



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

**EFFECTOS DE LA INFLAMACIÓN CRÓNICA EN LA FUNCIÓN DEL SISTEMA  
INMUNE**

**TESIS**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestro en Ciencias**

**PRESENTA:  
JOSÉ ALEJANDRO CISNEROS SEGURA**

**TUTOR PRINCIPAL  
JOSÉ CARLOS CRISPÍN ACUÑA - INCMNSZ**

**MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR  
FELIX RECILLAS TARGA – IFC  
CONSTANTINO III ROBERTO LÓPEZ MACIAS – FAC MED**

Ciudad de México. Marzo, 2021



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.



A mi abuelo, Erasmo Cisneros.

*A mis tutores, Dr. Crispín y Dra. Rosetti, por abrirme las puertas de su laboratorio desde la licenciatura, por compartir su conocimiento y pasión por hacer ciencia, por descubrir nuevas cosas y motivarme a seguir aprendiendo. Por su apoyo tanto en situaciones académicas y personales a lo largo de estos años.*

*A mis padres, Mercedes Segura y José Ignacio, por su apoyo y amor incondicional, por ser mi motivación y ejemplo para siempre ser mejor y aprender más cada día y nunca rendirme, la culminación de este trabajo representa una pequeña forma de devolverles todo lo que han hecho por mí.*

*A mi hermano, Jesús Ignacio, por su amor de hermanos, por sus palabras, motivación y por escucharme cuando lo necesitaba.*

*A Cynthia Gonzalez, por su apoyo incondicional desde que comencé ésta etapa, por darme la motivación necesaria para que esta etapa pudiera llegar a su fin y por estar ahí para mí siempre, incluso en los peores momentos.*

*A Noé Rodríguez, por compartir su amor a la ciencia conmigo durante el tiempo que trabajamos juntos, por su apoyo en los experimentos que empezaban en la madrugada y terminaban hasta más de media noche, por todas las ideas, sugerencias y pláticas que ayudaron a la culminación de este proyecto.*

*A Giovanna, Marco, Iris, Abigail y Rogelio, por su amistad, por las tardes de pizza, por los labs meetings, por el apoyo en experimentos e ideas que hicieron posible terminar este proyecto.*

*A los miembros de mi comité tutor, Dr. Félix Recillas y Dr. Constantino III, por las ideas y sugerencias que proporcionaban semestre con semestre para que este proyecto fuera posible.*

*Al Dr. Iván Valdés, por su guía durante todo el proyecto, por enseñarme a realizar las cirugías y por brindarme su amistad cuando lo necesitaba.*

*Al Dr. Carlos Rodríguez, por su apoyo para poder realizar la parte experimental con pacientes del instituto para este proyecto.*

*A Gustavo Tapia, alumno de doctorado del Dr. Félix Recillas, por su guía, consejos, sugerencias en la parte de epigenética del proyecto.*

*A Dámaris Romero, por las interminables sesiones de sortear y de leer muestras.*

*Al Dr. Javier Barrios, por facilitarnos el BSL3 para las inoculaciones de Listeria.*

*A Mariela Contreras, por todo su apoyo en el bioterio.*

*A todos los integrantes del departamento de reumatología, por las sesiones de investigación y los lunes de artículos, por todo lo que me enseñaron durante mi tiempo ahí; en especial a Meliton por las pláticas y consejos.*

*A todos los que participaron indirecta o directamente en el proyecto, gracias.*

Gracias al Posgrado en Ciencias Bioquímicas por el apoyo brindado para la realización de este proyecto.

“Algún día América tendrá una voz de continente, una voz de pueblo unido. Una voz que será respetada y oída; porque será la voz de pueblos dueños de su propio destino”

Salvador Allende



## Índice

Resumen.....	1
Introducción .....	3
<b>Generalidades de Sepsis .....</b>	<b>3</b>
<b>Inmunología de la sepsis.....</b>	<b>7</b>
<b>Evidencia clínica en pacientes tras un episodio agudo de sepsis.....</b>	<b>11</b>
<b>Evidencia experimental de inmunosupresión asociada a sepsis.....</b>	<b>15</b>
Justificación .....	21
Hipótesis.....	22
Objetivos .....	23
<b>Objetivo general.....</b>	<b>23</b>
<b>Objetivos específicos.....</b>	<b>23</b>
Materiales y Métodos .....	24
<b>Anticuerpos .....</b>	<b>24</b>
<b>Ratones .....</b>	<b>24</b>
<b>Modelo de sepsis .....</b>	<b>25</b>
<b>Infección con <i>Listeria monocytogenes</i>-OVA.....</b>	<b>25</b>
<b>Determinación de U.F.C. ....</b>	<b>26</b>
<b>Ensayo de citotoxicidad.....</b>	<b>26</b>
<b>Citometría de flujo .....</b>	<b>27</b>
<b>Extracción RNA y DNA.....</b>	<b>28</b>
<b>PCR en tiempo real.....</b>	<b>28</b>
<b>Primers.....</b>	<b>28</b>
<b>Inmunoprecipitación de Cromatina .....</b>	<b>30</b>
<b>Hipersensibilidad a DNAsa I.....</b>	<b>30</b>
<b>Estadística .....</b>	<b>31</b>
<b>Búsqueda de pacientes y toma de muestra. ....</b>	<b>31</b>
Resultados .....	32
<b>La sepsis afecta directamente la producción de IFN-<math>\gamma</math> en células T CD8<sup>+</sup>.....</b>	<b>32</b>
<b>Las células T CD8 de los sobrevivientes de sepsis son menos efectivas ante retos antigénicos .....</b>	<b>39</b>
<b>El defecto en la producción de IFN-<math>\gamma</math> se establece a nivel epigenético .....</b>	<b>42</b>
<b>La sepsis afecta la expresión de NeST, un lncRNA implicado en la remodelación de la cromatina a nivel del locus de <i>Ifng</i>.....</b>	<b>46</b>

<b>Los cambios en las células expuestas a sepsis son inducidos por la exposición per se, no por una activación inespecifica.....</b>	<b>49</b>
<b>El defecto que ocurre en células CD8 durante la sepsis es independiente del estado de activación de las células CD8. ....</b>	<b>52</b>
<b>Las células de pacientes que sobrevivieron a un episodio de sepsis presentan una disminución en la producción de IFN<math>\gamma</math>.....</b>	<b>54</b>
<b>Análisis de Resultados.....</b>	<b>56</b>
<b>Conclusiones .....</b>	<b>62</b>
<b>Bibliografía.....</b>	<b>63</b>
<b>Anexo 1 .....</b>	<b>69</b>

## Resumen

En sepsis, la desregulación de la respuesta inmune contra un patógeno provoca daño grave en diversos órganos. La misma respuesta exagerada evoca mecanismos antiinflamatorios que tienen como objetivo frenar el daño a tejidos, sin embargo, esto provoca un estado de inmunosupresión global que causa susceptibilidad a infecciones, la cual es una de las principales causas de muerte en los pacientes posterior a un episodio de sepsis.

A la fecha se desconoce la causa de la inmunosupresión prolongada en los sobrevivientes a sepsis. Las infecciones por patógenos intracelulares representan una causa común de enfermedad en sobrevivientes a sepsis. Por esa razón, y tomando en cuenta lo anterior, postulamos la hipótesis de que la sepsis provoca una desregulación a diferentes niveles en la función efectora de las células T CD8.

Para probar nuestra hipótesis, diseñamos un modelo animal que nos permitiera analizar los efectos que la sepsis induce en las células T CD8 y descubrir el mecanismo que explica su disfunción. Indujimos sepsis abdominal polimicrobiana en ratones OT-I cuyas células T CD8 son específicas para ovoalbúmina. Un mes después, transferimos las células CD8 a ratones sanos y probamos su capacidad efectora durante la infección con una cepa de *Listeria monocytogenes* que expresa ovoalbúmina. Eso nos permitió analizar la funcionalidad de las células T CD8 durante una infección y determinar si la exposición a sepsis la afectaba.

Nuestros resultados mostraron que las células T CD8 expuestas a sepsis no eran capaces de proteger al animal de la infección por *Listeria*. Eso se asociaba a un defecto en la transcripción de la citocina interferón (IFN)- $\gamma$ . Analizamos el estado de la cromatina a nivel del locus de *Ifng* y observamos menor accesibilidad en las células expuestas a sepsis. Dicho defecto se acompañaba de la ausencia de un RNA largo no codificante (lncRNA) llamado NeST, que en condiciones normales facilita la transcripción de *Ifng* a través de reclutar remodeladores de la cromatina.

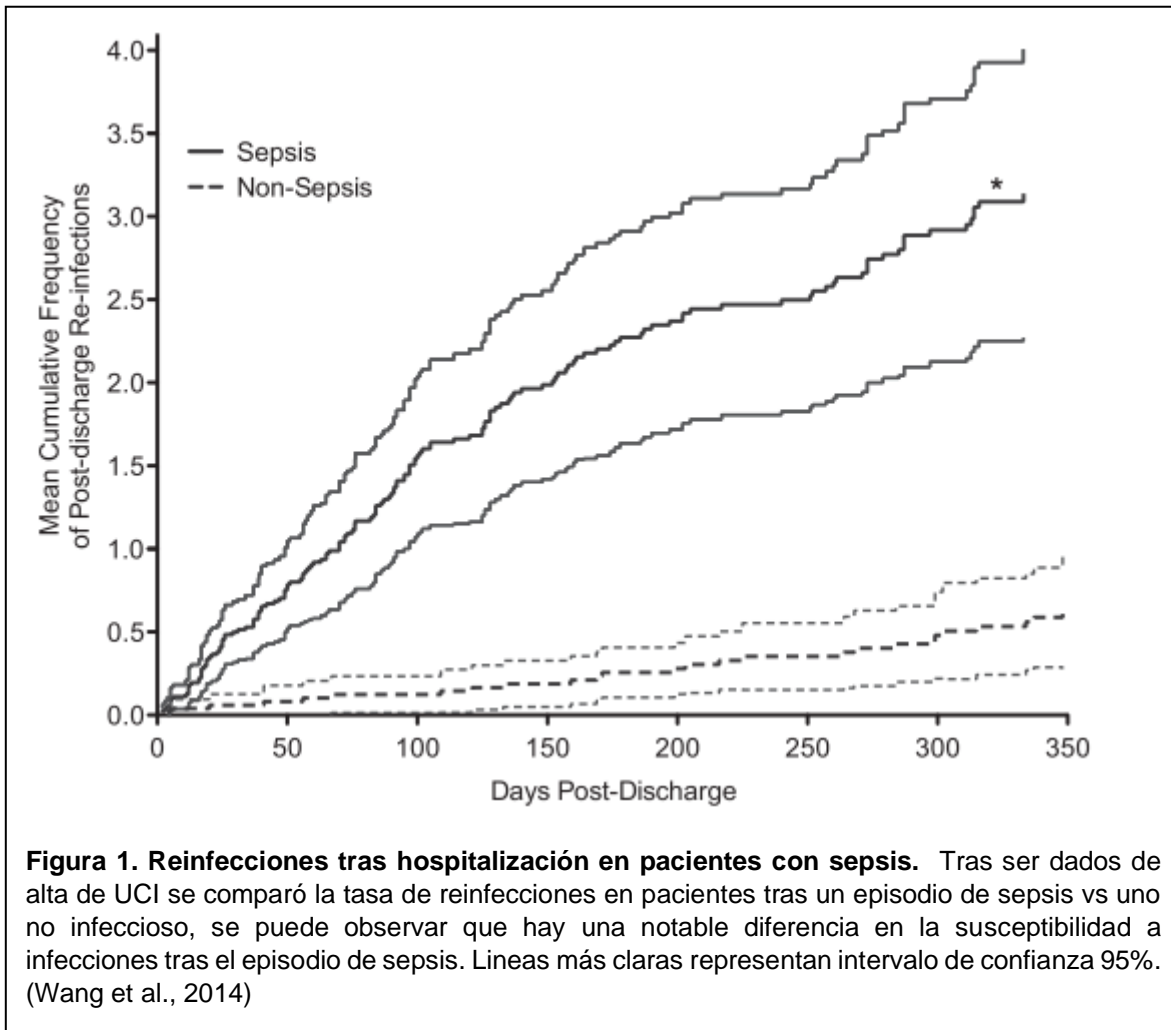
En resumen, en este trabajo identificamos que la exposición de las células T CD8 a sepsis afecta la regulación de la expresión del lncRNA NeST, lo que probablemente impide que se lleven a cabo cambios epigenéticos a nivel del locus de *Ifng* que son necesarios para la correcta expresión de *IFN*- $\gamma$ . Nuestro trabajo sugiere un nuevo mecanismo que explica cómo la sepsis afecta la función de las células T CD8.

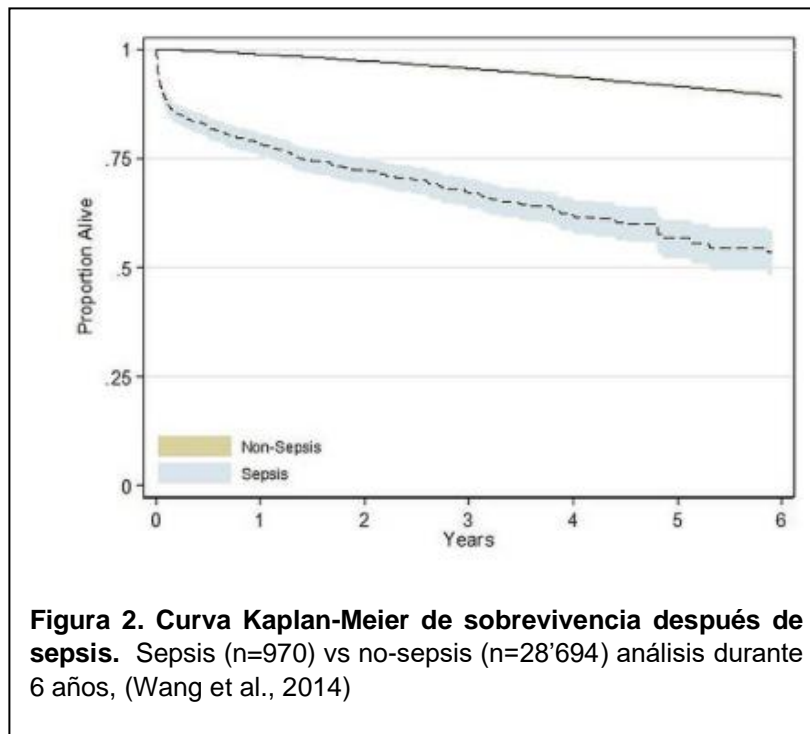
## Introducción

### Generalidades de Sepsis

La sepsis es un síndrome desencadenado por respuestas inflamatorias graves, generalmente a infecciones. En los pacientes con sepsis, la inflamación sistémica intensa y mal regulada conduce a la disfunción de órganos vitales y, frecuentemente, a la muerte (Delano & Ward, 2016; Singer et al., 2016). La sepsis representa el extremo de un espectro clínico y patológico en donde la inflamación causa disfunción celular a través de mecanismos no dilucidados completamente. En los pacientes con sepsis, la falla en la regulación inmunológica es patológica por la respuesta inflamatoria exacerbada y también, paradójicamente, por la presencia concomitante de inmunosupresión (Delano & Ward, 2016). La mortalidad en los pacientes con sepsis es elevada (30 - 50%) y representa una de las principales causas de muerte en las unidades de terapias intensiva. Sin embargo, es importante mencionar que el pronóstico de los pacientes que sobreviven un episodio de sepsis es sombrío: se ha estimado que su mortalidad es más del doble que la de la población control (Cabrera-Perez et al., 2014; Hotchkiss et al., 2009; Storgaard et al., 2013) (**Figura 1**). Las personas que sobreviven episodios de sepsis son más susceptibles a infecciones, posterior al ser dados de alta durante el primer año pasientes con sepsis presentan mayores infecciones vs controles con una tasa de 5.68, lo que se refleja en una incidencia de 3.22 infecciones por año-paciente comparada con 0.6 en el grupo control. Por esta razón, las infecciones representan

una de las principales causas de muerte en esta población (Henriksen et al., 2017) (**Figura 2**). Por otro lado, se ha documentado una mayor incidencia de reactivación de virus latentes, por ejemplo de varicela zoster (Walton et al., 2014).





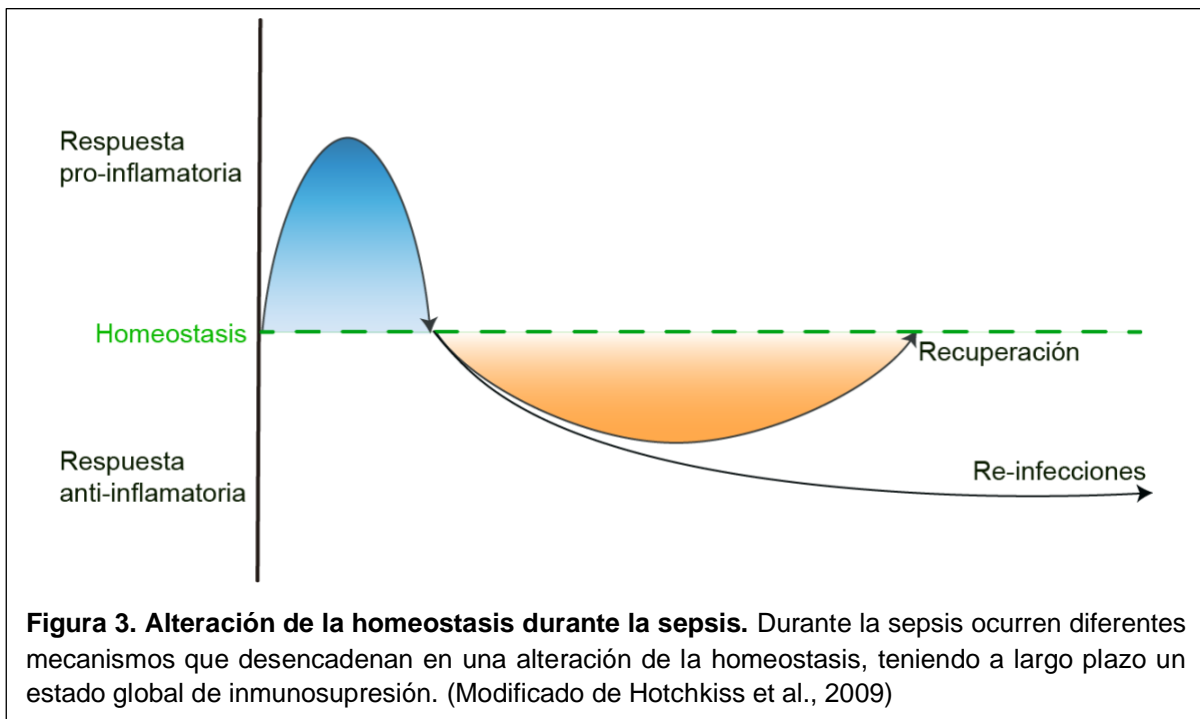
Estos datos indican que la disfunción inmune que caracteriza a la sepsis puede continuar más allá del episodio agudo y que por su magnitud ésta es relevante, ya que aumenta la susceptibilidad a infecciones. La sepsis representa una de las principales causas de muerte a nivel mundial, superando a enfermedades cardiovasculares (infarto agudo de miocardio) y neurológicas (evento vascular cerebral). Se estima que anualmente hay en el mundo 31.5 millones de casos de sepsis y 19.4 de sepsis severa. En algunos países se ha estimado que la mortalidad por sepsis oscila entre el 20% y el 50%. En México, la CONAMED realizó un estudio basado en los registros de egresos hospitalarios del Sistema Nacional de Información en Salud (SINAIS), a cargo de la Secretaría de Salud. Entre 2008 y 2015 la tasa de mortalidad por sepsis fue de 80.5% y, en pacientes mayores a 75 años de edad de 89.3%. En otro estudio realizado en el país (2009) la tasa de

mortalidad por sepsis fue de 30.4% et al., 2009). La diferencia tan grande entre los dos estudios puede ser explicada por las características de las poblaciones evaluadas (Cisneros-González N and Ceballos RM, 2009)



## Inmunología de la sepsis

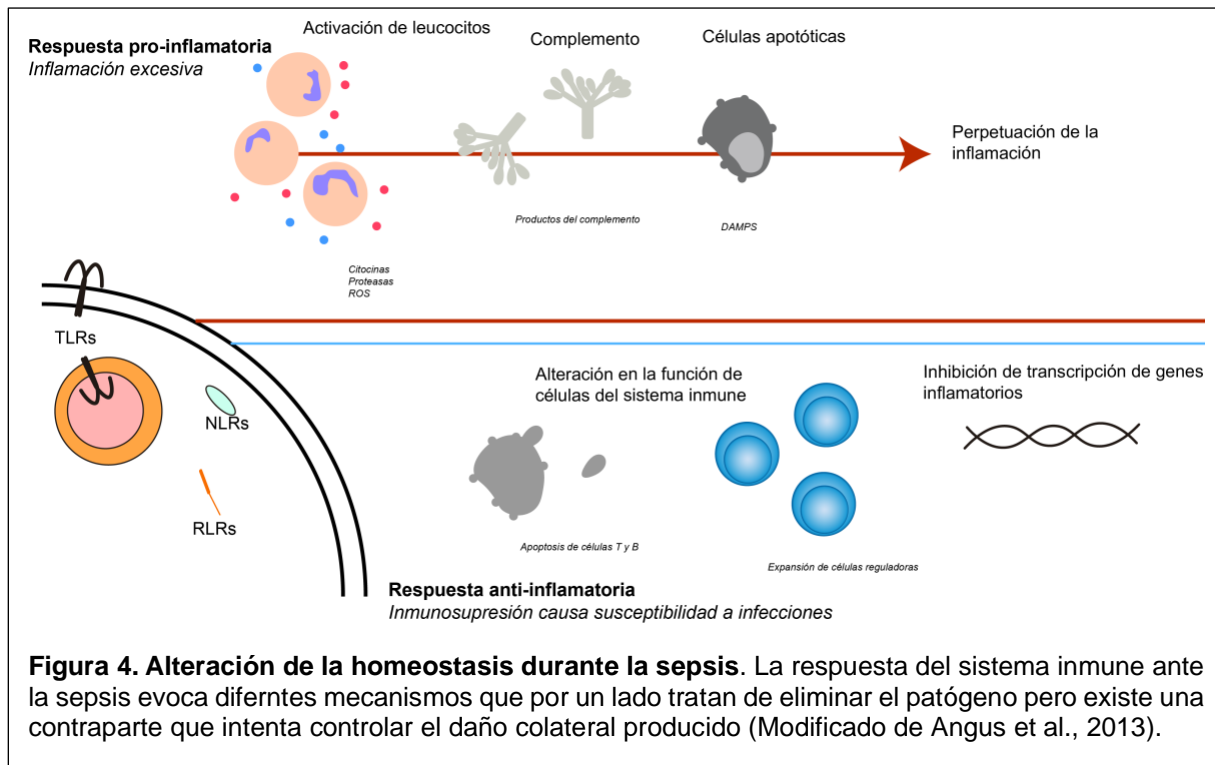
La sepsis se desencadena por una respuesta inflamatoria intensa, en general debida a una infección. Por razones que no se conocen muy bien, el estímulo inflamatorio causa una activación inmune exagerada que se acompaña de la producción de citocinas proinflamatorias y la activación de células del sistema inmune y otras células; por ejemplo, células endoteliales. En forma paralela, y quizá en respuesta a la inflamación intensa, se desarrolla un estado de inmunosupresión (Figura 3).



Por esa razón, para conceptualizar mejor lo que ocurre en la sepsis, ésta se ha dividido en dos fases, de acuerdo a la respuesta inmunológica predominante: etapa inflamatoria y etapa antiinflamatoria. La etapa inflamatoria se caracteriza por

inflamación excesiva en respuesta a la infección. Esta etapa se asocia con disfunción endotelial y daño a diversos órganos que conduce a falla multiorgánica.

A la par, como un mecanismo compensatorio, se establece un estado prologando de inmunosupresión. Éste se caracteriza, por una respuesta deficiente de las células del sistema inmune, por apoptosis de las mismas y por un incremento en la concentración de citocinas antiinflamatorias, incremento de células T reguladoras y alteraciones en los programas transcripcionales de las células, lo que provoca que se establezca el estado inmunosuprimido (**Figura 4**) (Angus & Van Der Poll, 2013).

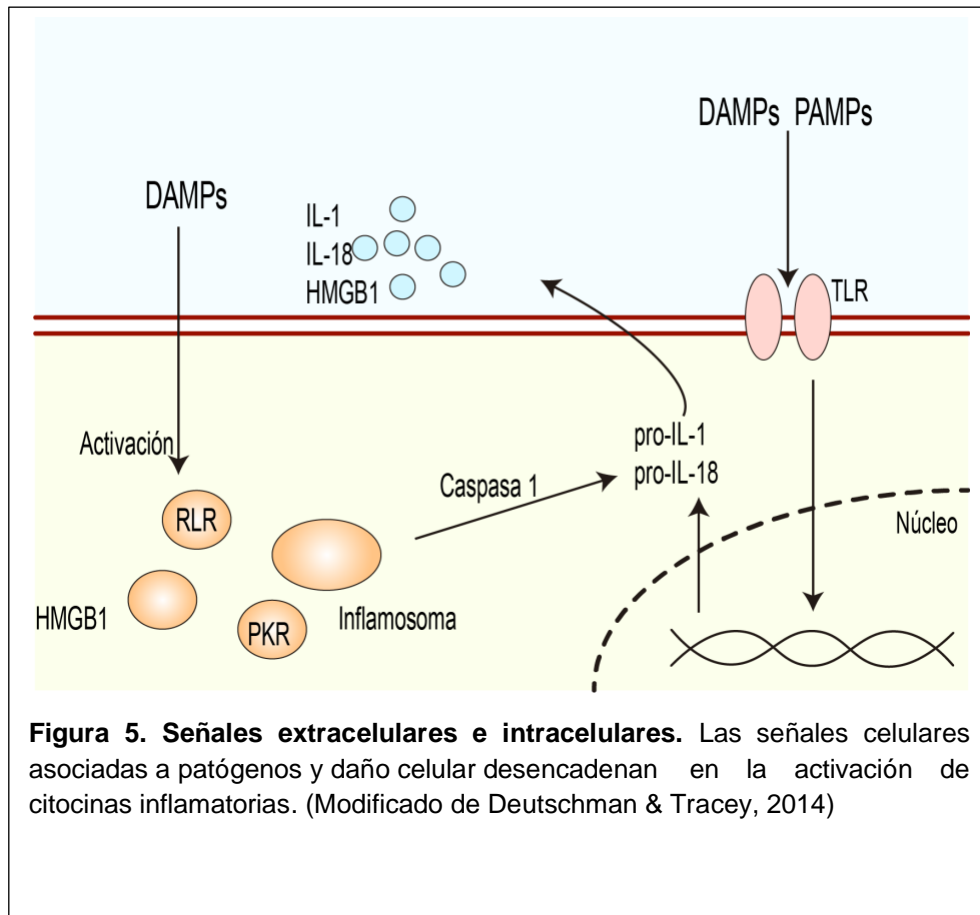


**Figura 4. Alteración de la homeostasis durante la sepsis.** La respuesta del sistema inmune ante la sepsis evoca diferentes mecanismos que por un lado tratan de eliminar el patógeno pero existe una contraparte que intenta controlar el daño colateral producido (Modificado de Angus et al., 2013).

Las células del sistema inmune innato y las células epiteliales y endoteliales son inundadas por estímulos pro-inflamatorios, a través de receptores de patrones moleculares como receptores tipo toll (TLRs), tipo NOD (NLRs), tipo RIG (RLRs) y receptores tipo Scavenger. Además, se activa el complemento y la cascada de la coagulación. Todo esto tiene como resultado la fosforilación de MAPKs, JAKs, STATs y NF- $\kappa$ B, generando grandes cantidades de citocinas pro-inflamatorias como TNF e IL-1 $\beta$ , así como leucotrienos, histamina, bradicinina, serotonina e IL-2 (Deutschman & Tracey, 2014) (**Figura 5**). La activación del complemento representa la fuente de algunos de los mediadores inflamatorios más importantes, las anafilatoxinas C3a y C5a, las cuales son potentes quimioatrayentes para neutrófilos, monocitos y macrófagos. Esto amplifica la respuesta inflamatoria y genera especies reactivas de oxígeno, involucradas en el daño tisular y vasodilatación. Las vías de señalización resultan redundantes y complementarias durante el proceso inflamatorio y existe una activación simultánea de la cascada de coagulación posiblemente mediada por el factor tisular derivado de células endoteliales dañadas, monocitos, o polimorfonucleares (**Figura 4**). (Remick, 2007)

En lo que a la inmunosupresión respecta, durante la sepsis se ha observado que existe una producción de receptores solubles (que compiten con los asociados a membrana) para el TNF e IL-1, inhibidores del complemento y producción de citocinas antiinflamatorias como la IL-10 y el TGF- $\beta$ . Otro protagonista de la inmunosupresión es la apoptosis que se produce en los linfocitos B, células T CD4 y células dendríticas, lo cual facilita la producción de citocinas antiinflamatorias que dificultan o disminuyen la respuesta al patógeno. Consecuentemente hay

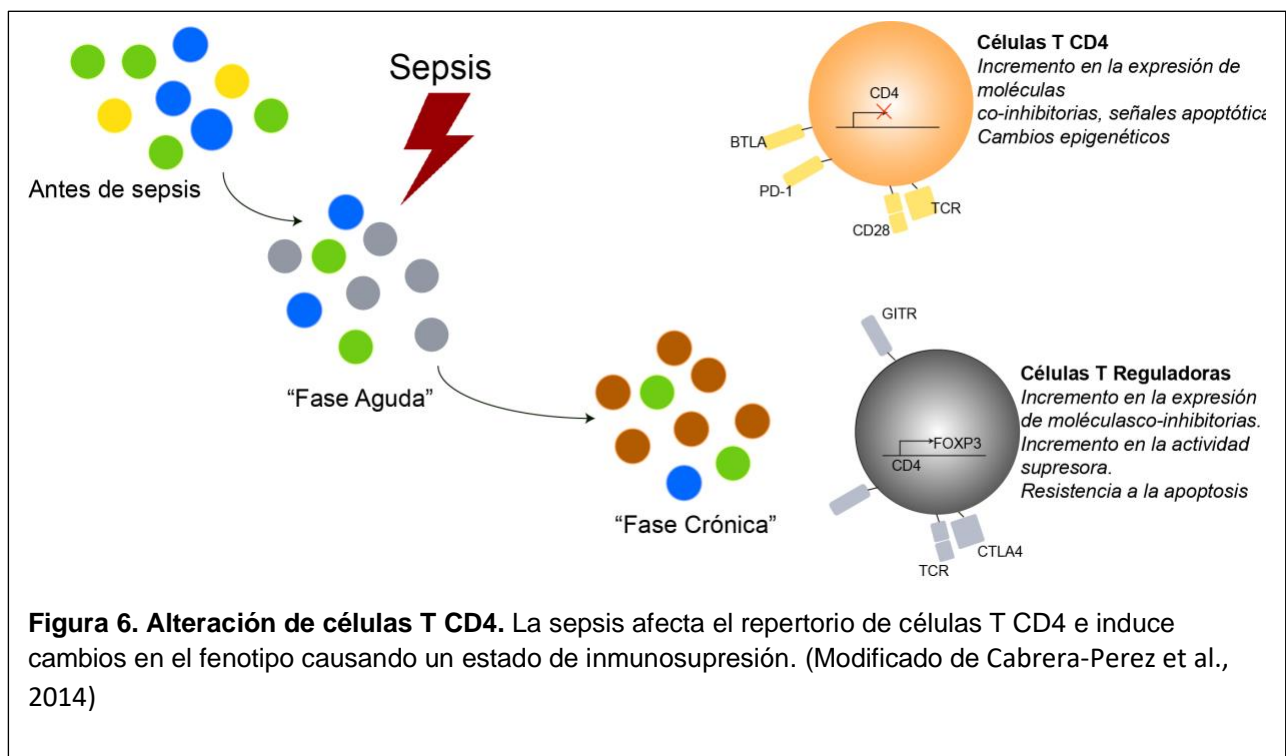
disminuciones en la producción de anticuerpos y la activación de los macrófagos y existe un bloqueo en la presentación de antígenos. Así como una alteración en el repertorio de las células T CD4 (**Figura 6**) (Martin et al., 2003; Hotchkiss et al., 2001).



**Figura 5. Señales extracelulares e intracelulares.** Las señales celulares asociadas a patógenos y daño celular desencadenan en la activación de citocinas inflamatorias. (Modificado de Deutschman & Tracey, 2014)

## Evidencia clínica en pacientes tras un episodio agudo de sepsis

Los pacientes que sobreviven un episodio de sepsis, suelen tener secuelas que alteran su calidad de vida (Cuthbertson et al., 2013). Además, presentan una mayor incidencia de infecciones que se ha asociado a un incremento desproporcionado en su mortalidad (Henriksen et al., 2017).

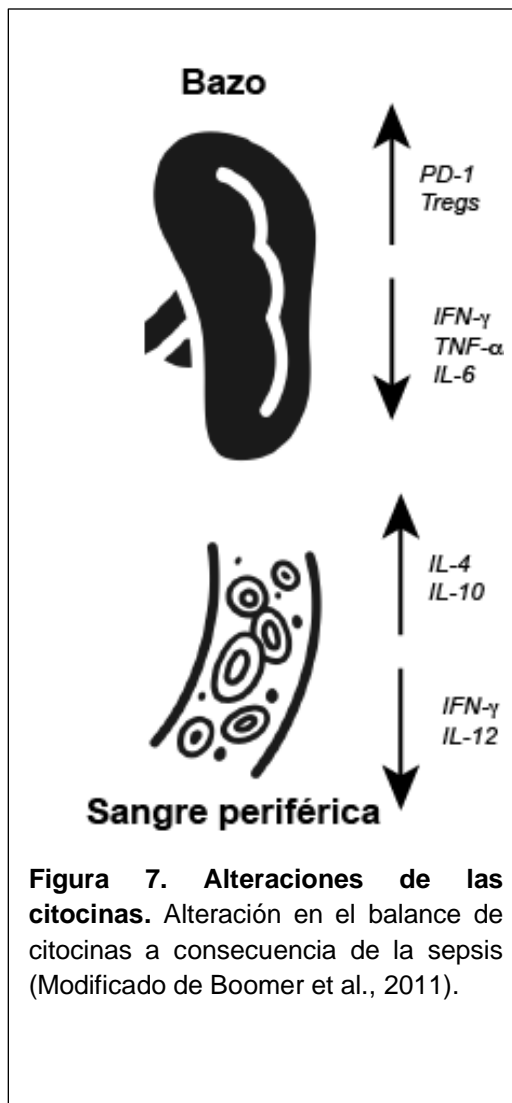


Diferentes estudios han evaluado a los sobrevivientes de sepsis en forma prospectiva. Se ha analizado su supervivencia, la presencia de infecciones y otros. Todos los estudios llegan a una conclusión muy similar: “la población que padeció sepsis, sin importar su etiología, tiene una mortalidad anormalmente elevada a comparación a la población control”. En estos pacientes, las infecciones representan una de las principales causas de muerte (**Tabla 1**) (Henriksen et al., 2017; Kennelly & Martin-Loeches, 2016; Storgaard et al., 2013; Van Vught et al., 2016; T. Wang et al., 2014; Zhang et al., 2013).

<i>Causa de muerte</i>	<b>Sepsis (n=274) n (%)</b>	<b>No-Sepsis (n=2318) n (%)</b>
Infección	88 (32.1)	187 (8.1)
Enfermedad pulmonar crónica	36 (13.1)	92 (4.0)
Cáncer	31 (11.3)	647 (27.9)
Muerte Repentina	23 (8.4)	272 (11.7)
Infarto	18 (6.6)	253 (10.9)
Falla Cardíaca	15 (5.5)	147 (6.3)
Evento Cerebro Vascular	11 (4.0)	160 (6.9)
Enfermedad renal	8 (2.9)	65 (2.8)
Accidente.	3 (1.1)	92 (4.0)
Enfermedad hepática	2 (0.7)	30 (1.3)
Demencia	1 (0.4)	55 (2.4)
Embolismo Pulmonar	0	24 (1.0)
Otra Condición Cardiovascular	11 (4.0)	93 (4.0)
Otra Condición No-Cardiovascular	17 (6.2)	129 (5.6)
Otra	10 (3.7)	72 (3.1)

**Tabla 1. Comparación de causas de muerte en pacientes con y sin sepsis.** Se evaluó la causa de muerte en dos grupos de pacientes que estuvieron internados en UCI (pacientes con sepsis vs pacientes que no tuvieron un episodio infeccioso). Las infecciones fueron la principal causa de muerte en los pacientes con sepsis. Modificada de (H. E. Wang et al., 2014)

La reactivación de infecciones virales latentes representa una de las causas más frecuentes de infección en pacientes con sepsis y en sobrevivientes a sepsis. Al comparar la carga viral en pacientes internados en terapia intensiva y en controles sanos, se observó que los pacientes con sepsis, tenían un mayor porcentaje de cultivos positivos para diversos virus (p. ej. CMV, EBV, HSV, TTV, JC, BK) que pacientes sin un proceso infeccioso (también internados en terapia intensiva) y controles sanos (Roquilly et al., 2017). Al analizar la carga viral (CMV, EBV, HSV, HHV-6 y TTV) desde el diagnóstico de sepsis y a lo largo de diferentes días, se observó un incremento en la carga viral y en la frecuencia de infecciones por dos o más virus, únicamente en el grupo de pacientes con sepsis (Walton et al., 2014). Además de la reactivación de virus, se ha documentado un incremento en infecciones causadas por hongos y bacterias oportunistas en aquellos pacientes que sobrevivieron un episodio agudo de sepsis (Gordon P Otto et al, 2018; Xie et al., 2008).

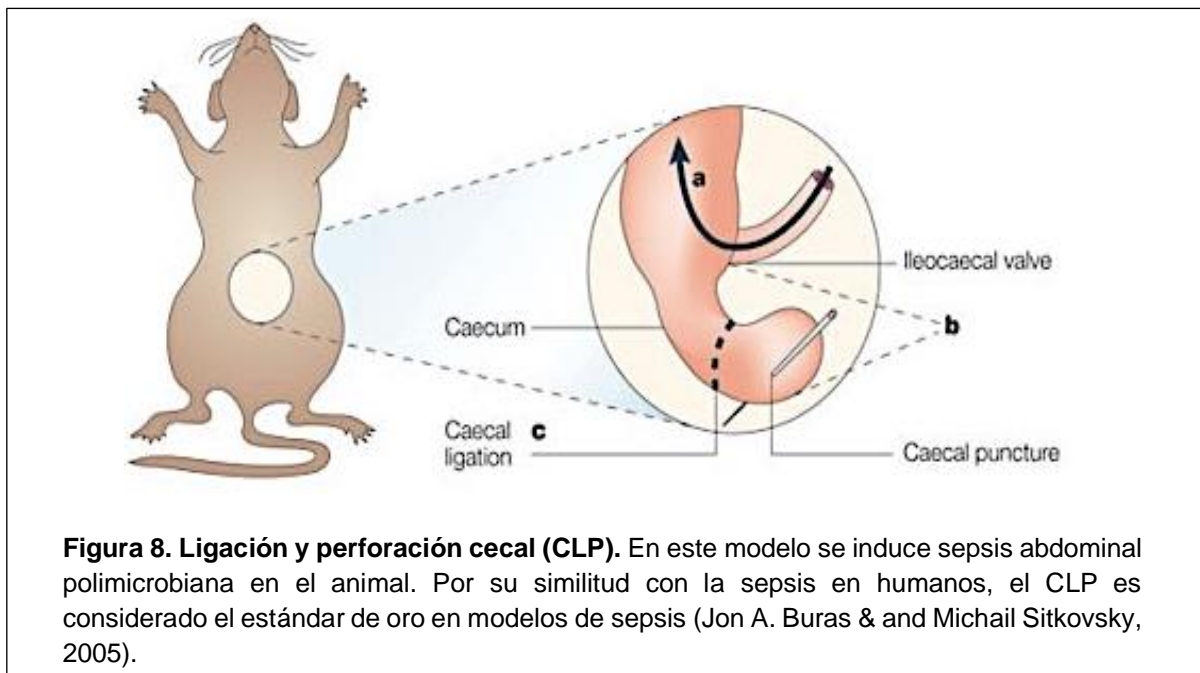


Para dilucidar la causa que provoca este estado de inmunosupresión, responsable de la reactivación viral y de infecciones oportunistas, diversos grupos han analizado el fenotipo de las células T en pacientes con sepsis durante el episodio y *post mortem*. Se ha observado en sangre periférica que el balance entre citocinas Th1 y Th2 está alterado en sepsis. Utilizando muestras de tejido de bazo y pulmón *post mortem* recién aisladas de 40 pacientes que murieron en unidades de cuidados intensivos, como resultado de sepsis severa (en comparación con muestras similares de pacientes no sépticos y controles), se observó una reducción significativa en la producción de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, e IL-10 después de 5 h de estimulación (LPS y anti-CD3/CD28), lo que sugiere un estado funcional alterado de células T (**Figura 7**) (Boomer et al., 2011). Un descubrimiento importante fue que cuando se estimularon con LPS los esplenocitos de pacientes con sepsis, la producción de citocinas proinflamatorias y antiinflamatorias, estaba gravemente disminuido (a menos del 10% de pacientes sin sepsis). Tanto el bazo, como el pulmón mostraron expresión incrementada de receptores inhibitorios (ej. PD-1), expansión de células T reguladoras y células supresoras de origen mieloide y una disminución en la expresión de vías de activación (**Figura 7**) (Hotchkiss et al., 2013). Claramente, la sepsis induce múltiples mecanismos superpuestos de inmunosupresión. Esto se refleja en la disminución de la respuesta de células del sistema inmune innato y adaptativo.



## Evidencia experimental de inmunosupresión asociada a sepsis

Para entender mejor los mecanismos que gobiernan cada una de las fases de la sepsis, se han desarrollado modelos animales que recrean lo que sucede en el humano. Algunos modelos, como el modelo de endotoxemia o por infección con bacterias, son limitados y variables y no recrean de una manera completa lo que sucede en el humano (Jon A. Buras & Michail Sitkovsky, 2005). El modelo mejor caracterizado y considerado el estándar de oro es la ligación y perforación cecal (CLP, por sus siglas en inglés). En este modelo se liga el ciego, para causar necrosis, y se perfora para liberar materia fecal en el peritoneo (**Figura 8**). Esto resulta en sepsis polimicrobiana muy similar a lo que sucede en humanos con sepsis abdominal (Rittirsch et al., 2009).



Se ha observado que una población celular, denominada célula supresora derivada de médula ósea, está incrementada a partir del día 3 de sepsis y hasta 12 semanas después del reto. Esta población puede suprimir a células CD4 y CD8 y favorecer una respuesta tipo Th2, contribuyendo a la inmunosupresión (Cuenca & Delano, 2011).

Una molécula altamente conocida asociada a falta de respuesta de las células T, es PD-1. Esta molécula se expresa en condiciones de agotamiento y funciona como un freno que detiene la respuesta celular (Sharpe & Pauken, 2018). Este marcador se ha encontrado incrementado en sepsis, por lo que se ha planteado su bloqueo como alternativa terapéutica para revertir la inmunosupresión (Wherry et al., 2007).

La susceptibilidad a infecciones secundarias también ha sido documentada en modelos animales. Empleando el modelo CLP se retaron a los ratones con una dosis letal de *Candida albicans* encontrando que el grupo con CLP presentaba mayor mortalidad que el grupo control, teniendo así evidencias que indican que existe un estado de mayor susceptibilidad a infecciones (Davis et al., 2011). En forma análoga, la respuesta ante una infección con *Pseudomonas aeruginosa* está disminuida la capacidad de responder ante la infección en ratones después de un episodio de sepsis (Muenzer et al., 2010).

La sepsis tiene efectos en una amplia cantidad de células. Muchas investigaciones se han enfocado en entender el papel de las células fagocíticas, siendo éstas las células que participan en el aclaramiento de patógenos y en la presentación de antígenos (Hughes et al., 2016). Muchos reportes indican que la sepsis provoca

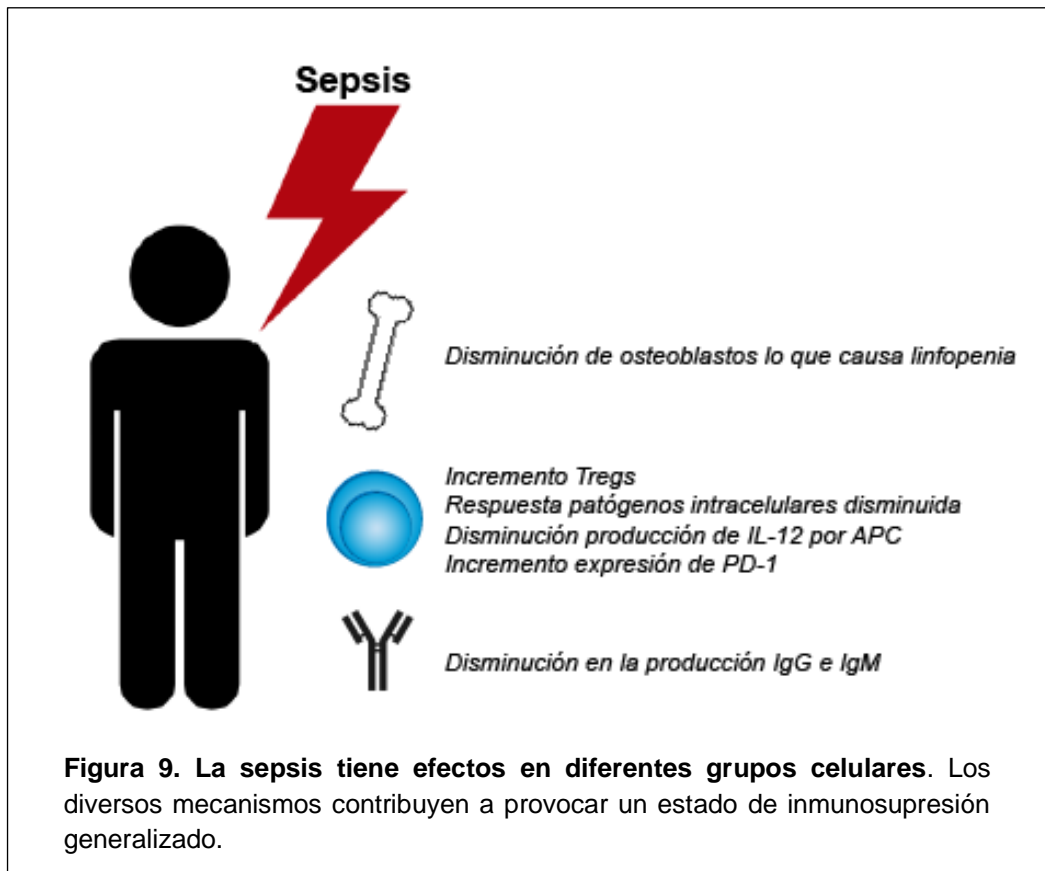
alteraciones en la mielopoyesis y en la función de los neutrófilos (Demaret et al., 2015; Fan et al., 2015; Rodriguez et al., 2009).

Otra población celular afectada por la sepsis es la de los osteoblastos. Éstos participan en la formación de huesos y en la homeostasis linfoide. La sepsis induce una reducción en esta población celular, lo que tiene diversos efectos entre los que se encuentra una pérdida de la densidad ósea y linfopenia causada por una disminución en la población de progenitores linfoides comunes; lo anterior, como consecuencia de una deficiencia en la producción de IL-7 por los osteoblastos, que repercute en la homeostasis linfoide (Terashima et al., 2016). Las células B también se ven afectadas a consecuencia de la sepsis. En el modelo de CLP se documentó que días después de la inducción de sepsis, existe un decremento en la capacidad de producción de IgG e IgM en células B (Mohr et al., 2012).

En modelos de neumonía por *E. coli* se ha demostrado que la sepsis provoca una mayor susceptibilidad a un segundo reto con esta bacteria. Esto se ha atribuido a un incremento en las células T reguladoras y a producción de TFG- $\beta$  que induce en macrófagos y células dendríticas un programa transcripcional asociado a represión (Roquilly et al., 2017)

Un incremento en la producción de IL-33 ha sido documentado en sepsis. Esta citocina se produce principalmente por células epiteliales y endoteliales en respuesta a daño celular, también células innatas en respuesta a citocinas pro-inflamatorias y a la estimulación a través de TLRs. La IL-33 favorece la diferenciación de células linfoides innatas tipo 2 (ILC2) que, a su vez, secretan IL-4 e IL-13 y favorecen la polarización de macrófagos a un fenotipo M2, lo que favorece

la diferenciación de células CD4 hacia células T reguladoras (Tregs; Nascimento et al., 2017).



Se ha demostrado que las Tregs juegan un papel en la inmunosupresión secundaria a sepsis. Esta población se encuentra incrementada (Bouras, Asehnoune, & Roquilly, 2018; Tatura et al., 2015) y se ha descrito un incremento en marcas de cromatina asociadas a cromatina permisiva en el locus de *Foxp3*. Esto facilita su transcripción y, por ende, la de sus genes blanco (Carson et al., 2011), lo que incrementa su capacidad supresora. También se ha demostrado una reducción en la expresión de HLA-DR, en la presentación de antígenos, en la expresión de

citocinas y otros mediadores pro-inflamatorios y un aumento en la producción de IL-10. (Hutchins et al, 2014; McClure et al., 2015)

La respuesta en contra de patógenos intracelulares es mediada principalmente por células CD8. Los pacientes que sobreviven episodios de sepsis tienen un incremento en la carga viral y en la tasa de infecciones por estos patógenos. Sin embargo, se desconoce por qué. La activación de células CD8 en respuesta a *L. monocytogenes* se encontró alterada al realizar transferencias de células OT-I a ratones durante un episodio de sepsis aguda (2 días después de haber iniciado) inducida por CLP. Esto se atribuyó a una reducción en la población de células dendríticas y a una deficiencia en la producción de IL-12, la cual es crucial para la producción de IFN- $\gamma$  dependiente de STAT4 (Strother et al., 2016)

Asimismo, la capacidad efectora de las células CD8 se vio comprometida como consecuencia de la sepsis, ya que en modelos in vivo se demostró que existe mayor susceptibilidad ante la infección con el virus de coriomeningitis linfocítica (LCMV) que se reflejó en un incremento en la mortalidad y en la carga viral (Condotta et al., 2015)

En resumen, la sepsis es un estado patológico que se desencadena, a través de mecanismos mal entendidos, por la presencia de inflamación sistémica intensa, generalmente en el contexto de infecciones graves. La falla en los mecanismos de regulación del sistema inmune durante la sepsis es compleja y de gran magnitud e incluye componentes pro y antiinflamatorios. De particular importancia clínica e interés científico es el hecho de que un número importante de estas anomalías persiste en los pacientes más allá del episodio clínico de sepsis. Considerando que

una proporción grande de las infecciones que afectan a los pacientes durante y después de la sepsis son por virus, en este trabajo quisimos analizar la función de las células T CD8+ y determinar si ésta se afecta por la sepsis.

## Justificación

La evidencia disponible indica que la función efectora de las células T CD8 se ve disminuida durante el fenómeno conocido como “parálisis inmune” secundario a un episodio de sepsis. El IFN- $\gamma$  es una citocina clave para la función de las células T CD8. Por su importancia funcional y por su potente capacidad pro-inflamatoria, la expresión del IFN- $\gamma$  está sujeta a un estricto control a nivel transcripcional. Dicho control transcripcional se ejerce a través de factores de transcripción (e.g. T-bet), pero también a nivel epigenético.

El hecho de que exista un incremento en infecciones intracelulares y que se ha propuesto la administración de citocinas como IFN- $\gamma$  para restaurar la función de las células, representa las bases de este trabajo.

## Hipótesis

Uno de los mecanismos que contribuye a la inmunosupresión se lleva a cabo a través de defectos en regulación epigenética en el locus de genes asociados a función efectora en células T CD8+



## Objetivos

### **Objetivo general**

Determinar si existe una alteración en la función efectora de células T CD8 a consecuencia de la sepsis, empleando un modelo murino ampliamente caracterizado para sepsis.

### **Objetivos específicos**

- Determinar si la inflamación crónica en un ambiente de sepsis altera la función efectora de las células T CD8 en forma intrínseca.
- Analizar cuales funciones efectoras se afectan en células T CD8.
- Determinar si existen alteraciones en los mecanismos epigenéticos que regulan las funciones efectoras de las células T CD8.

## Materiales y Métodos

### **Anticuerpos**

Los siguientes anticuerpos se obtuvieron de BioLegend: anti-mouse CD3, CD4, CD8, CD62L, CD44, CD25, CD45.1, CD45.2, TCR-V $\alpha$ 2, TCR-V $\beta$ 5, KLRG1, CD127, IFN- $\alpha$ .

### **Ratones**

Este proyecto y todos los procedimientos empleados, fueron aprobados por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (número de referencia IRE-1933).

Los ratones utilizados en este estudio se criaron en condiciones libres de patógenos específicos en un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas. Los ratones tuvieron acceso *ad libitum* a alimento y agua durante todo el estudio. No se había realizado ningún procedimiento previo en los animales. Se usaron ratones hembra entre 8 y 12 semanas, los ratones fueron asignados aleatoriamente a los grupos experimentales.

Se emplearon ratones OT-I (C57BL/6-Tg(*TcraTcrb*)1100Mjb/J), CD45.1 (B6.SJL-*PtprcaPepcb/BoyJ*) y Act-mOVA (C57BL/6-Tg(CAG-OVAL)916Jen/J) adquiridos en Jackson Labs (EUA).

## **Modelo de sepsis**

Protocolo adaptado de (Dejager, Pinheiro, Dejonckheere, & Libert, 2011; Rittirsch et al., 2009). Los ratones se anestesiaron con Xilazina y Ketamina a una dosis de 60 mg/kg y 15mg/Kg de peso respectivamente, por vía intraperitoneal. El grado de anestesia se determinó pinzando gentilmente las extremidades, hasta que se documentara la falta de respuesta. Se realizó una incisión de 1 cm en la línea media abdominal, 5 mm por debajo del esternón. Se expuso el ciego y en su porción distal (1 cm) se realizó una ligación con seda 4-0. Posteriormente se realizó una perforación en el polo del ciego con una aguja de calibre 22F y mediante presión discreta se extrajo un botón de materia fecal. Se cerró la cavidad abdominal por capas usando material quirúrgico no absorbible. Para la cirugía control (sham), los ratones se anestesiaron de la misma manera y se les realizó una incisión equivalente. Asimismo, se les expuso el ciego. Sin embargo, éste no se ligó ni se perforó. Finalmente se administró 1mL de solución salina isotónica vía I.P. e imipenem (el cual se ha demostrado que no tiene efectos sobre las células T (Pasqui et al., 1995) o en dosis única (25mg/kg) vía subcutánea.

## **Infección con *Listeria monocytogenes*-OVA**

Las células T CD8<sup>+</sup> de OT-I CLP / OT-I Sham se aislaron usando CD8<sup>+</sup> T Cell Isolation Kit II (Miltenyi Biotec) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se inyectaron 1x10<sup>6</sup> células i.v. en la vena lateral de la cola de los ratones receptores CD45.1. Un día después, 10<sup>4</sup> c.f.u. de *Listeria monocytogenes* que expresan OVA recombinante, resistente a cloranfenicol (LM-OVA; Dr. Michael J. Bevan,

Universidad de Washington) se inyectaron i.v. Siete días más tarde, los esplenocitos se aislaron y analizaron usando citometría de flujo. Para determinar la producción de citocinas, se cultivaron  $5 \times 10^6$  esplenocitos a  $37^\circ \text{C}$  durante 5 horas en medio RPMI 1640 con  $1 \mu\text{l/ml}$  Brefeldina A (BD) y estimuladas con el péptido SIINFEKL ( $1 \mu\text{g/mL}$ ). Después del cultivo, las células se tiñeron usando BD Cytofix/Cytoperm Fixation/Permeabilization Kit (BD).

### **Determinación de U.F.C.**

Para determinar la carga bacteriana en ratones infectados, los animales fueron sacrificados y perfundidos con 10 ml de PBS frío. Se maceró el hígado en PBS + 1% de Saponina y se realizaron diluciones 1:1, 1:10, 1:100 y 1:1000 en PBS, posteriormente se sembraron 25uL en placas de agar BHI + cloranfenicol ( $20 \mu\text{g/mL}$ ) por duplicado, se incubaron 24 horas a  $37^\circ \text{C}$  y se determinó el número de UFC empleando la siguiente fórmula:

$$CFU/h\acute{e}gado = \frac{\# \text{ colonias} \times \text{factor de diluci3n}}{0.025 \text{ mL}}$$

### **Ensayo de citotoxicidad**

Se aislaron células T CD8+ de esplenocitos de ratones CD45.1 al día 7 de la infección con LM-OVA mediante separación celular empleando citometría de flujo. Como células blanco se emplearon células de bazo de un ratón mOVA (el cual expresa constitutivamente el antígeno OVA) y células de un ratón silvestre como control negativo; las cuales se tiñeron con diferentes concentraciones de Cell Trace

(ThermoFisher # C34564) 0.1 y 1  $\mu$ M. CTL (células efectoras) fueron incubadas en diferentes proporciones (1:1, 1:3, 1:6 y 1:24) con 75000 células blanco durante 5 horas. Se determinó la muerte de las células blanco (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>) mediante tinción con Sytox Orange (ThermoFisher, # C10493) la cual tiñe ácidos nucleicos de células que tengan una membrana comprometida, se empleó en una dilución 1:1000.

### **Citometría de flujo**

Para teñir antígenos extracelulares se empleó una dilución 1:100 de los anticuerpos en PBS con 2% de suero bovino fetal (SFB). Las células se incubaron 30 minutos a 4°C en oscuridad, posteriormente se realizaron lavados con PBS con 2 % de SFB y se resuspendieron en 300uL de PBS con 2% de SFB para su análisis.

Para las tinciones intracelulares para factores de transcripción y citocinas se emplearon los kits: Foxp3/Transcription Factor Staining Buffer Set de eBioscience y BD Cytofix/Cytoperm Plus Fixation/Permeabilization Kit (BD Golgi Plug protein transport inhibitor) de BD respectivamente, siguiendo las instrucciones indicadas por el fabricante.

Para realizar separación celular por citometría de flujo, se realizó un pool de células de bazo de los ratones CLP o Sham y se realizó tinción extracelular como se describió previamente.

Se empleó un citómetro Fortessa para adquirir eventos y FACS Aria II para la separación celular. Los datos se analizaron empleando el software Flow Jo versión 10.

## **Extracción RNA y DNA**

El RNA total para PCR en tiempo real se extrajo y se purificó empleando TRIzol (Thermo Fisher). La transcripción inversa se realizó en 1 µg de RNA empleando SCRIPT Reverse Transcriptase (Jena Bioscience), siguiendo las instrucciones del fabricante usando primers oligo-dT. La PCR en tiempo real se realizó con SYBR Green labeling en un sistema de detección de PCR en tiempo real táctil CFX96 (Bio-Rad). Las condiciones de PCR fueron 95°C durante 10 min, seguidas de 45 ciclos de 95°C durante 15 segundos y 60°C durante 1 min. La expresión de RNAm se normalizó contra β-actina. Los primers utilizados en este estudio se encuentran en las tablas 2 a 4.

Para la extracción de DNA se empleó el método Fenol: Cloroformo: Alcohol isoamílico (Sun, 2010), siguiendo las instrucciones del fabricante (Fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1, v/v) UltraPure™).

## **PCR en tiempo real**

Los análisis de PCR de tiempo real se realizaron empleando SYBR Green de Thermofisher empleando primers específicos (**Tabla 2**). Para determinar el nivel de expresión de los transcritos, se empleó ΔCt como medida de expresión, para calcularlo se empleó como gen de referencia *Actb*.

## **Primers**

Los primers que fueron usados para los diversos ensayos qPCR, inmunoprecipitación de cromatina e hipersensibilidad a la DNAsa I, se encuentran enlistados en la **Tablas 2 a 4**.

**Tabla 2. Primers usados en qPCR**

	<b>Forward</b>	<b>Reverse</b>
<b><i>Ifng</i></b>	GAGGTCAACAACCCACAGGT	GGGACAATCTCTTCCCCACC
<b><i>Nest</i></b>	CTATTTGGTCGAGTCTGACAGAG	CAACGTACGCTGCCTCCCGATG
<b><i>Runx3</i></b>	CAGGTTCAACGACCTTCGATT	GTGGTAGGTAGCCACTTGGG
<b><i>Tbet</i></b>	CAACCAGCACCAGACAGAGA	ACAAACATCCTGTAATGGCTTG
<b><i>Tnfa</i></b>	CCTATGTCTCAGCCTCTTCT	GGGAACTTCTCATCCCTTTG
<b><i>Prf1</i></b>	TTGGTGGGACTTCAGCTTTCC	TGCTTGCATTCTGACCGAGT

**Tabla 3. Primers usados en ChIP**

	<b>Forward</b>	<b>Reverse</b>
<b>IFNG1</b>	CCATCGGCTGACCTAGAGAA	ATGAGGAAGAGCTGCAAAGC
<b>IFNG2</b>	ACCAAACTACGCAGGGAAA	GCTGGCTTTGATTTCGATTGT
<b>IFNG3</b>	TCAGAGGCCTGGACCATAAG	GAAACTGCAAGGCCACAAAT
<b>IFNG4</b>	ATTTGTGGCCTTGCAGTTTC	GGGCCCTTCCACTTACTTCT
<b>WDR5</b>	AGAGGGTCCAAAGGATCAGC	AATCCCGAGGAGCCTTCGAT

**Tabla 4. Primers usados en ensayos de hipersensibilidad a DNAsa I**

	<b>Forward</b>	<b>Reverse</b>
<b>HS-I</b>	CTTTTATTCAGCCGTCCCAAC	ATTGTCTCAGAGCTAGGCCG
<b>HS-II</b>	GCCTCCCGTATGTGTTTGA	TCACAGGTTTCCTTCTGGGC
<b>HS-III</b>	GTTTCCCCACTGCAGACAGA	CAGCCAGTCGTGTGAGTCAT

## **Inmunoprecipitación de Cromatina**

Se fijaron  $1 \times 10^6$  células con 1% de formaldehído y se incubaron 10 minutos a temperatura ambiente. Se paró la reacción con glicina, se realizaron lavados con PBS frío y se resuspendió en buffer de lisis.

La sonicación de la cromatina se realizó bajo las siguientes condiciones: 30 ciclos, 30 segundos cada pulso a 35% de amplitud. Se realizó la inmunoprecipitación empleando anti-WDR5 (Santa Cruz) y anti-H3K4me3 (Merck) e IgG control (Merck) siguiendo el método propuesto por (Furlan-Magaril & Recillas-Targa, 2015), se recuperó el DNA por el método Fenol: Cloroformo.

Posteriormente se realizó qPCR (**Tabla 3**) para determinar la abundancia relativa, normalizando contra zonas anotadas que se encuentran enriquecidas de las marcas empleadas (Gomez et al., 2013).

## **Hipersensibilidad a DNAsa I**

Se resuspendieron las células en buffer de NI, y se procedió a la extracción de núcleos resuspendiendo en buffer NI + 1%NP-40, una vez extraídos los núcleos se digirieron con concentraciones crecientes de DNAsa I durante 5min a 25°C y se extrajo DNA mediante Fenol: Cloroformo, modificado de (McArthur, Gerum, & Stamatoyannopoulos, 2001; Pipkin & Lichtenheld, 2006; Zeng & McFarland, 2014).

Posteriormente se realizó PCR de punto final (McArthur et al., 2001), empleando los primers enlistados en la **Tabla 4** y por medio de densitometría se normalizó la abundancia relativa contra una región control (Agarwal & Rao, 1998).



## **Estadística**

El número de veces que se repitió cada experimento se indica en cada figura. Los datos se presentan como medias  $\pm$  SD o SEM (indicado en cada figura). Las pruebas estadísticas se calcularon utilizando Microsoft Excel y GraphPad Prism. La prueba estadística utilizada y los valores de p se indican en cada figura. En general, para la comparación entre dos grupos, se utilizó la prueba t de Student (pareada o no pareada). Valores de P inferiores a 0.05 se consideraron estadísticamente significativos.

## **Búsqueda de pacientes y toma de muestra.**

Se realizó una toma de muestra de pacientes pertenecientes al Instituto Nacional de Nutrición y Ciencias Médicas Salvador Zubirán en el área de Consulta Externa, empleando un algoritmo de búsqueda (Anexo 1), lo cual nos permitió detectar pacientes que habían sobrevivido a un episodio agudo de sepsis a consecuencia de Neumonía Adquirida en Comunidad (NAC).

Se realizó una toma de muestra de 10mL sangre periférica, se realizó una separación de PBMCs empleando Lymphoprep, posteriormente se sembraron  $3 \times 10^6$  de PBMCs en 1mL de RPMI suplementado con 10% de SBF y se estimularon mediante anti-CD3 (BioXCell, Clon OX40, 2  $\mu$ g/mL) y anti-CD28 (BioXCell, Clon 9.3, 2 $\mu$ g/mL) unido a placa, posteriormente se realizó tinción intracelular para la detección de citocinas.

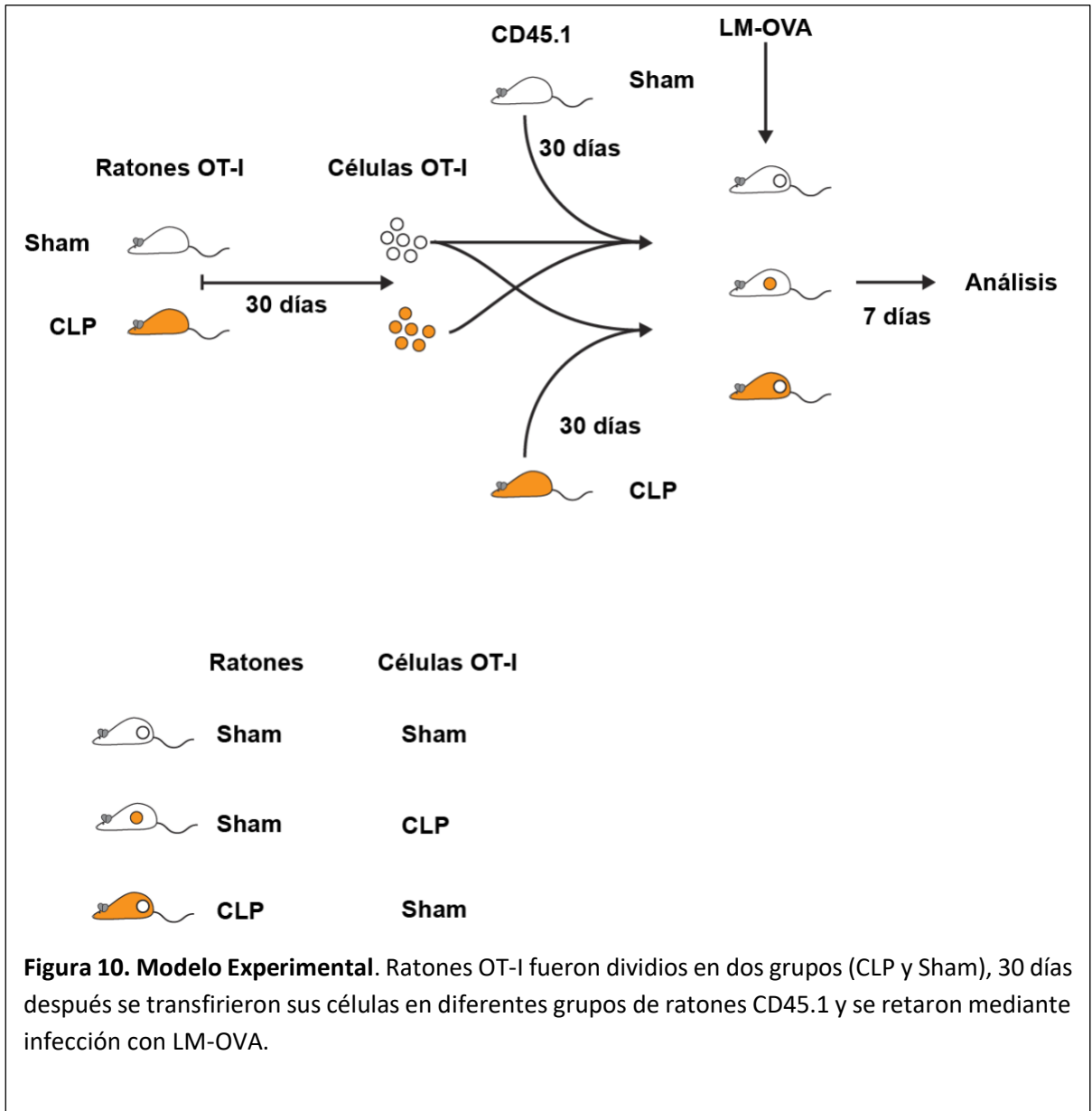
## Resultados

### **La sepsis afecta directamente la producción de IFN- $\gamma$ en células T CD8<sup>+</sup>**

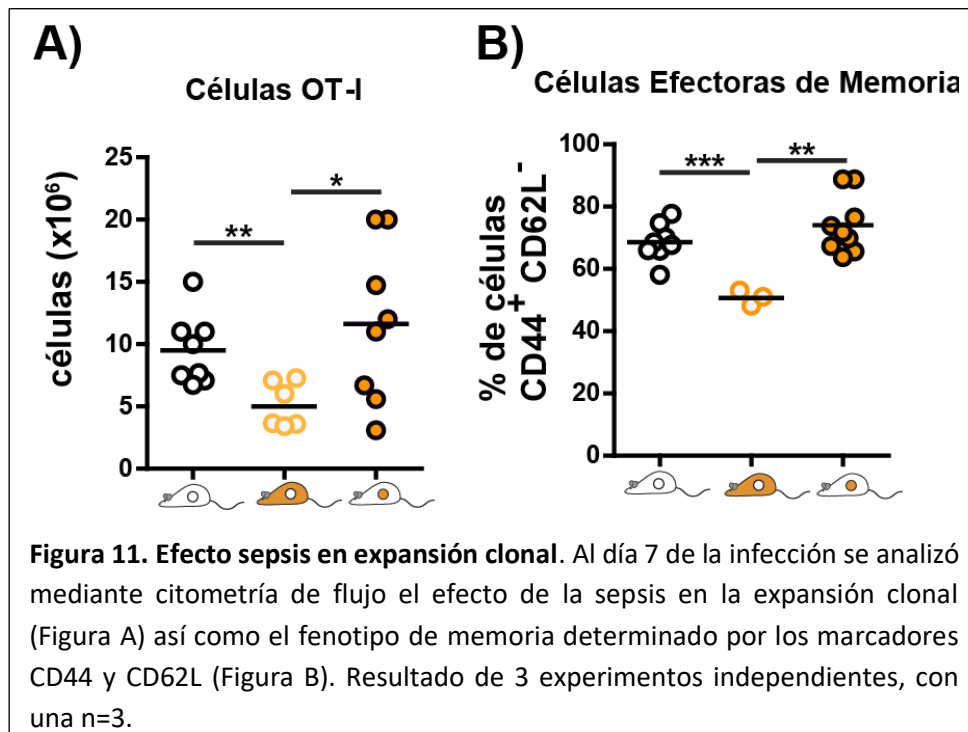
Para determinar si la sepsis afecta directa o indirectamente a las células T CD8, diseñamos el siguiente modelo experimental (**Figura 10**): ratones OT-I y B6 CD45.1 fueron sometidos a CLP (anestesia, incisión, exposición del ciego, y ligadura y perforación cecal) o a cirugía control (anestesia, incisión, exposición del ciego, sin ligadura ni perforación cecal). Este modelo empleado nos permite diseccionar de una manera más precisa cuáles son los defectos asociados a células T o al microambiente.

La ligadura cecal se estandarizó para causar un 50% de mortalidad (Hubbard et al., 2005; Toscano, Ganea, & Gamero, 2011). Treinta días después de la cirugía, los ratones OT-I (CLP y control) se sacrificaron y se purificaron las células CD8 (OT-I). Se transfirieron las células a ratones receptores (CD45.1). Al día siguiente, los ratones se inocularon con  $10^4$  UFC de *Listeria monocytogenes* que expresa ovoalbúmina (LM-OVA). Siete días después, se analizó la respuesta de células T CD8 OT-I. Este sistema nos permitió evaluar el efecto de la sepsis en las células CD8 cuando solo éstas habían sido expuestas a sepsis (OT-I CLP  $\rightarrow$  CD45.1 control) y cuando el resto del sistema había sido expuesto a sepsis, pero las CD8 no (OT-I control  $\rightarrow$  CD45.1 CLP). Al emplear células OT-I, permitimos que las células CD8 se expusieran al ambiente de sepsis sin ser activadas a través de su

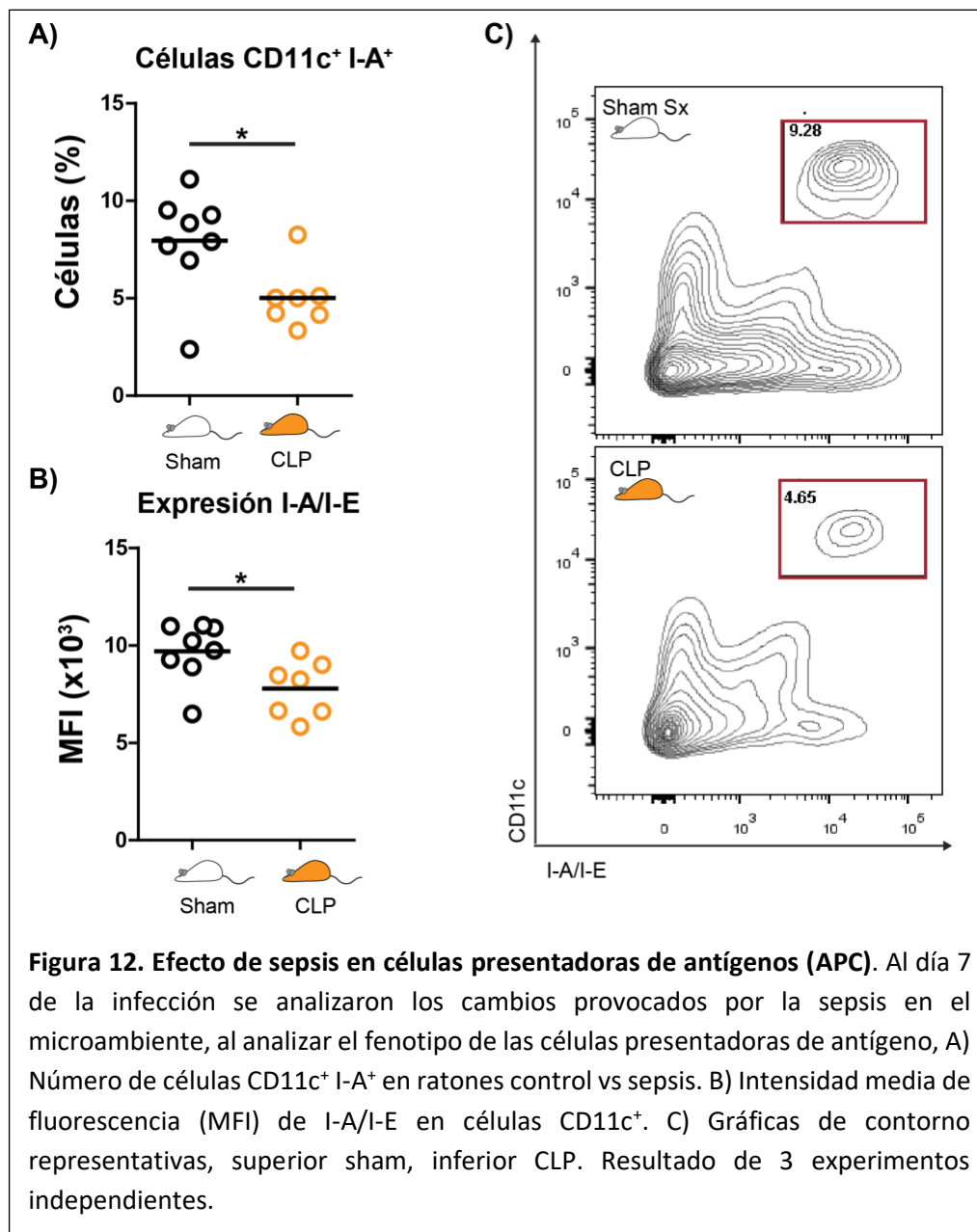
receptor antigénico (TCR). Sin embargo, el reto con LM-OVA nos permitió evaluar su función en respuesta al antígeno para el cual son específicas.



Al analizar la expansión clonal de las células OT-I secundario al reto antigénico con LM-OVA (**Figura 11**), el número de células OT-I control (**Figura 11A**) transferidas a ratones control (OT-I control → CD45.1 control) aumentó en respuesta a la infección con LM-OVA. Por el contrario, la expansión de las células control OT-I transferidas a sobrevivientes de sepsis (OT-I control → CD45.1 CLP) fue significativamente menor ( $9.5 \pm 0.99$  vs.  $5.2 \pm 0.74$ ,  $p=0.007$ ). Este efecto solo se observó cuando la sepsis la habían sufrido los ratones receptores. Cuando células CD8 aisladas de sobrevivientes de sepsis se transfirieron a ratones control (OT-I CLP → CD45.1 control), su expansión fue similar a la observada en los ratones control ( $9.5 \pm 0.99$  vs.  $11.64 \pm 2.25$ ,  $p=0.39$ ).



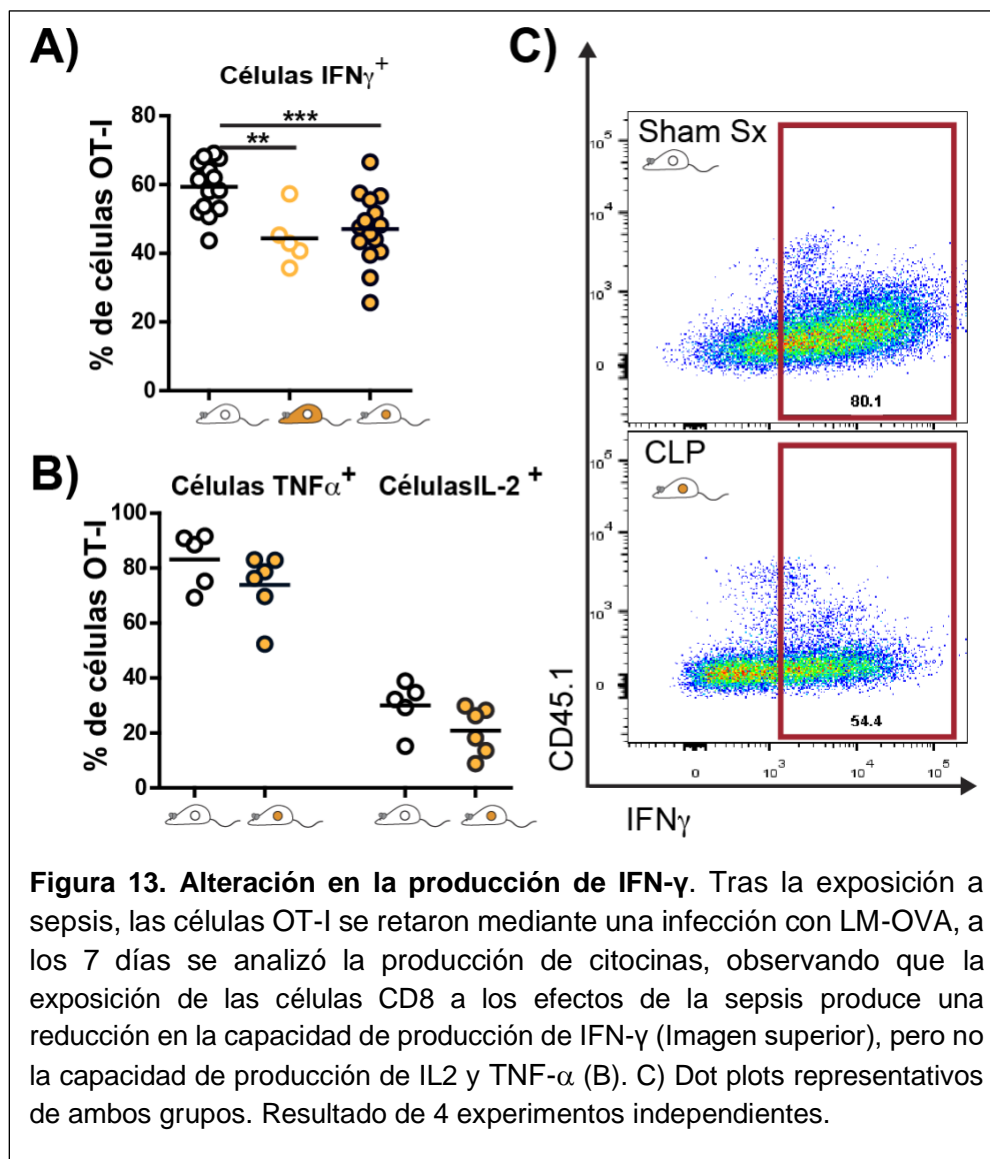
Al analizar marcadores asociados a activación ( $CD44^{hi} CD62L^{-}$ ) se observaron resultados similares independientemente del origen de las células OT-I, sin embargo, cuando las células eran transferidas a sobrevivientes a sepsis había un menor porcentaje de células efectoras de memoria ( $50.73 \pm 1.4$  vs.  $68.59 \pm 2.10$ ,  $p=0.0008$ ) o con células obtenidas de sobrevivientes de sepsis transferidas a ratones control ( $50.73 \pm 1.4$  vs.  $74.04 \pm 3.1$ ,  $p=0.002$ ; **Figura 11B**).



Estos resultados indican que la activación de las células T CD8 y la expansión clonal son deficientes en los sobrevivientes de sepsis, pero que estos defectos no son intrínsecos a las células T CD8. Para tratar de explicar estas diferencias encontradas, cuantificamos mediante citometría de flujo la abundancia relativa y el estado de activación de las células dendríticas de los sobrevivientes de sepsis. Encontramos una disminución significativa en el número de células CD11c<sup>+</sup> MHC clase II<sup>+</sup> ( $8.754 \pm 0.523$  vs.  $4.68 \pm 0.6$ ,  $p=0.0002$ ); y en sus niveles de expresión de moléculas de MHC clase II ( $10148.42 \pm 328.597$  vs.  $7622.37 \pm 498.38$ ,  $p=0.001$ ) (**Figura 12**). Estos resultados indican que, a través de efectos en células mieloides, la sepsis puede favorecer que la presentación de antígenos no se realice de manera óptima. Es probable que esto sea la causa de los defectos de activación y expansión observados en células OT-I transferidas a sobrevivientes de sepsis.

Si bien, existen defectos en las células presentadoras de antígeno a causa de la sepsis, el siguiente paso para determinar si la sepsis afectaba la función de las células CD8 OT-I, analizamos la capacidad de éstas de producir IFN- $\gamma$  tras la reestimulación *ex vivo*. Con este fin, activamos esplenocitos de ratones infectados con LM-OVA con el péptido SIINFEKL y cuantificamos su producción de IFN- $\gamma$  por medio de citometría de flujo (**Figura 13A**). Cuando las células OT-I se transfirieron a ratones sobrevivientes a sepsis, éstas produjeron una menor cantidad de IFN- $\gamma$  que células transferidas a ratones control ( $44.39 \pm 3.6$  vs.  $59.39 \pm 1.9$ ,  $p=0.001$ ). Cuando células OT-I que provenían de sobrevivientes de sepsis se transfirieron a ratones control se observó un defecto similar ( $47.0 \pm 2.6$  vs.  $59.39 \pm 1.9$ ,  $p=0.0008$ ).

Por lo tanto, a pesar de que las células T CD8 de los sobrevivientes de sepsis tienen la capacidad intrínseca de expandirse y activarse de manera similar a las células T CD8 control, su capacidad para producir IFN- $\gamma$  está significativamente reducida. La producción de otras citocinas esenciales para la función de las células CD8, en particular TNF- $\alpha$  e IL-2 (**Figura 13B**), fue discretamente menor en las células expuestas a sepsis, pero la diferencia no alcanzó significancia estadística.

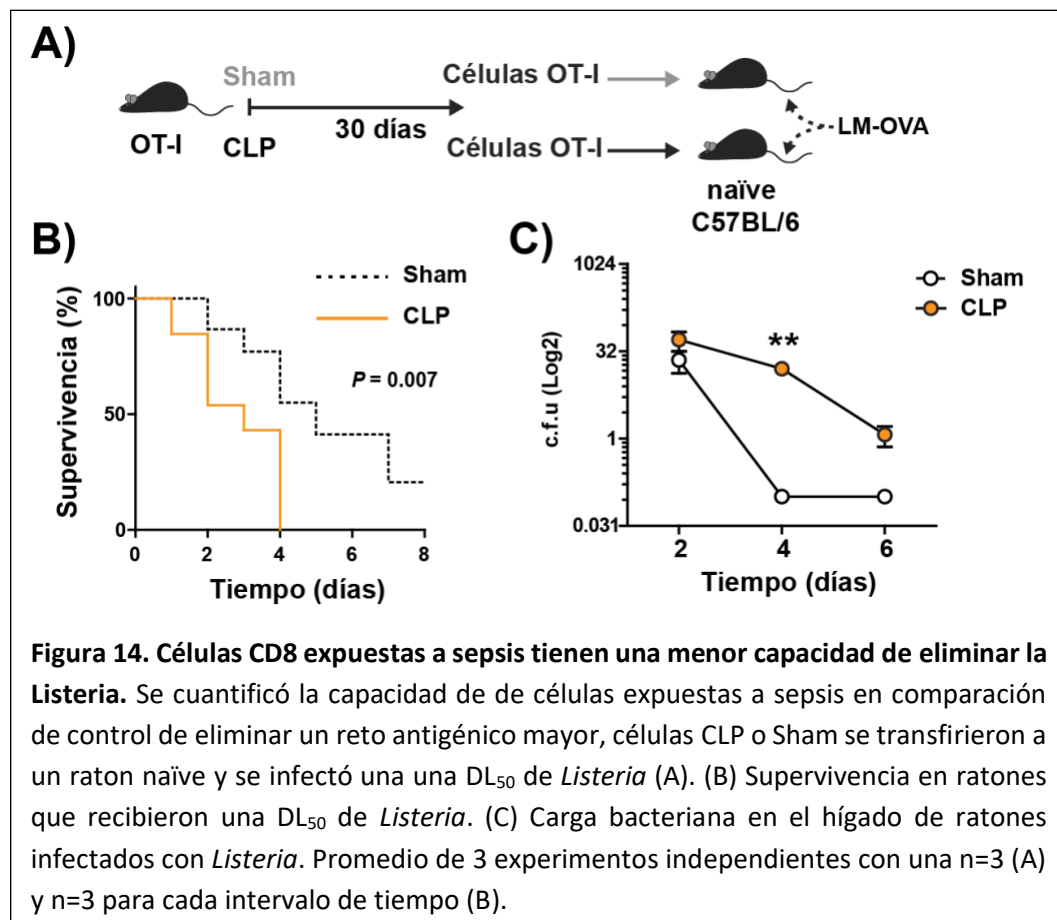


En conclusión, la exposición del sistema inmune a la inflamación severa que caracteriza a la sepsis, induce una serie compleja de cambios a diferentes niveles. Las células T CD8 recuperadas de ratones que sobrevivieron a la sepsis exhiben un defecto específico en su capacidad para producir IFN- $\gamma$  en respuesta a la estimulación antígeno-específica.



## Las células T CD8 de los sobrevivientes de sepsis son menos efectivas ante retos antigénicos

Para determinar la relevancia del defecto en la producción de IFN- $\gamma$  transferimos células T CD8 OT-I de ratones que sobrevivieron la sepsis (o de ratones control) a ratones silvestres no manipulados y los infectamos con una dosis letal 50 de LM-OVA (**Figura 14**). El grupo de ratones que recibió células provenientes de ratones CLP, presentó una letalidad del 100% al día 4 después de la infección. En contraste, el grupo de ratones que recibieron células OT-I de ratones control, presentó una letalidad de aproximadamente 80% al día 8. Como se ilustra en la **Figura 14**, la mediana de supervivencia se redujo de 5 a 3 días cuando las células OT-I transferidas provenían de ratones con sepsis ( $p=0.007$ ).

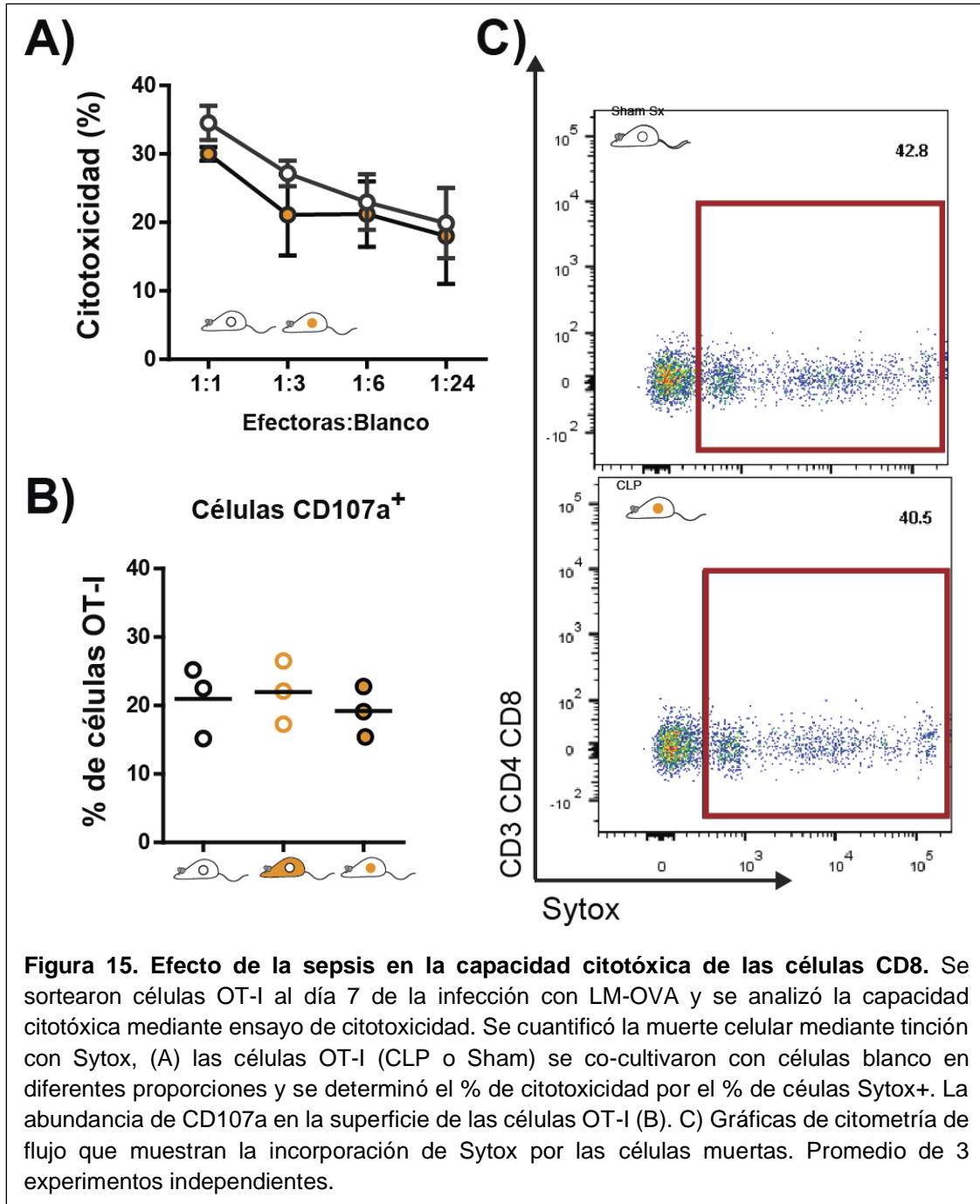


Con el fin de evaluar si las diferencias en la mortalidad eran debidas a un defecto en la capacidad de aclarar la infección, cuantificamos la carga bacteriana en el hígado después de la infección con *Listeria* (a los 2, 4 y 6 días). El día 2 después de la infección no encontramos diferencias en la carga bacteriana. Al cuarto día después de la infección, los ratones que habían recibido células de ratones control habían eliminado totalmente el patógeno. En contraste, los ratones que recibieron células CLP, presentaron carga bacteriana detectable hasta el día 6 después de la infección (**Figura 14**). Estos resultados indican que la producción defectuosa de IFN- $\gamma$  por las células T CD8 de ratones con sepsis es clínicamente relevante, y contribuye en la disminución de la capacidad para eliminar patógenos.

Otro mecanismo efector fundamental para función de las células CD8 es su capacidad citotóxica. Para determinar si la sepsis afecta este mecanismo, analizamos la expresión en la superficie celular de CD107a, un indicador de desgranulación, para confirmar esto, aislamos células OT-I al día 7 de infección con LM-OVA y las incubamos con células blanco cargadas con SIINFEKL. La abundancia de este marcador fue similar en las células de los tres grupos de ratones (**Figura 15**), lo que sugiere que no hay defectos en la capacidad citotóxica.

Como se muestra en la **Figura 15A**, la capacidad citotóxica fue similar, independientemente del origen de las células OT-I. Estos datos indican que la exposición a sepsis no afecta la capacidad citotóxica de las células T CD8 y, en conjunto con los resultados anteriores, sugieren que la disminución en la capacidad de defender contra la infección por *Listeria* se puede atribuir a un defecto en la

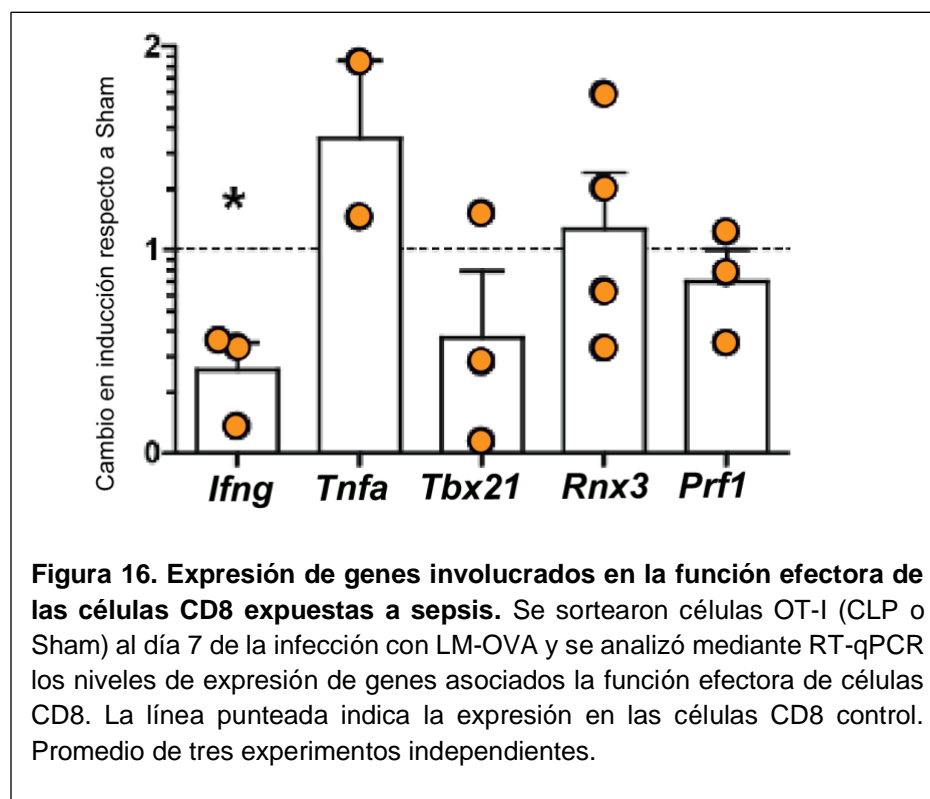
producción de IFN- $\gamma$ , sin embargo queda por dilucidar si existe otro mecanismo que contribuya a la incapacidad de eliminar patógenos.



**Figura 15. Efecto de la sepsis en la capacidad citotóxica de las células CD8.** Se sortearon células OT-I al día 7 de la infección con LM-OVA y se analizó la capacidad citotóxica mediante ensayo de citotoxicidad. Se cuantificó la muerte celular mediante tinción con Sytox, (A) las células OT-I (CLP o Sham) se co-cultivaron con células blanco en diferentes proporciones y se determinó el % de citotoxicidad por el % de células Sytox+. La abundancia de CD107a en la superficie de las células OT-I (B). C) Gráficas de citometría de flujo que muestran la incorporación de Sytox por las células muertas. Promedio de 3 experimentos independientes.

## El defecto en la producción de IFN- $\gamma$ se establece a nivel epigenético

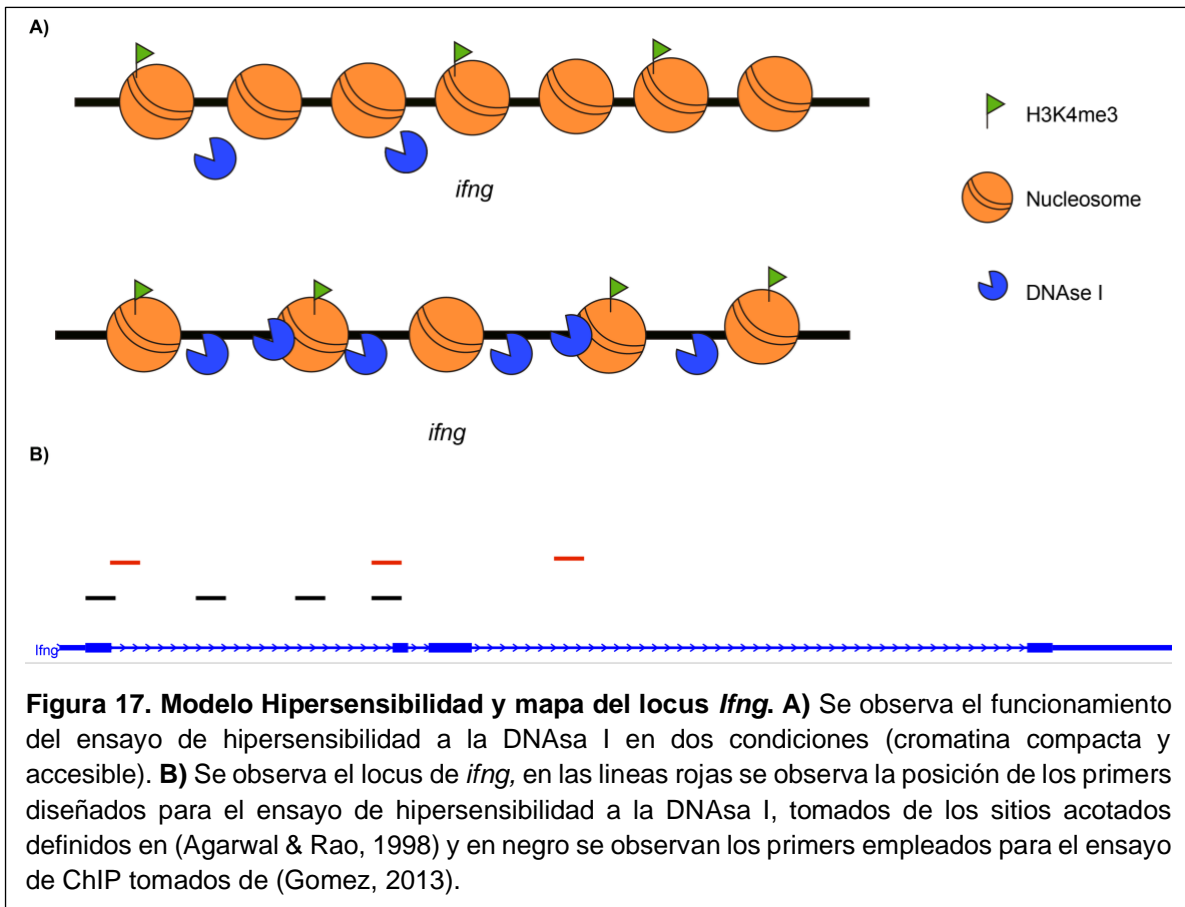
La regulación de la producción de citocinas es compleja y se establece a varios niveles. Con el fin de determinar si la sepsis afecta la producción de IFN- $\gamma$  a nivel transcripcional, cuantificamos el mRNA de *Ifng* en células OT-I sometidas a sepsis (o a cirugía control) y transferidas a ratones no manipulados, al día 7 de la infección con LM-OVA. Como se muestra en la **Figura 16**, observamos una disminución significativa en la expresión *Ifng* (1.0 vs.  $0.41 \pm 0.1$ ,  $p=0.04$ ). En congruencia con lo observado a nivel de proteína, no observamos diferencias en la expresión de *Tnfa*. Tampoco en la expresión de otros genes relacionados con funciones efectoras de células CD8 (*Prf1*, *Runx3*, *Tbx21*).



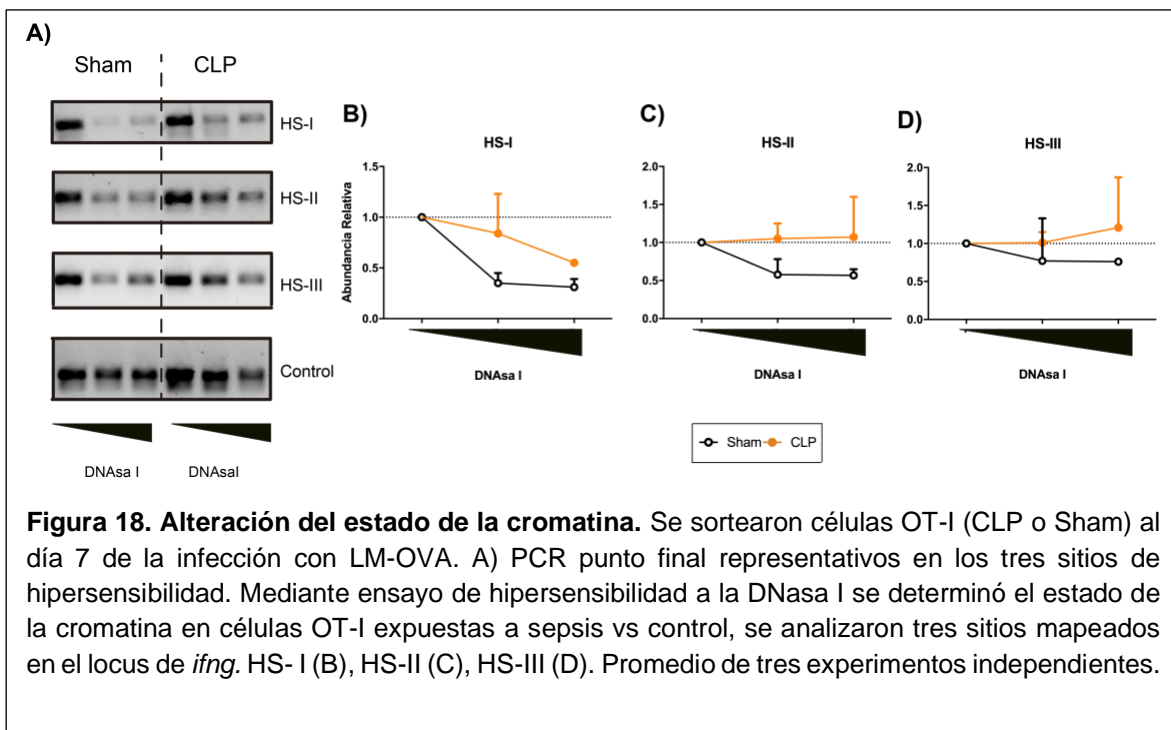
Estos resultados sugieren que el defecto en la transcripción de *Ifng* es específico y que probablemente se ejerce a nivel de ese locus.

Se ha reportado que en células T CD4 y CD8, el locus de *Ifng* se remodela a nivel epigenético durante la diferenciación efectora (hacia Th1 en el caso de las CD4 y durante la activación en el caso de las CD8) (Hatton et al., 2006; Lee, Avni, Chen, & Rao, 2004; Schoenborn et al., 2007). La cromatina es dinámica, es decir se remodela constantemente, generando zonas de cromatina compacta asociadas a represión y zonas de cromatina laxa asociadas a transcripción (Li, Carey, & Workman, 2007). En el locus de *Ifng* existen 3 sitios mapeados de hipersensibilidad a la DNasa I, los cuales se encuentran abiertos en células que son capaces de producir esta citocina, (Células Th1, CD8 y NK) (Agarwal & Rao, 1998). Para explorar el estado de estos sitios de hipersensibilidad en células CD8 expuestas a la sepsis en nuestro modelo experimental, diseñamos un ensayo de hipersensibilidad a DNasa I capaz de interrogar la accesibilidad de la cromatina del locus por medio de PCR punto final, los primers se diseñaron en los sitios anotados previamente, caracterizados en (Agarwal & Rao, 1998) (**Figura 17B, líneas rojas**). Al analizar el estado global de la cromatina en estos tres sitios anotados de hipersensibilidad a DNasa I, se observó que la exposición de núcleos celulares aislados de las células OT-I provenientes de ratones control a concentraciones crecientes de DNasa I, se asoció a la pérdida de un amplificado local, indicando que la cromatina en esos sitios era accesible. En contraste, la exposición a DNasa I de núcleos de células OT-I expuestas a sepsis se asoció con una menor pérdida de amplificado, en particular en los sitios de hipersensibilidad I y II, indicando que a pesar de que estas células habían sido activadas y habían proliferado en forma normal en respuesta a la infección, la accesibilidad de la cromatina a nivel del locus de *Ifng* era menor, es decir, que la cromatina no se encontraba en un estado

totalmente permisible a la transcripción, lo cual se reflejaba en la disminución de la expresión de este gen en las células expuesta a sepsis (**Figura 18**).

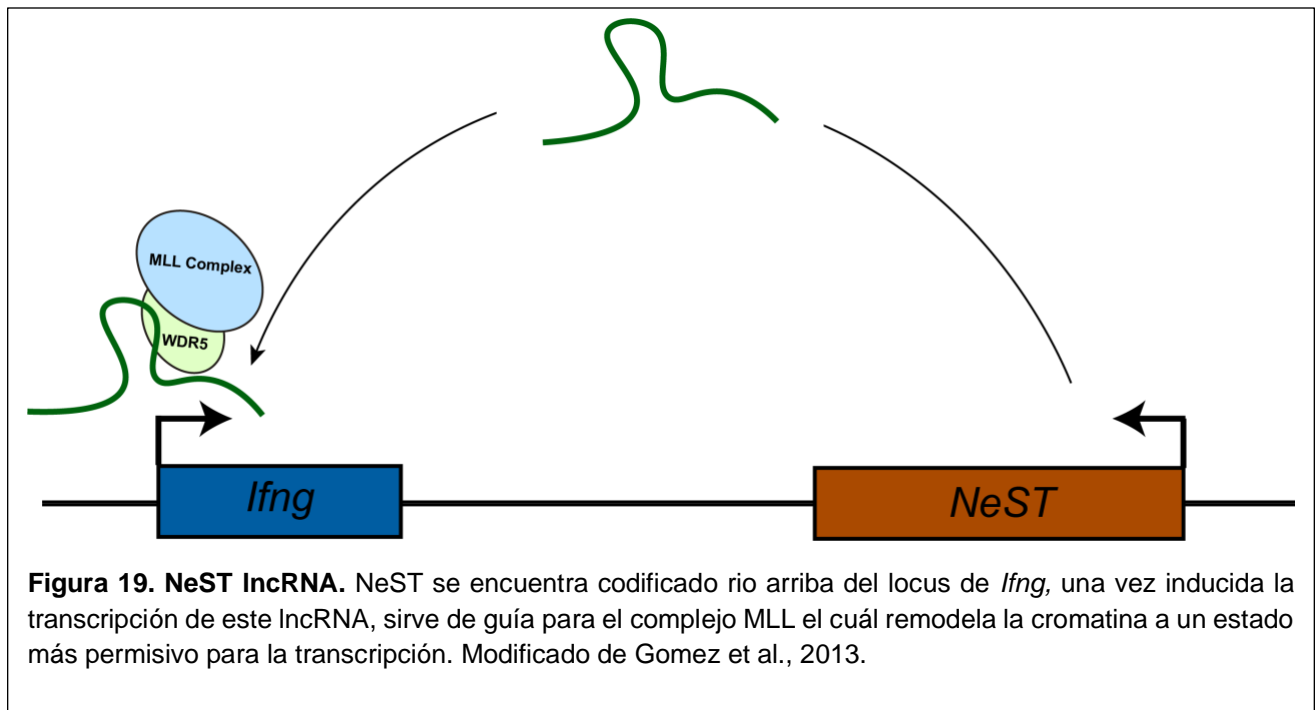


**Figura 17. Modelo Hipersensibilidad y mapa del locus *ifng*.** **A)** Se observa el funcionamiento del ensayo de hipersensibilidad a la DNasa I en dos condiciones (cromatina compacta y accesible). **B)** Se observa el locus de *ifng*, en las líneas rojas se observa la posición de los primers diseñados para el ensayo de hipersensibilidad a la DNasa I, tomados de los sitios acotados definidos en (Agarwal & Rao, 1998) y en negro se observan los primers empleados para el ensayo de CHIP tomados de (Gomez, 2013).



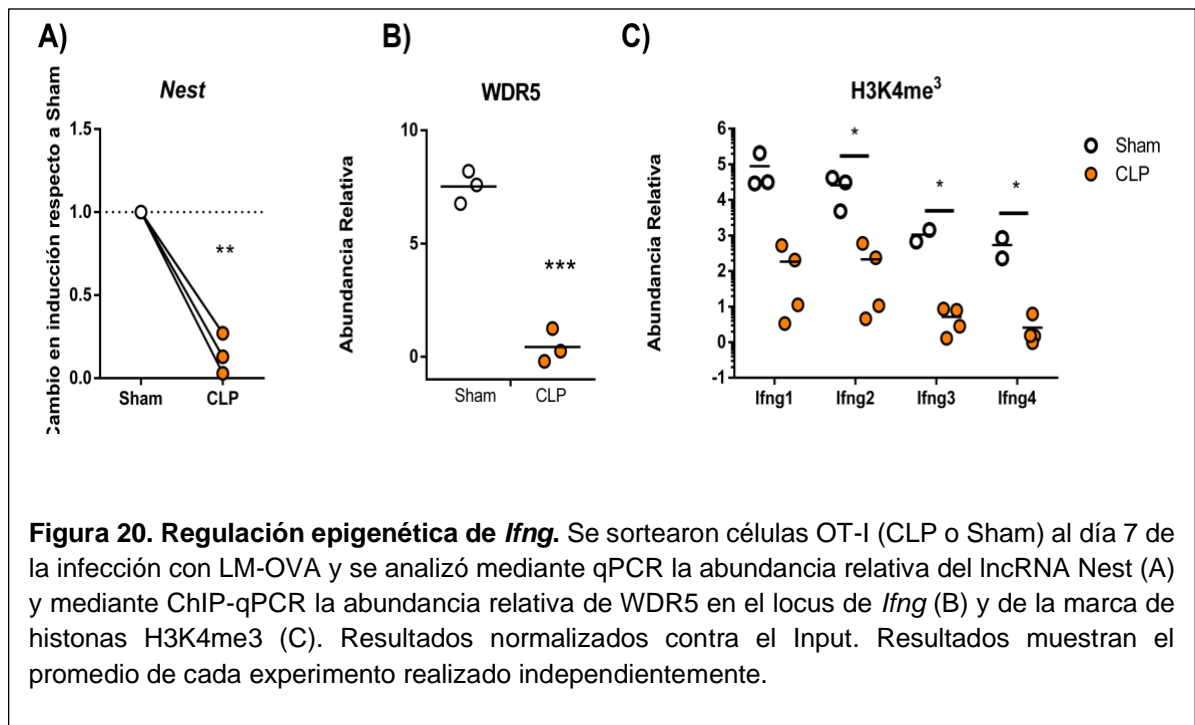
**La sepsis afecta la expresión de NeST, un lncRNA implicado en la remodelación de la cromatina a nivel del locus de *lfng***

En la regulación a nivel de histonas participan diversos complejos remodeladores y también RNAs largos no codificantes (lncRNA). Uno de ellos, llamado NeST (Nettoie Salmonella pas Theiler's), antes conocido como *Tmevpg1*, es un lncRNA que se ha implicado en la regulación de *lfng* (Aubagnac, Brahic, & Bureau, 2002). En humanos y ratones este lncRNA se encuentra conservado y está codificado río arriba del locus de *IFNG* (Figura 19) (Vigneau et al., 2001).





NeST facilita la transcripción de *Ifng* a través del reclutamiento del complejo MLL el cual remodela el estado de la cromatina que cataliza la marca H3K4me4, que está asociada a sitios de inicio de la transcripción activos (Gomez et al., 2013; Schuettengruber, Martinez, Iovino, & Cavalli, 2011). Dado que nuestros resultados sugerían que existían defectos en la apertura de la cromatina en el locus de *Ifng* decidimos analizar la expresión de NeST en células expuestas a sepsis y células de ratones sometidos a cirugía control. Como se muestra en la **Figura 20A**, la abundancia de NeST era significativamente menor en células obtenidas de ratones con sepsis que en células control ( $1.0 \pm 0.0$  vs.  $0.14 \pm 0.07$ ,  $p=0.006$ ).



NeST sirve de anclaje para WDR5, una proteína del complejo Trithorax, complejo responsable de catalizar la H3K4me3 en el locus de *Ifng* (Gomez et al., 2013).

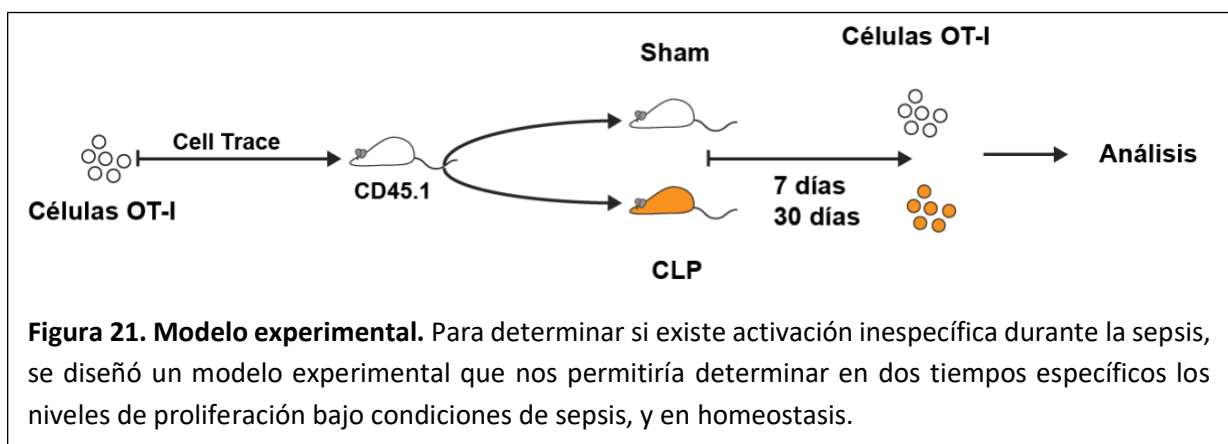
Como se muestra en la **Figura 20B**, el enriquecimiento de WDR5 a nivel del locus de *Ifng* fue significativamente mayor en las células control que en las células expuestas a sepsis (Control  $7.52 \pm 0.41$  vs. Sepsis  $0.43 \pm 0.42$ ,  $p=0.0002$ )

Al analizar la abundancia local de la trimetilación de la lisina 4 de la Histona 3 (H3K4me<sup>3</sup>), observamos una mucho menor abundancia en las células expuestas a sepsis (**Figura 20C**). Estos resultados sugieren que la sepsis altera la expresión de NeST, lo que disminuye el reclutamiento del complejo Trithorax (WDR5), lo que se traduce en una menor trimetilación de H3K4 en el locus de *ifng*.

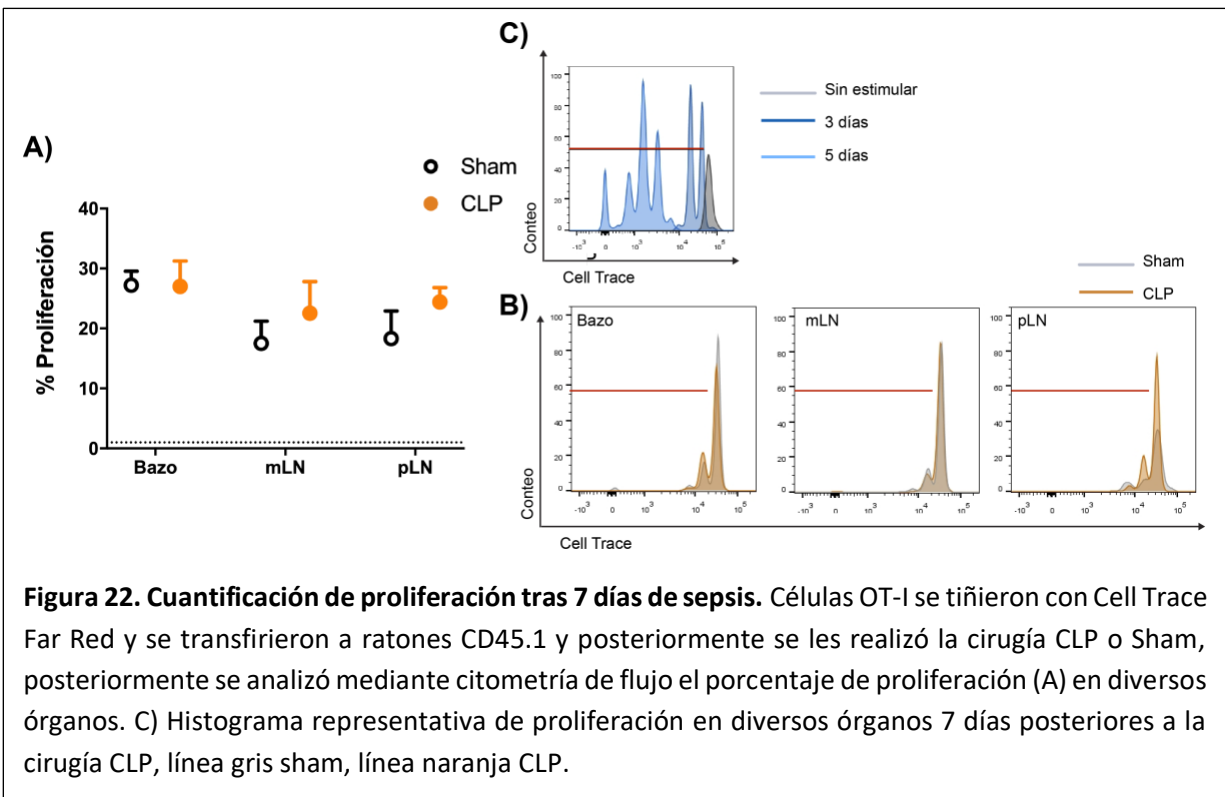
**Los cambios en las células expuestas a sepsis son inducidos por la exposición per se, no por una activación inespecífica.**

Cuando existe una infección crónica, en las células T se da un fenómeno conocido como agotamiento, en el cual fracasan al responder ante un reto antigénico posterior. Este agotamiento celular está definido como una incapacidad de proliferar y secretar citocinas (Yi, Cox, & Zajac, 2010)

Para esto, se diseñó un experimento que permitió determinar si existe proliferación inespecífica (en ausencia del antígeno específico) en las células OT-I durante la sepsis y esto origina un fenómeno de agotamiento en las células, lo cual sería un mecanismo que explicaría la falta de respuesta ante la infección con LM-OVA. Para esto se marcaron células OT-I con Cell Trace (el cual nos permite cuantificar la proliferación de las células) posteriormente se transfirieron a ratones CD45.1 vía I.V. y un día posterior a la transferencia se dividieron los ratones en dos grupos (CLP y Sham) y se sacrificaron a diferentes días posteriores a la cirugía (**Imagen 21**).



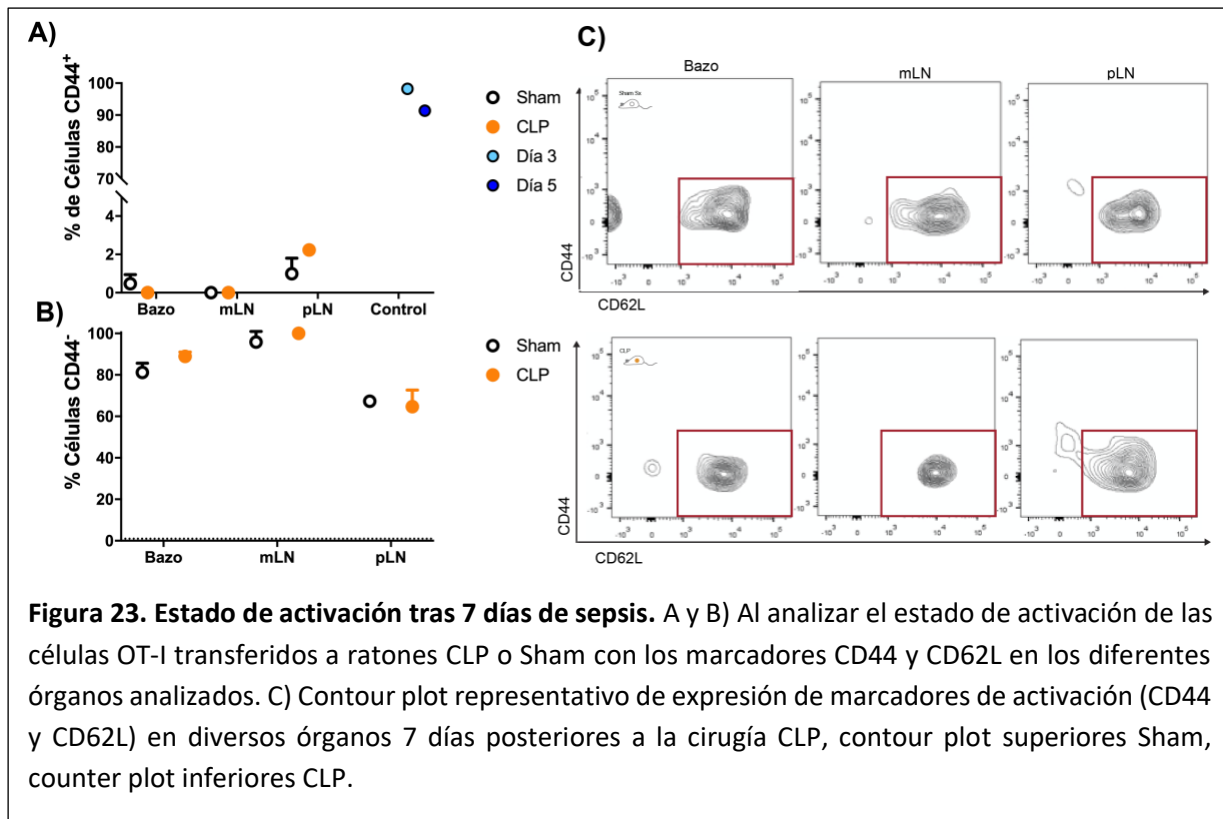
El primer punto determinado fue el día 7, que corresponde a la etapa aguda de la sepsis, en donde se lleva a cabo la respuesta hiperaguda del sistema inmune, al analizar este punto, determinamos el porcentaje de proliferación determinado por la dilución de la marca de Cell Trace, y el estado de activación determinado por el porcentaje de células CD44+ CD62L-, se analizaron en diversos órganos (bazo, mLN y pLN). Al día 7 no se encontró ninguna diferencia en el porcentaje de proliferación entre los grupos Sham y CLP, obteniendo en bazo 27.2%±2.3 vs. 27 %±3.7, n: 3, mLN 17.5%±3.7, vs. 22.5%±5.25 y pLN 18.3%±4.5 vs. 24.4%±2.4, respectivamente (**Figura 22A**). Igualmente, no hubo diferencia en el la expresión de CD44+, ya que apenas y era detectable por citometría de flujo indicando la nula activación de estas células. (**Figura 23A**). Lo cual nos indica que en la etapa inicial de la sepsis no existe proliferación inespecífica.



**Figura 22. Cuantificación de proliferación tras 7 días de sepsis.** Células OT-I se tiñieron con Cell Trace Far Red y se transfirieron a ratones CD45.1 y posteriormente se les realizó la cirugía CLP o Sham, posteriormente se analizó mediante citometría de flujo el porcentaje de proliferación (A) en diversos órganos. C) Histograma representativa de proliferación en diversos órganos 7 días posteriores a la cirugía CLP, línea gris sham, línea naranja CLP.

El otro punto determinado fue al día 30, que correspondería a la fase crónica de sepsis en la cual el estado de inmunosupresión se encuentra establecido, al analizar el fenotipo de las células OTI, no se obtuvieron eventos suficientes para poder realizar un análisis adecuado, por lo que se especula que incluso al día 30 después de la cirugía no existe proliferación de estas células.

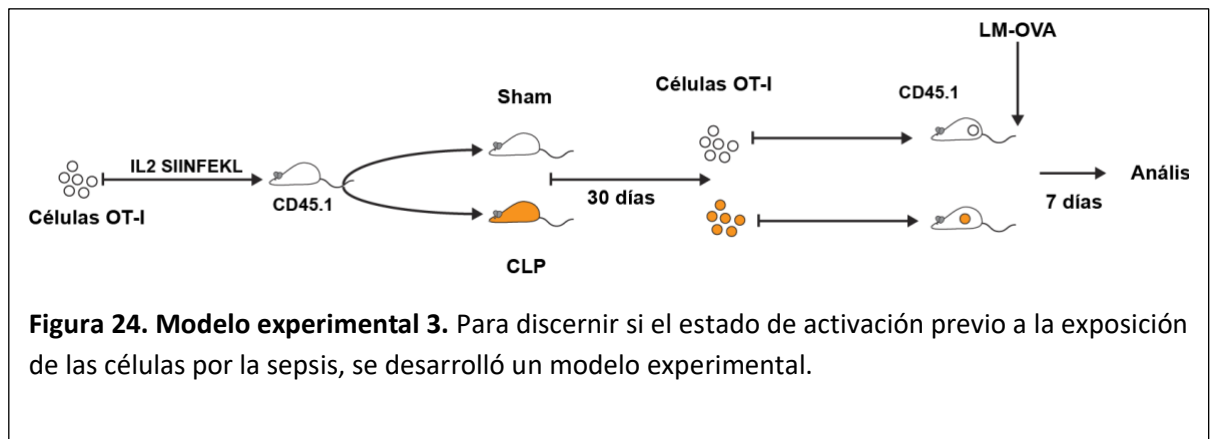
Lo anterior nos indica que, los defectos que han sido descritos hasta el momento no son debido a una proliferación inespecífica que ocurra durante la sepsis que pueda provocar un fenotipo de agotamiento en las células OTI.



**Figura 23. Estado de activación tras 7 días de sepsis.** A y B) Al analizar el estado de activación de las células OT-I transferidos a ratones CLP o Sham con los marcadores CD44 y CD62L en los diferentes órganos analizados. C) Contour plot representativo de expresión de marcadores de activación (CD44 y CD62L) en diversos órganos 7 días posteriores a la cirugía CLP, contour plot superiores Sham, counter plot inferiores CLP.

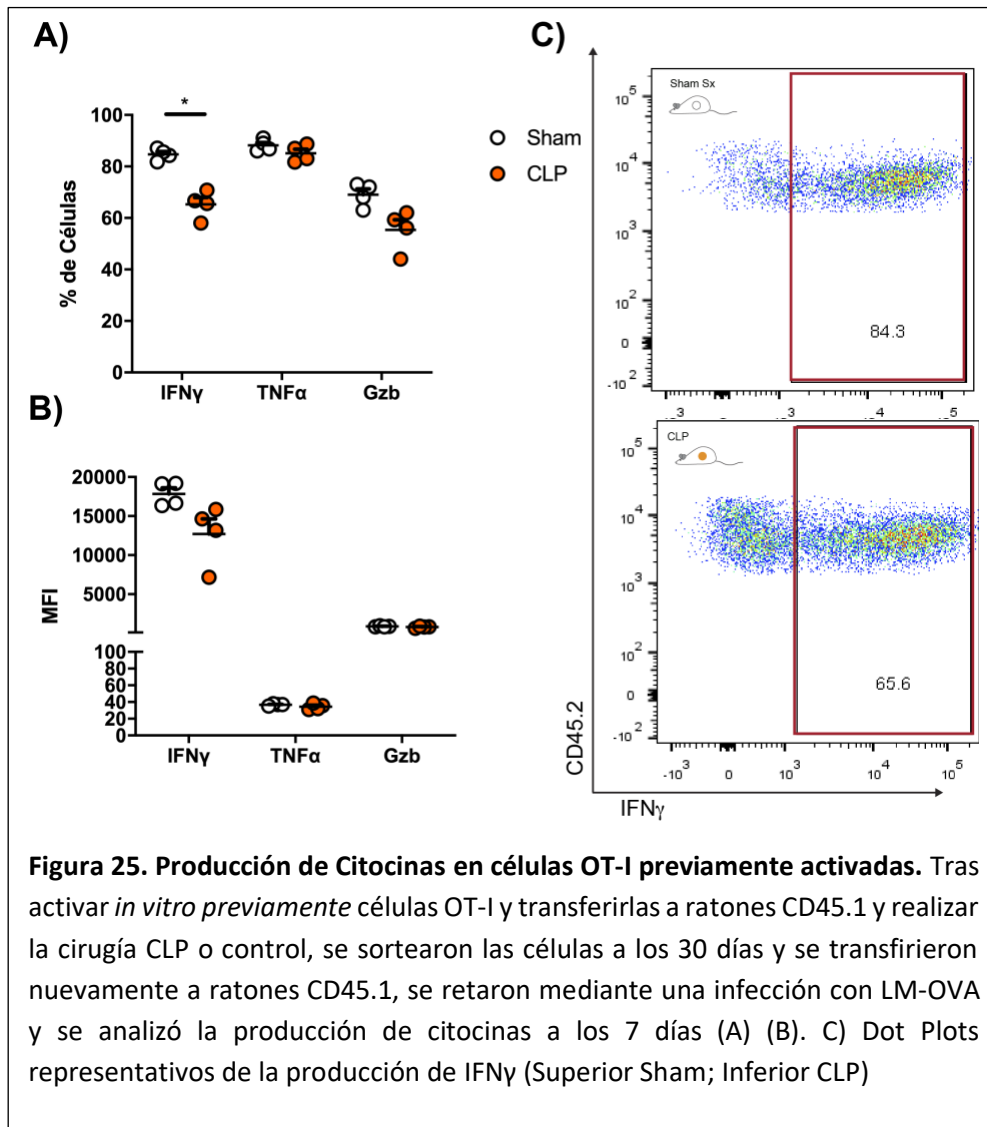
**El defecto que ocurre en células CD8 durante la sepsis es independiente del estado de activación de las células CD8.**

Durante los experimentos realizados se empleaban células de ratones OT-I naïve, es decir no habían visto un antígeno, y por lo tanto, no se habían activado, sin embargo, en un paciente que sufre de un episodio agudo de sepsis, en circulación existe un pool de células tanto naïve, como los diferentes tipos de memoria y efectoras, para determinar si el estado de activación presenta algún efecto ya sea protector o potenciador de los defectos ya descritos, obtuvimos células OTI y se activaron *in vitro* durante 3 días y se transfirieron a ratones CD45.1, un día posterior a la transferencia se separaron los ratones en grupos y se realizó la cirugía (Sham o CLP), 30 días después de la misma se sortearon únicamente las células OTI y se transfirieron a otro grupo de ratones CD45.1 y se infectaron con LM-OVA, al día 7 de la infección se analizaron las células OTI (**Figura 24**).



Al analizar la producción de citocinas, se observó un defecto en la producción de IFN $\gamma$  en las células OTI-CLP (84.7% $\pm$ 1.1 vs. 68.2% $\pm$ 3.6 respectivamente, **Figura 25**), igual que los resultados anteriores, en los cuales la única citocina afectada es el IFN $\gamma$ , esto se observó igualmente con TNF $\alpha$  obteniendo valores de 88.2% $\pm$ 1.1 vs.

84.8%±1.3 para células CLP control y CLP respectivamente. Esto nos indica que sin importar el estado de activación de las células que son expuestas a las diversas fases de la sepsis presentan un defecto en la producción de IFN $\gamma$  cuando éstas son retadas ante una infección.



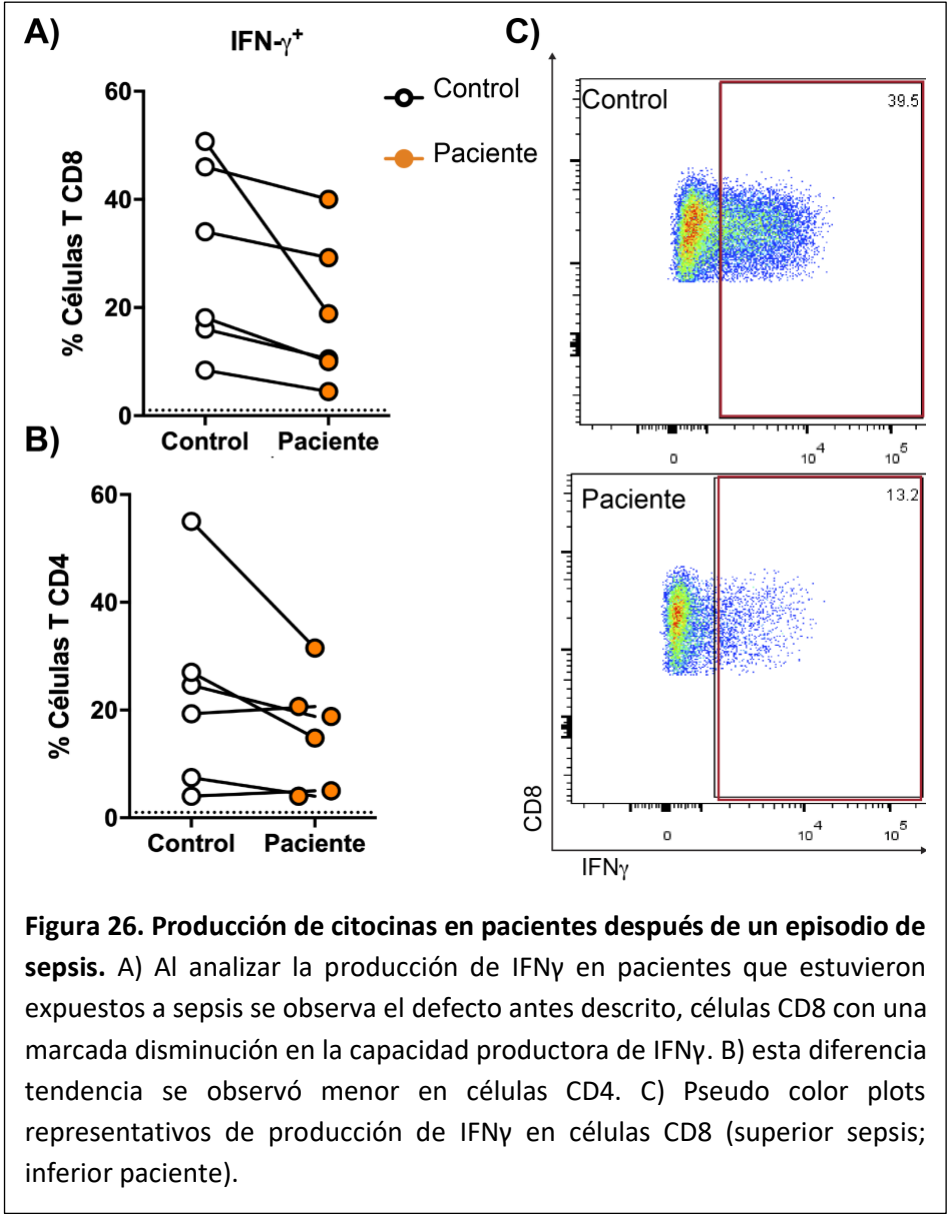
**Figura 25. Producción de Citocinas en células OT-I previamente activadas.** Tras activar *in vitro* previamente células OT-I y transferirlas a ratones CD45.1 y realizar la cirugía CLP o control, se sortearon las células a los 30 días y se transfirieron nuevamente a ratones CD45.1, se retaron mediante una infección con LM-OVA y se analizó la producción de citocinas a los 7 días (A) (B). C) Dot Plots representativos de la producción de IFN $\gamma$  (Superior Sham; Inferior CLP)

## **Las células de pacientes que sobrevivieron a un episodio de sepsis presentan una disminución en la producción de IFN $\gamma$**

Finalmente, con base en que el mecanismo sugerido en el defecto en la producción de IFN $\gamma$  a través de una regulación en la transcripción mediante el lncRNA NesT, es un mecanismo que se encuentra conservado en humanos y ratones, se determinó si el defecto en la respuesta específica de IFN $\gamma$  en nuestro modelo ocurre también similar en pacientes que sobrevivieron a un episodio agudo de sepsis.

Se realizó un estudio piloto en el cual se obtuvieron PMBCs de muestras de sangre periférica de 5 pacientes (Hombres: 66.7% y Mujeres 33.3%) con una mediana de edad de 74 años  $\pm$  13.5 años, con un diagnóstico de sepsis a la toma de la muestra de 129 días  $\pm$  47 días, y se compararon con controles sanos pareados por edad y sexo. Los pacientes presentan una media de SOFA de  $1 \pm 0.408$ , qSOFA  $4.8 \pm 2.2$  y CURB-65 de  $2 \pm 0.9$ . Las PMBCs se estimularon con anti-CD3 y anti-CD28 y se analizó la producción de IFN $\gamma$  en las células CD8+, encontrando una tendencia de menor producción de esta citocina en las células de los pacientes, ( $29.07\% \pm 7.1$  vs.  $21.4\% \pm 6.7$  respectivamente, **Figura 26**). Lo cual nos sugiere que la sepsis afecta la producción de IFN $\gamma$  en los pacientes que presentaron un cuadro agudo de sepsis y puede ser una de las razones por las cuales estos pacientes presentan una reactivación viral y son susceptibles a múltiples infecciones, siendo estas la principal causa de muerte en esta población.





## Análisis de Resultados

Como se ha mencionado, existen diversos estudios que demuestran que tras sobrevivir un episodio agudo sepsis existe un defecto en la capacidad de responder ante infecciones subsecuentes. Existen diversos mecanismos que contribuyen a esta incapacidad de responder, tales como: incremento en la apoptosis de células T, incremento en células T reguladoras, mayor expresión de moléculas co-inhibitorias, por mencionar algunos (Fan et al., 2015) otra parte de este defecto se atribuye al microambiente de citocinas y células del sistema inmune innato, que ejercen tanto un papel supresor como una coestimulación insuficiente hacia las células T. Estos mecanismos o defectos que suceden durante y a posteriori, sinergizan y generan un estado de inmunosupresión global provocando la gran tasa de mortalidad en pacientes que sobrevivieron un episodio agudo de sepsis (Henriksen et al., 2017).

Sin embargo, la mayor parte de estos estudios se centran en estudiar estos mecanismos durante el episodio agudo de sepsis, o días posteriores al mismo, dejando a un lado los mecanismos que gobiernan la inmunosupresión en la fase que se puede denominar post-sepsis, generando aún interrogantes sin respuesta, una de estas es parte medular en el desarrollo de este proyecto: ¿Cuáles son los mecanismos que se mantienen activos en la etapa post-sepsis?

Cuando sucede una infección, las células del sistema inmune innato son las primeras en responder ante el insulto. Posteriormente ocurre la presentación

antigénica hacia células del sistema inmune adaptativo por las células presentadoras de antígeno, en la cual es crucial la participación de lo que se ha resumido en tres señales, 1. Presentación del antígeno a través de moléculas del MHC, 2. Señales de coestimulación de las células presentadoras de antígeno (CD80 CD86) que interaccionan con los correceptor CD4 o CD8 y 3. Citocinas secretadas por las APC (Curtsinger & Mescher, 2010). Las células T que responden ante el antígeno proliferan, un fenómeno conocido como expansión clonal, en la cual se generan una gran cantidad de clones específicas hacia el antígeno. Durante este proceso se generan clones de células de memoria y efectoras, las cuales, dependiendo del agente etiológico del que provenga el antígeno, producirán diversas citocinas para facilitar el aclaramiento del mismo (Wong & Pamer, 2003).

Una población celular que es crucial en la protección contra patógenos intracelulares (por ejemplo, los virus), son las células T CD8+. Este grupo celular induce lisis en las células que se encuentran infectadas. La importancia de estas células se ha visto en diversos modelos en los cuales existe reactivación viral secundaria al régimen de inmunosupresores después de un trasplante y esta puede ser revertida mediante transferencia adoptiva de células T CD8+ específicas para el virus (Tschärke et al, 2015).

Las células vírgenes CD8+, al proliferar en respuesta a su antígeno, originan un grupo de células denominado linfocitos T citotóxicos (CTLs), medulares en la eliminación de patógenos intracelulares así como tumores (Tschärke et al., 2015), La inducción de lisis celular ocurre mediante la exocitosis de gránulos que contienen

granzimas y perforinas, y produciendo citocinas inflamatorias como IFN $\gamma$  y TNF $\alpha$  (N. Zhang & Bevan, 2011).

Una citocina crucial en el mecanismo efector de esta población celular, es el IFN $\gamma$ . El locus de *fng* tiene una regulación fina a través de diversos niveles y se ha descrito que existen diversos mecanismos que regulan su transcripción. Uno de ellos ocurre a lo largo del locus de *fng* ya que se ha descrito que en condiciones polarizantes de células Th1 ocurre una acetilación de las histonas que se encuentran en dicho locus y la transcripción ocurre en presencia de STAT4 y Tbet (Chang & Aune, 2005). En el presente trabajo se exploró el efecto que tiene la sepsis a largo plazo en la capacidad de responder ante un reto antigénico. Se describieron diversos efectos; sin embargo, el más relevante es el defecto en la producción de IFN $\gamma$  por las células CD8+. A simple vista parece que es un defecto que solo se reduce a la producción de esta citocina; sin embargo, esta citocina tiene efectos pleiotrópicos, ya que genera un estado antiviral en diversas células, y este defecto en nuestro modelo se traduce en una clara reducción en el aclaramiento de una infección y, más impactante, en la supervivencia ante una DL50 de *Listeria monocytogenes*.

La activación de células CD8, tanto dependiente como independiente de antígeno, se ve alterada en un ambiente séptico, indicando así que existe una parte del ambiente que controla la habilidad de responder de las células CD8 ante un antígeno o de detectar marcadores inflamatorios en el ambiente. Lo anterior se demostró al realizar transferencias de células OT-I a ratones 2 días después de haber realizado el modelo CLP, posteriormente se infectaron con LM-OVA, observando una disminución en la expansión clonal ante una infección, lo cual se

puede atribuir a una reducción en la población de células dendríticas, así como a una deficiencia en la producción de IL-12, la cual es crucial en la producción de IFN $\gamma$  (Strother et al., 2016). Este factor conlleva un mayor índice de mortalidad en el modelo CLP (Godshall et al., 2001). La capacidad efectora de las células CD8 se ve comprometida como consecuencia de la sepsis, ya que en modelos in vivo se ha demostrado que existe mayor susceptibilidad ante la infección con el virus de la coriomeningitis linfocítica, reflejándose en un incremento en la mortalidad y en la carga viral (Condotta et al., 2015).

Para diseccionar el mecanismo que resulta en una disminución en la producción de esta citocina, tanto a nivel proteína como a nivel mRNA, exploramos la regulación transcripcional que presenta este gen, en particular una secuencia no codificante que se encuentra conservada en humanos y ratones, aproximadamente 5kb río arriba del TSS de *Ifng*, dicho sitio presenta sitios de hipersensibilidad a la DNasa presentes en células Th1 no así en Th2, este sitio también co-localiza con marcas de histonas asociadas a cromatina accesible y sitios de unión a Tbet y NFAT1, siendo este sitio un *enhancer* que participa activamente en la transcripción de dicha citocina (Lee et al., 2004) junto con otros enhancers anotados que también tienen un papel en su transcripción (Wilson et al., 2009). Esta secuencia no codificante se describió como un lncRNA denominado NeST. Se encuentra principalmente expresado en células NK, CD8<sup>+</sup> y Th1. Dicho lncRNA participa en la transcripción de IFN $\gamma$  al reclutar a WDR5, el cual es componente del complejo remodelador de cromatina Trithorax, hacia el locus de *Ifng*, catalizando la H3K4me3 en el locus de *Ifng* (Gomez et al., 2013), dicha marca está asociada a transcripción activa, al

observar los efectos de la sepsis, en particular en esta vía de regulación a través del lncRNA NeST, observamos una disminución en la expresión de este transcrito, como se mencionó este transcrito ejerce su mecanismo de acción a través del complejo MLL hacia el locus de *Irfg*, al cuantificar el enriquecimiento relativo de WDR5 (Proteína perteneciente al complejo MLL) y la marca de histona que cataliza, observamos una reducción significativa en el enriquecimiento de ambas a lo largo del locus de WDR5, lo que puede ser una de las causas que afectan la transcripción de *Irfg*, resultando así en el fenotipo antes descrito.

Finalmente, al ser un mecanismo de regulación ampliamente conservado entre humanos y ratones, decidimos explorar la capacidad productora de IFN $\gamma$  en células de pacientes que estuvieron expuestos a un episodio de sepsis que requirió de hospitalización, se realizó de este modo para tener un modelo lo más parecido al modelo CLP, en cuanto a condiciones experimentales. En línea con los resultados obtenidos, las células CD8 de pacientes expuestos a sepsis eran incapaces de producir IFN $\gamma$  como los controles, hablando así de un posible mecanismo conservado que gobierna la inmunosupresión en células T CD8, en particular la producción de IFN $\gamma$ . Queda por dilucidar si la transcripción del lncRNA NeST también se ve alterada junto con su función en las células T CD8.

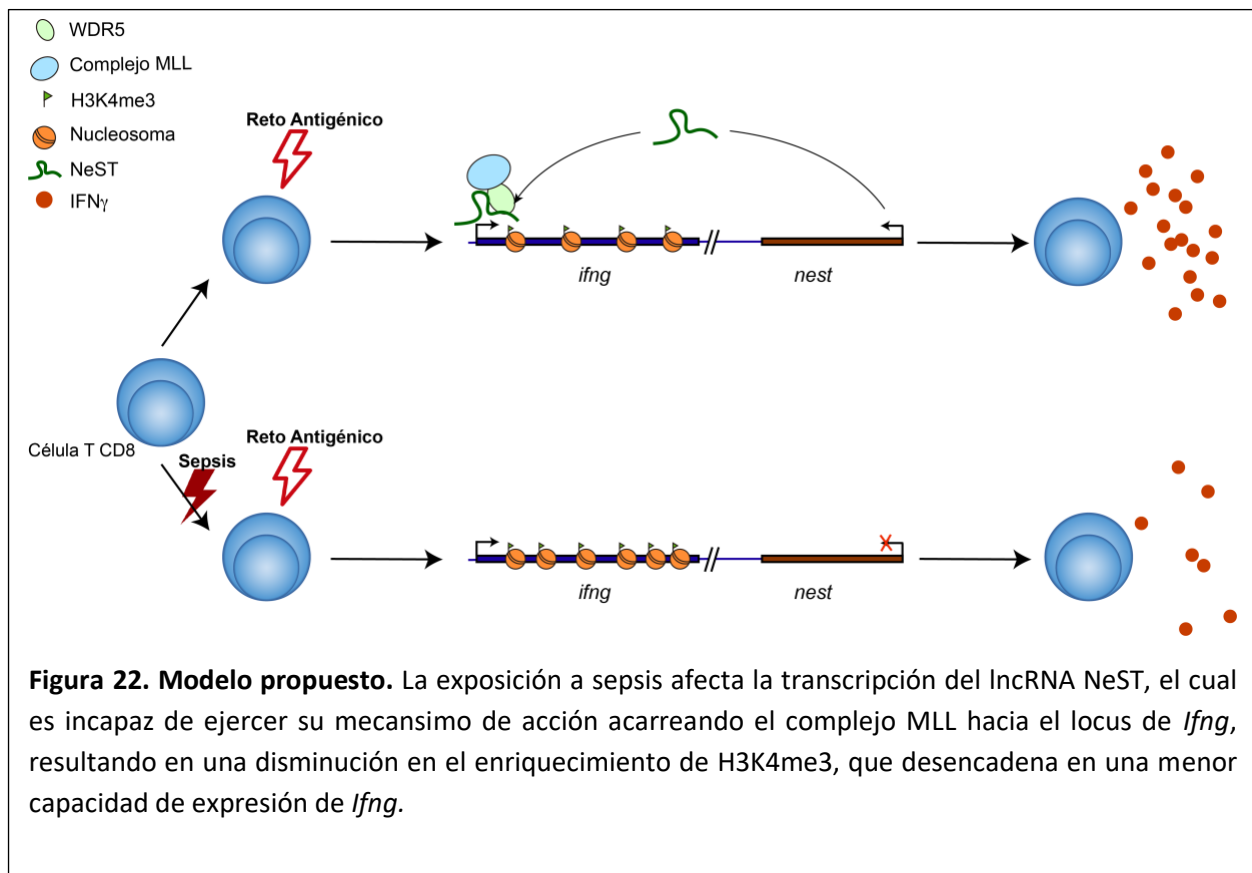
Queda aún la interrogante de cuál es el mecanismo que afecta la transcripción de este lncRNA, ya que su transcripción es dependiente de T-bet, la misma vía de señalización que participa en la transcripción de *Irfg* (Collier et al., 2014), en un modelo de sepsis por candidiasis se encontró que la expresión de T-bet se ve alterada en medida del grado de severidad de sepsis (Bai et al, 2020), sin embargo

en los análisis de qPCR observamos una tendencia a la baja en la expresión de *Tbx21* sin llegar a ser significativo. El presente trabajo propone una serie de defectos en un mecanismo finamente regulado que provoca una alteración en la producción de IFN $\gamma$ , los diversos efectos que tiene la sepsis provocan una posible alteración en la en la expresión de *Tbx21* en células T CD8, un factor que se ha relacionado con la transcripción de NeST, lo que repercute en una disminución en la transcripción de NeST que a su vez afecta la expresión de IFN $\gamma$ , resultando en una capacidad limitada de responder ante una infección por un microorganismo intracelular.

Si este defecto como se observó dentro del estudio piloto realizado en pacientes que tuvieron sepsis y tuvieron un desenlace favorable, se realiza con un muestra más grande y se obtiene el mismo resultado, esto sugeriría que el mecanismo planteado en este trabajo que resulta en una deficiencia en la producción de IFN $\gamma$  se encuentra conservado, lo cual abriría la posibilidad de usar el modelo planteado al inicio del trabajo para buscar posibles alternativas terapéuticas que resulten en una mejora en la producción de IFN $\gamma$ , ya que se ha demostrado en estudios *in vivo* con pacientes que el IFN $\gamma$  revierte parcialmente la inmunoparálisis asociada a sepsis (Schulte et al., 2013)

## Conclusiones

Los resultados demuestran que la exposición de células T CD8<sup>+</sup> a sepsis tiene efectos sobre los mecanismos que regulan la transcripción en locus de *Ifng*. La sepsis inhibe la expresión del lncRNA NeST, por mecanismos que aún queda por dilucidar y esto se asocia a una falla en el reclutamiento de WDR5 y la catalización de la marca H3K4me3. Provocando así una disminución en la accesibilidad de la cromatina y disminución en la transcripción de cantidades necesarias de IFN $\gamma$  ante retos antigénicos, lo que afecta la respuesta inmune en contra de patógenos intracelulares y esto se ve reflejado en defectos durante la aclaración de patógenos lo que puede provocar una disminución en la tasa de supervivencia.





## Bibliografía

- Agarwal, & Rao. (1998). Modulation of Chromatin Structure Regulates Cytokine Gene Expression during T Cell Differentiation. *Immunity*, 9, 765–775.
- Angus, & Van Der Poll. (2013). Severe Sepsis and Septic Shock. *N Engl J Med*, 369, 840–51.
- Aubagnac, Brahic, & Bureau. (2002). Bone marrow chimeras reveal non-H-2 hematopoietic control of susceptibility to Theiler's virus persistent infection. *Journal of Virology*, 76(11), 5807–12.
- Bai, Wang, Han, & Cui. (2020). T-Bet Expression Mediated by the mTOR Pathway Influences CD4+ T Cell Count in Mice With Lethal Candida Sepsis. *Frontiers in Microbiology*, 11.
- Boomer, To, Chang, Takasu, Osborne, Walton, Bricker, Jarman, Kreisel, Krupnick, Srivastava, Swanson, Green, & Hotchkiss. (2011). Immunosuppression in patients who die of sepsis and multiple organ failure. *JAMA - Journal of the American Medical Association*, 306(23), 2594–2605.
- Bouras, Asehnoune, & Roquilly. (2018). Contribution of dendritic cell responses to sepsis-induced immunosuppression and to susceptibility to secondary pneumonia. *Frontiers in Immunology*, 9(NOV), 1–9.
- Cabrera-Perez, Javier, & , Britnie R James. (2014). Long term impairment of CD4 T cell responses after sepsis. *Journal of Investigative Medicine*.
- Cabrera-Perez, Condotta, Badovinac, & Griffith. (2014). Impact of sepsis on CD4 T cell immunity. *Journal of Leukocyte Biology*, 96(5), 767–77.
- Carrillo-Esper, Carrillo-Córdova, & Carrillo-Córdova. (2009). Estudio epidemiológico de la sepsis en unidades de terapia intensiva mexicanas. *Cirugia y Cirujanos*, 77(4), 301–308.
- Carson, Cavassani, Dou, Kunkel, Carson IV, Cavassani, Dou, & Kunkel. (2011). Epigenetic regulation of immune cell functions during post-septic immunosuppression. *Epigenetics*, 6(3), 273–83.
- Cisneros-González N and Ceballos RM. (2009). Metabolic Syndrome in Mexico: Situational Assessment and Some Technological Challenges. *CENETEC*, (c), 1–33.
- Collier, Henderson, Tossberg, & Aune. (2014). Regulation of the Th1 Genomic Locus from *Ifng* through *Tmevpg1* by T-bet. *The Journal of Immunology*, 193(8), 3959–3965.
- Condotta, Khan, Rai, Griffith, & Badovinac. (2015). Polymicrobial Sepsis Increases

- Susceptibility to Chronic Viral Infection and Exacerbates CD8 + T Cell Exhaustion. *The Journal of Immunology*, 195(1), 116–125.
- Cuenca, & Delano. (2011). A Paradoxical Role for Myeloid-Derived Suppressor Cells in Sepsis and Trauma. *Molecular Medicine*, 17(3–4), 1.
- Curtsinger, & Mescher. (2010). Inflammatory cytokines as a third signal for T cell activation. *Current Opinion in Immunology*, 22(3), 333–340.
- Cuthbertson, Elders, Hall, Taylor, MacLennan, Mackirdy, & Mackenzie. (2013). Mortality and quality of life in the five years after severe sepsis. *Critical Care*, 17(2), R70.
- Davis, Chang, Osborne, Walton, Dunne, & Muenzer. (2011). Increased susceptibility to *Candida* infection following cecal ligation and puncture. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 414(1), 37–43.
- Dejager, Pinheiro, Dejonckheere, & Libert. (2011). Cecal ligation and puncture: The gold standard model for polymicrobial sepsis? *Trends in Microbiology*, 19(4), 198–208.
- Delano, & Ward. (2016). Sepsis-induced immune dysfunction: can immune therapies reduce mortality? *The Journal of Clinical Investigation*, 126(1), 23–31.
- Demaret, Venet, Friggeri, Cazalis, Plassais, Jallades, Malcus, Poitevin-Later, Textoris, Lepape, & Monneret. (2015). Marked alterations of neutrophil functions during sepsis-induced immunosuppression. *Journal of Leukocyte Biology*, 98(6), 1081–1090.
- Deutschman, & Tracey. (2014). Sepsis: Current dogma and new perspectives. *Immunity*.
- Fan, Liu, Jin, Yan, & Liang. (2015). Alterations of Dendritic Cells in Sepsis: Featured Role in Immunoparalysis. *BioMed Research International*, 2015, 1–10.
- Furlan-Magaril, & Recillas-Targa. (2015). Individual and sequential chromatin immunoprecipitation protocols. *Methods in Molecular Biology*, 1334, 205–218.
- Godshall, Lentsch, Peyton, Scott, & Cheadle. (2001). STAT4 is required for antibacterial defense but enhances mortality during polymicrobial sepsis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 8(6), 1044–1048.
- Gomez, Wapinski, Yang, Bureau, Gopinath, Monack, Chang, Brahic, & Kirkegaard. (2013). The NeST Long ncRNA Controls Microbial Susceptibility and Epigenetic Activation of the Interferon- $\gamma$  Locus. *Cell*, 152, 743–754.
- Gordon P Otto, Maik Sossdorf, Ralf A Claus, Jürgen Rödel, Katja Menge, Konrad Reinhart. (2018). The late phase of sepsis is characterized by an increased microbiological burden and death rate. *Critical Care*, 15.
- Hatton, Harrington, Luther, Wakefield, Janowski, Oliver, Lallone, Murphy, & Weaver. (2006). A Distal Conserved Sequence Element Controls *Ifng* Gene Expression by T Cells and NK Cells. *Immunity*, 25(5), 717–729.

- Henriksen, Pottegard, Laursen, Jensen, Hallas, Pedersen, & Lassen. (2017). Intermediate-term and long-term mortality among acute medical patients hospitalized with community-acquired sepsis: A population-based study. *European Journal of Emergency Medicine, 24*(6), 404–410.
- Hotchkiss, Coopersmith, McDunn, & Ferguson. (2009). The sepsis seesaw: tilting toward immunosuppression. *Nature Medicine, 15*(5), 496–497.
- Hotchkiss, Monneret, & Payen. (2013). Immunosuppression in sepsis: A novel understanding of the disorder and a new therapeutic approach. *The Lancet Infectious Diseases, 13*(3), 260–268.
- Hubbard, Choudhry, Schwacha, Kerby, Rue, Bland, & Chaudry. (2005). Cecal ligation and puncture. *Shock (Augusta, Ga.), 24 Suppl 1*, 52–7.
- Hughes, Benson, Bedaj, & Maffia. (2016). Antigen-presenting cells and antigen presentation in tertiary lymphoid organs. *Frontiers in Immunology, 7*(NOV).
- Hutchins, Unsinger, Hotchkiss, & Ayala. (2014). The new normal: immunomodulatory agents against sepsis immune suppression. *Trends in Molecular Medicine, 20*(4), 224–233.
- Jon A. Buras, & and Michail Sitkovsky. (2005). Animal Models of Sepsis: Setting The Stage. *Nature Reviews, 4*, 854–865.
- Kennelly, & Martin-Loeches. (2016). Long term mortality following sepsis. *Annals of Translational Medicine, 4*(19), 387–387.
- Lee, Avni, Chen, & Rao. (2004). A Distal Enhancer in the Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) Locus Revealed by Genome Sequence Comparison. *Journal of Biological Chemistry, 279*(6), 4802–4810.
- Li, Carey, & Workman. (2007). The Role of Chromatin during Transcription. *Cell, 128*(4), 707–719.
- Martin, Mannino, Eaton, & Moss. (2003). The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *New England Journal of Medicine, 348*(16), 1546–1554.
- McArthur, Gerum, & Stamatoyannopoulos. (2001). Quantification of DNaseI-sensitivity by real-time PCR: Quantitative analysis of DNaseI-hypersensitivity of the mouse  $\beta$ -globin LCR. *Journal of Molecular Biology, 313*(1), 27–34.
- McClure, Ali, Youssef, Yao, McCall, & El Gazzar. (2015). NFI-A disrupts myeloid cell differentiation and maturation in septic mice. *Journal of Leukocyte Biology, 99*(January), 1–11.
- Mohr, Polz, Martin, Grießl, Kammler, Pötschke, Lechner, Bröker, Mostböck, & Männel. (2012). Sepsis leads to a reduced antigen-specific primary antibody response. *European Journal of Immunology, 42*(2), 341–352.
- Muenzer, Davis, Chang, Schmidt, Dunne, Coopersmith, & Hotchkiss. (2010). Characterization and modulation of the immunosuppressive phase of sepsis.

*Infection and Immunity*, 78(4), 1582–1592.

- Nascimento, Melo, Piñeros, Ferreira, Colón, Donate, Castanheira, Gozzi, Czaikoski, Niedbala, Borges, Zamboni, Liew, Cunha, & Alves-Filho. (2017). IL-33 contributes to sepsis-induced long-Term immunosuppression by expanding the regulatory T cell population. *Nature Communications*, 8.
- Pasqui, Di Renzo, Bruni, Fanetti, Campoccia, & Auteri. (1995). Imipenem and immune response: In vitro and in vivo studies. *Drugs under Experimental and Clinical Research*, 21(1), 17–22.
- Pipkin, & Lichtenheld. (2006). A reliable method to display authentic DNase I hypersensitive sites at long-ranges in single-copy genes from large genomes. *Nucleic Acids Research*, 34(4).
- Remick. (2007). Pathophysiology of sepsis. *The American Journal of Pathology*, 170(5), 1435–1444.
- Richard S. Hotchkiss, Kevin W. Tinsley, Paul E. Swanson, Robert E. Schmieg, Jr., Jia Ji Hui, Katherine C. Chang, Dale F. Osborne, Bradley D. Freeman, J. Perren Cobb, Timothy G. Buchman. (2001). Sepsis-Induced Apoptosis Causes Progressive Profound Depletion of B and CD4+ T Lymphocytes in Humans. *J Immunol References*, 166, 6952–6963.
- Rittirsch, Huber-Lang, Flierl, & Ward. (2009). Immunodesign of experimental sepsis by cecal ligation and puncture. *Nature Protocols*, 4(1), 31–6.
- Rodriguez, Chora, Goumnerov, Mumaw, Goebel, Fernandez, Baydoun, HogenEsch, Dombkowski, Karlewicz, Rice, Rahme, & Carlesso. (2009). Dysfunctional expansion of hematopoietic stem cells and block of myeloid differentiation in lethal sepsis. *Blood*, 114(19), 4064–4076.
- Roquilly, McWilliam, Jacqueline, Tian, Cinotti, Rimbart, Wakim, Caminschi, Lahoud, Belz, Kallies, Mintern, Asehnoune, & Villadangos. (2017). Local Modulation of Antigen-Presenting Cell Development after Resolution of Pneumonia Induces Long-Term Susceptibility to Secondary Infections. *Immunity*, 47(1), 135-147.e5.
- Schoenborn, Dorschner, Sekimata, Santer, Shnyreva, Fitzpatrick, Stamatoyonnapoulos, & Wilson. (2007). Comprehensive epigenetic profiling identifies multiple distal regulatory elements directing transcription of the gene encoding interferon- $\gamma$ . *Nature Immunology*, 8(7), 732–742.
- Schuettengruber, Martinez, Iovino, & Cavalli. (2011). Trithorax group proteins: switching genes on and keeping them active. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 12(12), 799–814.
- Schulte, Bernhagen, & Bucala. (2013). Cytokines in sepsis: Potent immunoregulators and potential therapeutic targets - An updated view. *Mediators of Inflammation*, 2013.
- Sharpe, & Pauken. (2018). The diverse functions of the PD1 inhibitory pathway. *Nature Reviews Immunology*, 18(3), 153–167.

- Singer, Deutschman, Seymour, Shankar-Hari, Annane, Bauer, Bellomo, Bernard, Chiche, Coopersmith, Hotchkiss, Levy, Marshall, Martin, Opal, Rubenfeld, van der Poll, Vincent, & Angus. (2016). The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA*, 315(8), 801.
- Storgaard, Hallas, Gahrn-Hansen, Pedersen, Pedersen, & Lassen. (2013). Short- and long-term mortality in patients with community-acquired severe sepsis and septic shock. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 45(8), 577–583.
- Strother, Danahy, Kotov, Kucaba, Zacharias, Griffith, Legge, & Badovinac. (2016). Polymicrobial Sepsis Diminishes Dendritic Cell Numbers and Function Directly Contributing to Impaired Primary CD8 T Cell Responses In Vivo. *The Journal of Immunology*, 197(11), 4301–4311.
- Sun. (2010). Nucleic Extraction and Amplification. *Molecular Diagnostics*, 35–47.
- Tatura, Zeschnigk, Hansen, Steinmann, Goncalves Vidigal, Hutzler, Pastille, Westendorf, Buer, & Kehrmann. (2015). Relevance of Foxp3+ regulatory T cells for early and late phases of murine sepsis. *Immunology*, 146(1), 144–156.
- Terashima, Okamoto, Nakashima, Akira, Ikuta, & Takayanagi. (2016). Sepsis-Induced Osteoblast Ablation Causes Immunodeficiency. *Immunity*, 44(6), 1434–1443.
- Toscano, Ganea, & Gamero. (2011). Cecal ligation puncture procedure. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, (51), 1–5.
- Van Vught, Klouwenberg, Spitoni, Scicluna, Wiewel, Horn, Schultz, Nürnberg, Bonten, Cremer, & Van Der Poll. (2016). Incidence, risk factors, and attributable mortality of secondary infections in the intensive care unit after admission for sepsis. *JAMA - Journal of the American Medical Association*, 315(14), 1469–1479.
- Vigneau, Levillayer, Crespeau, Cattolico, Caudron, Bihl, Robert, Brahic, Weissenbach, & Bureau. (2001). Homology between a 173-kb Region from Mouse Chromosome 10, Telomeric to the Ifng Locus, and Human Chromosome 12q15. *Genomics*, 78(3), 206–213.
- Walton, Muenzer, Rasche, Boomer, Sato, Brownstein, Pachot, Brooks, Deych, Shannon, Green, Storch, & Hotchkiss. (2014). Reactivation of multiple viruses in patients with sepsis. *PLoS ONE*, 9(6), 1–13.
- Wang, H. E., Szychowski, Griffin, Safford, Shapiro, & Howard. (2014). Long-term mortality after community-acquired sepsis: A longitudinal population-based cohort study. *BMJ Open*, 4(1), 1–8.
- Wang, T., Derhovanessian, De Cruz, Belperio, Deng, & Hoo. (2014). Subsequent infections in survivors of sepsis: Epidemiology and outcomes. *Journal of Intensive Care Medicine*, 29(2), 87–95.
- Wherry, Ha, Kaech, Haining, Sarkar, Kalia, Subramaniam, Blattman, Barber, & Ahmed. (2007). Molecular Signature of CD8+ T Cell Exhaustion during Chronic

Viral Infection. *Immunity*, 27(4), 670–684.

Wilson, Rowell, & Sekimata. (2009). Epigenetic control of T-helper-cell differentiation. *Nature Reviews Immunology*, 9(2), 91–105.

Wong, & Pamer. (2003). CD8 T Cell Responses to Infectious Pathogens. *Annual Review of Immunology*, 21(1), 29–70.

Xie, Fang, Fang, Wu, Jin, Wang, Guo, Gu, Xu, Wang, Yao, Yuan, Du, Sun, Wang, Wu, & Cheng. (2008). Impact of invasive fungal infection on outcomes of severe sepsis: A multicenter matched cohort study in critically ill surgical patients. *Critical Care*, 12(1), 1–9.

Yi, Cox, & Zajac. (2010). T-cell exhaustion: Characteristics, causes and conversion. *Immunology*, 129(4), 474–481.

Zeng, & McFarland. (2014). Rapid and unambiguous detection of DNase I hypersensitive site in rare population of cells. *PLoS ONE*, 9(1).

Zhang, Mao, Fang, Jin, Cheng, Xie, Li, Yu, Zhu, Wang, Liu, Zhang, Jin, Zhang, Lou, & Fang. (2013). Impaired long-term quality of life in survivors of severe sepsis: Chinese multicenter study over 6 years. *Anaesthetist*, 62(12), 995–1002.

## Anexo 1

### Algoritmo de búsqueda de pacientes

Nombre del proyecto: \_\_\_\_\_

Número del proyecto: \_\_\_\_\_

Cama: \_\_\_\_\_

Nombre:

\_\_\_\_\_

Registro: \_\_\_\_\_

Sector: \_\_\_\_\_

#### “Efecto de la sepsis en la función efectora de células CD8+”

**Instrucciones.** Usar esta hoja para la búsqueda de pacientes con sepsis por neumonía o sepsis abdominal en las unidades en hospitalización, urgencias (consultorios y piso) y en la UCI.

- 1. Identificar si el paciente presenta Dx o sospecha de neumonía adquirida en la comunidad (NAC), neumonía intrahospitalaria (NIH) o asociada a ventilación mecánica (NAV).**

- 1.1. El paciente tiene alguno de los siguientes criterios para el Dx de NAC:**

- Tos con o sin esputo y/o disnea de reciente aparición y/o incremento de la misma.
- Sx de consolidación o estertores subcrepitantes o matices a la percusión
- Infiltrados alveolares nuevos o progresivos en los estudios de imagen de tórax.

Si el paciente reúne dos criterios de la línea 2.1. se considera que tiene NAC.

- Sí
- No

**1.2. El paciente tiene criterios para el Dx de NIH o NAV**

- Cambio en las características de las secreciones o secreciones purulentas.
- Sx de consolidación o estertores subcrepitantes o matices a la percusión.
- Infiltrados alveolares nuevos o progresivos en los estudios de imagen de tórax.
- El cuadro se desarrolló 48hrs después de la hospitalización o del inicio de la ventilación mecánica.

Si el paciente reúne dos de los tres primeros puntos y el cuadro se desarrolló 48h después de la hospitalización o del inicio de la ventilación mecánica se considera que tiene NIH o NAV.

- Sí
- No

**2. De acuerdo con los lineamientos del Tercer Consenso Internacional de Sepsis (Singer M, et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). JAMA. 2016) , determinar si el paciente cumple con los siguientes criterios:**

**2.1. qSOFA**

<b>Criterio</b>	<b>Intervalo</b>	<b>Estado del Paciente</b>
Frecuencia respiratoria	≥ 22/min	
Estado mental alterado	<13	
Presión sistólica	≤100mmHg	

<b>Ocular</b>	<b>Verbal</b>	<b>Motora</b>
4 Espontaneo	5 Orientada	6 Obedece ordenes
3 Al hablarle	4 Confundido	5 Dolor localizado
2 Al dolor	3 Inapropiada	4 Retira al dolor
1 Sin respuesta	2 Incomprensible	3 Flexiona al dolor
	1 Sin respuesta	2 Extensión al dolor
		1 Sin respuesta



## 2.2. SOFA

El paciente debe presentar un score  $\geq 2$  en SOFA

Escala de Medición Secuencial de Falla Orgánica (SOFA)						
Aparato o sistema afectado	Anotar valor	0	1	2	3	4
Coagulación plaquetas (Num/ml)		>150	$\leq 150$	$\leq 100$	$\leq 50$	$\leq 20$
Respiratorio PaO <sub>2</sub> /FiO <sub>2</sub> (mmHg)*		>400	$\leq 400$	$\leq 300$	$\leq 200$ con soporte respiratorio	$\leq 100$ con soporte respiratorio
Hígado (bilirrubinas, mg/dL)		<1.2 <2	1.2-1.9	2-5.9	6-11.9	>12
Renal (Creatinina, mg/dL)		1.2	1.2-1.9	2.0-3.4	3.5-4.9	>5
Cardiovascular** Tensión arterial media (TAM) mmHg		Sin hipotensión	TAM <70mm Hg	Dopamina $\leq 5$ Dobutamina (cualquier dosis)	Dopamina >5 Adrenalina $\leq 0.1$ NA $\leq 0.1$	Dopamina >15 Adrenalina >0.1 NA >0.1
SNC (escala de Glasgow)		15	13-14	10-12	6-9	<6
Gasto urinario					<500ml/d	<200ml/d
<p>*El índice PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub> se ajustará a la altura sobre el nivel del mar de acuerdo al protocolo utilizado por el sistema ARDSNetwork (<a href="http://www.ardsnet.org/">www.ardsnet.org/</a>).</p> <p>**Los agentes adrenérgicos son administrados por al menos 1h.</p>						

¿Es un paciente con SOFA  $\geq 2$ ?

\_\_\_ Sí. Continuar

\_\_\_ No. Paciente no apto para el protocolo. Detener búsqueda.

### 3. Criterios de exclusión

Sí	No	Criterio
		Infección VIH
		Administración esteroides en los últimos 30 días (excepto como tx en sepsis)
		Enfermedad hematológica maligna (cualquiera)
		Dx de cáncer (actual)
		Administración quimioterapia en los últimos 6 meses
		Lesión por quemaduras
		Trauma
		Enfermedad autoinmune (cualquiera, e.g. LEG, AR, Nefropatías autoinmunes)
		Trasplante

Si las respuestas 1,2 son afirmativas y la 3 negativa, el paciente es candidato a ingresar al estudio y se deberá:

- Solicitar consentimiento informado al paciente y/o familiar responsable
- Tomar muestras.
  - La primera toma de muestra se realizará en un lapso no mayor a 24h después de la identificación del paciente.
  - La segunda toma se realizará exactamente 7 días después de la primera toma.

Fecha de la toma de muestra:

Primera toma: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ (dd/mm/aaaa) Hora (hh:mm) \_\_\_\_:\_\_\_\_\_

Segunda toma: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ (dd/mm/aaaa) Hora (hh:mm) \_\_\_\_:\_\_\_\_\_