al.* Macrophages exposed continuously to lipopolysaccharide and other agonists that act via toll-like receptors exhibit a sustained and additive activation state. *BMC immunology* **2**, 11 (2001).
- 40 Lehner, M. D., Morath, S., Michelsen, K. S., Schumann, R. R. & Hartung, T. Induction of cross-tolerance by lipopolysaccharide and highly purified lipoteichoic acid via different Toll-like receptors independent of paracrine mediators. *Journal of immunology* **166**, 5161-5167 (2001).
- 41 Hotson, A. N., Hardy, J. W., Hale, M. B., Contag, C. H. & Nolan, G. P. The T cell STAT signaling network is reprogrammed within hours of bacteremia via secondary signals. *Journal of immunology* **182**, 7558-7568, doi:10.4049/jimmunol.0803666 (2009).
- 42 Krutzik, P. O. & Nolan, G. P. Intracellular phospho-protein staining techniques for flow cytometry: monitoring single cell signaling events. *Cytometry. Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology* **55**, 61-70, doi:10.1002/cyto.a.10072 (2003).
- 43 Krutzik, P. O., Irish, J. M., Nolan, G. P. & Perez, O. D. Analysis of protein phosphorylation and cellular signaling events by flow cytometry: techniques and clinical applications. *Clinical immunology* **110**, 206-221, doi:10.1016/j.clim.2003.11.009 (2004).
- 44 Perez, O. D. & Nolan, G. P. Simultaneous measurement of multiple active kinase states using polychromatic flow cytometry. *Nature biotechnology* **20**, 155-162, doi:10.1038/nbt0202-155 (2002).
- 45 Cao, S., Hudnall, S. D., Kohen, F. & Lu, L. J. Measurement of estrogen receptors in intact cells by flow cytometry. *Cytometry* **41**, 109-114 (2000).
- 46 Lecoeur, H., Ledru, E. & Gougeon, M. L. A cytofluorometric method for the simultaneous detection of both intracellular and surface antigens of

- apoptotic peripheral lymphocytes. *Journal of immunological methods* **217**, 11-26 (1998).
- 47 Krutzik, P. O., Trejo, A., Schulz, K. R. & Nolan, G. P. Phospho flow cytometry methods for the analysis of kinase signaling in cell lines and primary human blood samples. *Methods in molecular biology* **699**, 179-202, doi:10.1007/978-1-61737-950-5_9 (2011).
- 48 Brown, M. & Wittwer, C. Flow cytometry: principles and clinical applications in hematology. *Clinical chemistry* **46**, 1221-1229 (2000).
- 49 Krutzik, P. O., Clutter, M. R. & Nolan, G. P. Coordinate analysis of murine immune cell surface markers and intracellular phosphoproteins by flow cytometry. *Journal of immunology* **175**, 2357-2365 (2005).
- 50 Hulspas, R. *et al.* Flow cytometry and the stability of phycoerythrin-tandem dye conjugates. *Cytometry Part A* **75A**, 966-972, doi:10.1002/cyto.a.20799 (2009).
- 51 Saunders, A. E. & Johnson, P. Modulation of immune cell signalling by the leukocyte common tyrosine phosphatase, CD45. *Cellular signalling* **22**, 339-348, doi:10.1016/j.cellsig.2009.10.003 (2010).
- 52 Hercus, T. R. *et al.* The GM-CSF receptor family: mechanism of activation and implications for disease. *Growth factors* **30**, 63-75, doi:10.3109/08977194.2011.649919 (2012).
- 53 Elbim, C. *et al.* Intracellular pool of IL-10 receptors in specific granules of human neutrophils: differential mobilization by proinflammatory mediators. *Journal of immunology* **166**, 5201-5207 (2001).
- 54 Sabat, R. *et al.* Biology of interleukin-10. *Cytokine & growth factor reviews* **21**, 331-344, doi:10.1016/j.cytogfr.2010.09.002 (2010).
- 55 Guha, M. & Mackman, N. LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cellular signalling* **13**, 85-94 (2001).
- 56 Auffray, C., Sieweke, M. H. & Geissmann, F. Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. *Annual review of immunology* **27**, 669-692, doi:10.1146/annurev.immunol.021908.132557 (2009).
- 57 Astiz, M., Saha, D., Lustbader, D., Lin, R. & Rackow, E. Monocyte response to bacterial toxins, expression of cell surface receptors, and release of anti-inflammatory cytokines during sepsis. *The Journal of laboratory and clinical medicine* **128**, 594-600 (1996).
- 58 Monneret, G. *et al.* The anti-inflammatory response dominates after septic shock: association of low monocyte HLA-DR expression and high interleukin-10 concentration. *Immunology letters* **95**, 193-198, doi:10.1016/j.imlet.2004.07.009 (2004).