



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

INSTITUTO NACIONAL DE PERINATOLOGÍA
“ISIDRO ESPINOSA DE LOS REYES”

“INMUNOFENOTIPO DE LEUCOCITOS DE
SANGRE DE CORDÓN UMBILICAL DE PACIENTES
CON SÍNDROME DE RESPUESTA INFLAMATORIA
SISTÉMICA NEONATAL”

TESIS DE POSGRADO
PARA OBTENER EL TÍTULO DE
NEONATOLOGÍA

PRESENTA
DRA. TANIA VERGARA OCEGUERA

DIRECTOR Y ASESOR DE TESIS
DR. ARTURO CÉRBULO VÁZQUEZ

México D.F.

marzo 2014





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

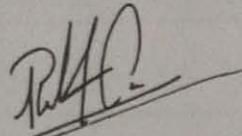
DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

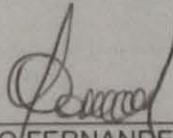
El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición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

AUTORIZACION DE TESIS

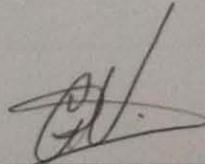
**"INMUNOFENOTIPO DE LEUCOCITOS DE SANGRE DE CORDÓN UMBILICAL DE
PACIENTES CON SÍNDROME DE RESPUESTA INFLAMATORIA SISTÉMICA
NEONATAL"**



DR. RODRIGO AYALA YAÑEZ
DIRECTOR DE ENSEÑANZA



DR. LUS ALBERTO FERNANDEZ CARROCERA
PROFESOR TITULAR DEL CURSO DE ESPECIALIZACION EN
NEONATOLOGIA



DR. ARTURO CÉRBULO VAZQUEZ
DIRECTOR DE TESIS

INDICE

Página de título.....	4
Resumen.....	5
Abstract.....	7
Introducción.....	12
Material y métodos.....	17
Resultados.....	21
Discusión.....	26
Conclusiones.....	28
Referencias.....	29
Cuadros y Figuras.....	33
Graficas.....	37

TITULO:

“INMUNOFENOTIPO DE LEUCOCITOS DE SANGRE DE CORDÓN UMBILICAL DE PACIENTES CON SÍNDROME DE RESPUESTA INFLAMATORIA SISTÉMICA NEONATAL”

“LEUCOCYTE IMMUNOPHENOTYPING CORD BLOOD OF PATIENTS WITH SYSTEMIC INFLAMMATORY RESPONSE SYNDROME NEONATAL “

AUTOR Y COAUTOR:

Cérbulo – Vázquez A*, Vergara – Ocegüera T**

* Director de Investigación del Instituto Nacional de Perinatología.

**Médico residente del Curso de Neonatología.

LUGAR DONDE SE REALIZO EL ESTUDIO:

Instituto Nacional de Perinatología. Isidro Espinoza de los Reyes.

CORRESPONDENCIA:

Montes Urales 800

Colonia Lomas Virreyes.

11000 México DF. Teléfono (55) 55209900

Correo electrónico: cerbulo@hotmail.com tannyavo@yahoo.com.mx

RESUMEN

INTRODUCCION: Sepsis neonatal se define como un síndrome de respuesta inflamatoria sistémica resultado de infección probada durante el primer mes de vida extrauterina. A nivel mundial, la sepsis constituye un problema de salud hospitalaria, con tasas altas reportadas en países en vías de desarrollo. El estándar de oro para diagnosticar sepsis es el hemocultivo, pero su lectura tarda entre 48 y 72 horas con altos índices de falsos positivos y una sensibilidad del 70%.

OBJETIVO: Identificar las diferencias fenotípicas y de distribución de leucocitos de sangre de cordón umbilical de pacientes con SIRS y sujetos sanos a través de los marcadores CD45, CD3, HLA-DR, CD14, CD69, CD64, CD16, TREM-1, IREM-2 evaluados por citometría de flujo.

HIPOTESIS: Muestras de sangre de cordón umbilical de neonatos con Síndrome de Respuesta Inflamatoria Sistémica y sanos expresarán diferencialmente los marcadores estudiados.

MATERIAL Y METODOS: Se colectaron veintidós muestras de tres mL de sangre de cordón umbilical procedente de neonatos que presentaron o no factores de riesgo en la sala toco quirúrgica del Instituto Nacional de Perinatología; trece muestras de sangre de cordón umbilical de neonatos sanos con edad gestacional 39.1 ± 1.3 semanas de gestación y nueve muestras de sangre cordón umbilical de pacientes con síndrome de respuesta inflamatoria sistémica con edad gestacional 34.5 ± 4.1 semanas de gestación. Se realizó la tinción de células aisladas de sangre, se usaron anticuerpos monoclonales dirigidos contra moléculas de superficie en poblaciones leucocitarias de interés presentes en sangre de neonato y se realizó análisis a través de citometría de flujo. El análisis de los datos se realizó utilizando el software Infinicyt.

RESULTADOS. Hay una menor proporción de linfocitos en neonatos con síndrome de respuesta inflamatoria sistémica comparados con los neonatos sanos; en monocitos se puede observar que hay una mayor proporción en muestras de neonatos con SIRS, sin embargo en granulocitos no se observan diferencias significativas

CD69 es un marcador de activación temprana, se expresa en mayor proporción en linfocitos de pacientes con SIRS, comparados con la proporción de linfocitos de neonatos sanos. La expresión de IREM-2 en monocitos de sangre de cordón umbilical de neonatos sanos es mayor que en neonato con SIRS, sin embargo no muestra diferencia significativas en cuanto a la intensidad media de la fluorescencia. El porcentaje de expresión de TREM-1 y HLA-DR muestra diferencias significativas entre los grupos analizados, con una mayor proporción en el grupo de neonatos con SIRS.

CONCLUSIONES: Leucocitos de sangre de cordón umbilical de sujetos sanos y pacientes con síndrome de respuesta inflamatoria sistémica no presentan diferencias mayores en los patrones de tamaño contra complejidad clásicos por citometría. Los porcentajes de linfocitos y monocitos analizados por citometría de flujo podrían ser de utilidad para diferenciar muestras de neonatos sanos de las de pacientes con SIRS

PALABRAS CLAVE: Síndrome de respuesta inflamatoria sistémica, Recién Nacido, Inmunofenotipo de leucocitos, Sangre de cordón umbilical.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Neonatal sepsis is defined as a systemic inflammatory response syndrome resulting from infection tested during the first month after birth. Worldwide, sepsis is a hospital health problem, with high rates reported in developing countries. The gold standard for diagnosing sepsis is blood culture, but reading takes between 48 and 72 hours with high rates of false positives and sensitivity of 70%.

HYPOTHESIS: Samples of umbilical cord blood of infants with healthy Syndrome Systemic Inflammatory Response differentially expressed markers studied

MATERIAL AND METHODS: twenty two samples of three mL of cord blood were collected from infants who developed or not risk factors in the National Institute of Perinatology, thirteen samples of umbilical cord blood of healthy neonates with gestational age 39.1 ± 1.3 9 weeks gestation and cord blood samples of patients with systemic inflammatory response syndrome and gestational age 34.5 ± 4.1 weeks of gestation. Staining of isolated cells from blood was drawn monoclonal antibodies directed against surface molecules of interest in leukocyte populations present in the blood of newborn and analysis by flow cytometry was performed was used. Data analysis was performed using the software infinicyt.

RESULTS. There is a lower proportion of lymphocytes in neonates with SIRS compared with healthy infants, in monocytes can be seen that there is a higher proportion of neonates with SIRS samples, however no significant differences in granulocyteobserved

CD69 is an early activation marker, is expressed in a greater proportion in lymphocytes from patients with SIRS, as compared to the proportion of lymphocytes of healthy neonates. IREMs expression-2 in blood monocytes of healthy infants umbilical cord is

higher than in the newborn with SIRS, but shows no significant difference in the mean fluorescence intensity. The percentage of expression of TREM-1 and HLA-DR shows significant differences between the groups analyzed, with a higher proportion in the group of neonates with SIRS

CONCLUSIONS: Leukocytes from cord blood of healthy subjects and patients with systemic inflammatory response syndrome show no major differences in the patterns of size versus classical complexity cytometry. The percentages of lymphocytes and monocytes by flow cytometry analyzed could be useful to differentiate healthy samples from neonates of SIRS patients

KEYWORDS: Systemic Inflammatory Response Syndrome, Newborn, Immunophenotyping of leukocytes, Umbilical cord blood.

ANTECEDENTES

A nivel mundial, la sepsis afecta a 18 millones de personas cada año, la mayor incidencia de la enfermedad se presenta en los extremos de la vida (neonatos y adultos mayores) (1). La prevalencia de sepsis neonatal a nivel mundial se ha estimado menor al 1.0% del total de los nacimientos; sin embargo, los riesgos de mortalidad neonatal alcanzan hasta un 50% de los casos (2). La sepsis neonatal de acuerdo a su tiempo de aparición es clasificada en dos grupos: sepsis temprana (dentro de las primeras 72 horas de vida) y sepsis tardía (después de las primeras 72 horas de vida), estos grupos poseen características clínicas, antecedentes, etiología y cuadro clínico único (3). El anuario estadístico 2007 del INPer, reporto que el agente causal de mayor aparición en neonatos con sepsis tardía internados en UCIREN (Unidad de Cuidados Intensivos del Recién Nacido), fue del genero *Staphylococo* con especie no especificada, así mismo se reporto que en más del 65% de los casos, no se logró identificar su agente causal, lo que podría indicar que el hemocultivo (estándar de oro para el diagnóstico de sepsis) no es lo suficientemente sensible para el diagnóstico de sepsis. Idealmente, el diagnóstico temprano de sepsis debe ser capaz de distinguir entre el Síndrome de Respuesta Inflamatoria Sistémica o del Síndrome de Respuesta Anti-inflamatoria compensatoria y sepsis.(4- 5)

El cuadro clínico de Síndrome de Respuesta Inflamatoria Sistémica puede diagnosticarse por cambios en la temperatura corporal, que pueden variar desde la hipotermia (temperatura corporal $<35^{\circ}\text{C}$) hasta la hipertermia (temperatura $>38^{\circ}\text{C}$) taquicardia, taquipnea, leucocitosis o leucopenia (6)

Para restaurar el equilibrio de la excesiva respuesta pro inflamatoria, se evoca una respuesta anti inflamatoria que en caso favorable se logra la homeostasis y por lo tanto la recuperación del paciente, sin embargo, cuando al respuesta anti inflamatoria es exacerbada se puede desarrollar en un Síndrome de Respuesta Anti-inflamatoria Compensatoria (CARS) que mas una mezcla de señales de respuesta antagonista (MARS) y que puede conducir a una disfunción multiorgánica (MOF) (7 - 8).

Tanto en SIRS como en CARS se desarrolla una intrincada y compleja red de mediadores biológicos que son los responsables del cuadro clínico (9 - 10). La expresión de algunos de estos mediadores biológicos (que podemos denominar biomarcadores en superficie celular se modifican dinámicamente en función de interacciones con las células a las que van dirigidos y las respuestas que en estas despiertan (11 - 12). Por lo que es necesaria la búsqueda de no solo un biomarcador para definir SIRS y sepsis sino se requiere explorar varios que constituyan paneles de expresión diferencial como se observa en otras enfermedades complejas, tales como leucemias y linfomas (13).

Por esta razón, el objetivo del Instituto Nacional de Perinatología (INPer) en colaboración con Centro Médico Nacional SXXI, IMSS es desarrollar una prueba diagnóstica para sepsis en neonatos con alta sensibilidad y especificidad, utilizando técnicas de citometría de flujo con resultados en un tiempo estimado de 2 horas con un volumen mínimo de 150 microL de sangre total.

Para ello, en el presente trabajo se determinaron los patrones de un panel de biomarcadores de activación presentes en las células T, B, macrófagos y granulocitos de sangre de cordón umbilical (UCB, por sus siglas en ingles) de sujetos sanos y de pacientes con SIRS.

En el presente trabajo nosotros mostramos la caracterización de poblaciones monocíticas a través de la expresión de moléculas de activación celular: TREM-1, HLA-DR, IREM-2, CD16, CD64, CD69. Se sabe que estas moléculas indicadoras de activación celular modifican su expresión en superficie celular hasta con dos logaritmos de diferencia en los estadios tanto pro-inflamatorios como de inmunoparálisis característicos de sepsis, se desconoce si estos mismos marcadores cuentan con el mismo valor al ser analizados en muestras de neonatos sépticos

INTRODUCCION.

Sepsis Neonatal se define como la presencia de SIRS e infección probada durante el primer mes de vida extrauterina (6)

A nivel mundial, la sepsis constituye un problema de salud hospitalaria, con tasas altas reportadas en países en vías de desarrollo, en Asia se han reportado de 7.1 a 38 por 1,000 nacidos vivos, en África de 6.5 a 23 por 1000 nacidos y de 3.5 a 8.9 en Sudamérica y el Caribe. Esto contrasta con lo reportado en Estados Unidos con un rango de 1.5 a 3.5 por 1,000 nacidos vivos para sepsis temprana. (3)

En México se reporta una incidencia de sepsis neonatal de 15 a 30 por cada 1,000 nacidos vivos y en nuestro instituto (INPer) de enero a noviembre del año 2013 se reportaron 155 casos de sepsis neonatal de un total de 3,570 nacidos vivos, con una incidencia de 43.4 por cada 1,000 nacidos vivos; cabe aclarar que al INPer ingresan, en su gran mayoría, pacientes con peso menor a 1,000 gramos y/o con soporte respiratorio

El estándar de oro para diagnosticar sepsis es el hemocultivo, pero su lectura tarda entre 48 y 72 horas, además de que requiere de un volumen mínimo de 9 mililitros para llegar a un diagnóstico fiable (14), por lo que, en el caso de neonatos, se complica aún más tomando en cuenta el peso y talla, así como la cantidad de volumen de sangre que se le puede tomar (máximo 1 mililitro) (15).

La presentación clínica inespecífica y la falta de pruebas de diagnóstico fiables, son las razones por las cuales los médicos tratantes de pacientes con sepsis instauran la terapia antimicrobiana profiláctica a la menor sospecha clínica de infección; el esquema antimicrobiano actualmente recomendado es el combinado, como: penicilina/ampicilina y gentamicina, que hace posible cubrir un amplio espectro de posibilidades

diagnósticas, incluida la infección por Gram negativos y Gram positivos (16) y en casos de sepsis tardía las cefalosporinas de primera y de segunda generación solas pueden usarse en casos de infección (por *E. coli* o *Klebsiella*) (17)

Debido a que las manifestaciones clínicas de la sepsis neonatal son inespecíficas, para poder establecer un diagnóstico oportuno, se han realizado esfuerzos para su detección, estableciendo parámetros paraclínicos como es; el conteo leucocitario, la proteína C reactiva elevada (PCR), incremento de sedimentación globular (VSG), biometría hemática, sin embargo, estos esfuerzos no han podido ayudar al quehacer médico lo suficiente como para establecer un diagnóstico rápido, sensible y específico (18 – 19)

Se han propuesto otros métodos de análisis para el diagnóstico de sepsis y/o síndrome de respuesta inflamatoria sistémica, a través de biomarcadores de superficie celular

TREM-1 (del inglés Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells-1) que es uno de los receptores que potencia la respuesta inflamatoria (20) y que podemos encontrar tanto en forma soluble como en membrana de células mieloides; y se ha propuesto como biomarcador de infección para diferenciar a los pacientes sépticos de aquellos que presentan SIRS (de etiología no infecciosa) (21)

Para el caso de las moléculas de membrana, pueden ser receptores o moléculas necesarias para la activación celular; los receptores pueden estar en diversas células incluyendo a las del sistema inmune innato o adaptativo, y cumplen funciones como potenciación de la inflamación o coestimulación durante la presentación de antígeno.

El estudio de inmunofenotipos como herramienta diagnóstica ha servido para la identificación y cuantificación de distintas poblaciones celulares con base a la

expresión diferencial de marcadores de membrana (22) este tipo de análisis se realiza empleando anticuerpos monoclonales marcados con fluorocromos de diferentes espectros de emisión, lo que hace posible el análisis de estadios de diferenciación y activación celular en diferentes poblaciones.

Las moléculas de membrana, estudiadas durante la sepsis pueden ser HLA-DR; que es una molécula del complejo principal de histocompatibilidad clase II, se sabe que en la sepsis existe una reducción en el porcentaje de células que expresan HLA-DR y correlaciona con un mal pronóstico (23). Entre las células que se sabe disminuyen drásticamente la expresión de HLA-DR en superficie se encuentran los monocitos (24). La expresión en porcentaje de HLA-DR es menor en neonatos que en adultos, y este valor se modifica en procesos patológicos como sepsis, síndrome de estrés respiratorio o asfixia perinatal (25). Por otro lado, la expresión de HLA-DR varía en estados inflamatorios sistémicos no infecciosos como politraumatismos o pancreatitis.

Un receptor que en estudios *in vivo* se ha demostrado amplifica la respuesta inflamatoria es TREM-1 (26 - 27). Esta molécula es una glicoproteína de la familia de las inmunoglobulinas con un dominio extracelular, que se expresa en neutrófilos, monocitos y macrófagos que infiltran tejidos dañados por bacterias. Hay reportes que demuestran que la presencia de bacterias extracelulares incrementa la expresión de TREM-1; y estudios *in vitro* e *in vivo* en los que se observa que el LPS incrementa su expresión (28 - 29). Sin embargo, ensayos posteriores demuestran que TREM-1 está asociado tanto con procesos inflamatorios infecciosos como no infecciosos (30 - 31).

Se ha determinado la expresión de marcadores que podrían ser útiles para la identificación leucocitaria de pacientes con sepsis, por ejemplo; en el neonato sano el 91% de las células $CD3^+CD4^+$ expresan $CD45RA^+$, sin embargo en neonatos con

factores de riesgo para sepsis se ha detectado un incremento de células CD45RO⁺ lo cual sugiere la activación de células (32 - 33). Se ha determinado que el porcentaje de linfocitos T CD45RO⁺ aumentan lentamente desde el nacimiento hasta la edad de 15-16 años alcanzando una proporción del 45% de las células analizadas (34 - 35). En nuestro estudio el marcador CD45RA será utilizado para reconocer células en estado de reposo, mientras que el marcador CD45RO será utilizado para reconocer células activadas o de memoria.

Se ha propuesto que otras moléculas pueden servir como marcadores de activación, por ejemplo CD69, una glicoproteína de 28-34 kD que se expresa tempranamente durante la activación de linfocitos, monocitos y plaquetas (36), hasta el momento se desconoce el papel específico que desarrolla CD69 dentro del proceso de activación celular. En células NK, la expresión de CD69 se propone como un marcador sensible para infección neonatal e incluso se ha propuesto utilizar el panel: CD69, CD45RO/RA, para seguimiento de sepsis neonatal (37).

Los monocitos CD14^{low}CD16^{high} constituyen el 10% del total de monocitos, pero su número se incrementa notablemente en presencia de inflamación, local o sistémica, por lo que se les ha llamado “pro-inflamatorios”, ya que tienen una mayor capacidad para producir TNF- α con una baja producción de IL-10 y una alta expresión de HLA-DR⁺ y de óxido nítrico sintasa (24) . En ellos también se ha reportado la expresión de IREM-2.

El receptor de inmunoglobulina de alta afinidad, CD64, que favorece la fagocitosis; también se incrementa de acuerdo con la severidad de la enfermedad y se ha propuesto como marcadores para diferenciar a las etapas de sepsis con sepsis severa

y choque séptico. Sin embargo, al relacionar los niveles de CD64 en PMN en pacientes sépticos con la cuenta de leucocitos o niveles de proteína C reactiva plasmática, los resultados son sumamente variable, por lo que se sugiere que este marcador se use en conjunto con otros biomarcadores de superficie celular (38).

OBJETIVO GENERAL

Identificar las diferencias fenotípicas y de distribución de leucocitos de sangre de cordón umbilical de pacientes con SIRS y sujetos sanos a través de los marcadores CD45, CD3, HLA-DR, CD14, CD69, CD64, CD16, TREM-1, IREM-2 evaluados por citometría de flujo.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Identificación clínica de pacientes con SIRS y sujetos sanos con base en criterios de inclusión, exclusión o eliminación.
2. Determinar el porcentaje de células positivas para CD45, CD3, HLA-DR, CD14, CD16, CD64, TREM-1, IREM-2 y CD69, en leucocitos de muestras de sangre de cordón umbilical de pacientes con SIRS y sujetos sanos.
3. Determinar la Intensidad Media de Fluorescencia (MFI) de CD45, CD3, HLA-DR, CD14, CD16, CD64, TREM-1, IREM-2 y CD69, en leucocitos de muestras de UCB de pacientes con SIRS y sujetos sanos

HIPOTESIS

Muestras de sangre de cordón umbilical de neonatos con Síndrome de Respuesta Inflamatoria Sistémica y sanos expresarán diferencialmente los marcadores estudiados.

MATERIAL Y METODOS.

El presente estudio se realizó tanto en el Laboratorio de Biología Celular del Instituto Nacional de Perinatología, Isidro Espinosa de los Reyes, con la supervisión del Dr. Arturo Cébulo Vázquez, como en la Unidad de Investigación Médica en Inmunoquímica (UIMIQ) del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) con la supervisión del Dr. Armando Isibasi Araujo y la Dra. Lourdes Andrea Arriaga Pizano.

Tamaño de muestra.

Trece muestras de sangre de cordón umbilical de neonatos sanos con edad gestacional 39.1 ± 1.3 semanas de gestación y 9 muestras de sangre cordón umbilical de pacientes con síndrome de respuesta inflamatoria sistémica con edad gestacional 34.5 ± 4.1 semanas de gestación fueron analizadas.

Método de muestreo.

Los sujetos estudiados fueron aquellos que cumplieron con los criterios de inclusión y que sus padres o tutores aceptaron por medio de una carta de consentimiento informado participar en el proyecto, donando una muestra de sangre cordón umbilical. Se colectaron veintidós muestras de tres ml de sangre de cordón umbilical procedente de neonatos que presentaron o no factores de riesgo en la sala tóco quirúrgica del Instituto Nacional de Perinatología en tubos con EDTA (BD, sistema vacutainer Ref. 367856).

Grupo de estudio.**Sanos.****Criterios de inclusión.**

Madre sana en trabajo de parto, sin comorbilidad y que haya firmado la carta de consentimiento.

Criterios de exclusión

Parto múltiple, alteración genética o cromosómica.

Madres tratadas, en los últimos seis meses con corticosteroides sistémicos.

Madre con antecedentes de toxicomanía.

Madre con comorbilidad.

SIRS**Criterios de inclusión.**

Madre con signos y síntomas clínicos de infección intramniótica.

Madre con ruptura prematura de membrana >18 horas.

Madre diagnosticada con corioamnioitis.

Criterios de exclusión

Recién nacido al cual se le inicie abordaje diagnóstico por sospecha de sepsis neonatal tardía.

Pacientes asfixiados, con síndrome de aspiración de meconio, pacientes con gastrosquisis u onfaloceles, pacientes con sospecha o confirmación de enterocolitis necrosante.

Protocolo de tinción de superficie celular para citometría de flujo.

En tubos de 12 x 75 mm de polipropileno (Cat. 352058) para citometría se realizó la tinción de leucocitos, se usaron anticuerpos monoclonales dirigidos contra moléculas

de superficie en poblaciones leucocitarias de interés presentes en sangre de neonato. Las células se incubaron en 900 mL de solución de lisis (Cloruro de Amonio 16.58g/L, Bicarbonato de Sodio 8.4g/L, EDTA 0.146g/L y agua mili-Q c.b.p. 1mL) por cada 150 mL de sangre (aproximadamente 600 mil células), las muestras fueron homogeneizadas con vórtex durante 3 segundos y se incubaron durante 5 minutos en oscuridad. Al final del tiempo de incubación se agregó 1.0 mL de PBS 1x y se centrifugó a 1500 rpm por 5 minutos. Se decantó el sobrenadante y se resuspendió el botón celular al agregar 150 mL de PBS 1x, esta es la suspensión celular.

Posteriormente las células de neonato fueron incubadas con anticuerpos que reconocen marcadores de superficie a fin de identificar a los linfocitos T ($CD3^+CD45^+$), linfocitos B ($HLA-DR^+CD45^+$ y baja complejidad), monocitos ($CD14^+CD45^+$) así como la caracterización por la expresión diferencial de: $CD69^+$, $TREM-1^+$, $IREM-2^+$, $CD16^+$, $CD64^+$, $HLA-DR^+$.

Se tiñeron 150 μ L de sangre de cordón umbilical (UCB), se agregaron mezclas de anticuerpos, la cantidad agregada se obtuvo al titular cada anticuerpo, la sangre total y la mezcla de anticuerpos se incubaron por 15 minutos a temperatura ambiente en oscuridad, después se agregaron 250 μ L de solución lisis (FACS Lysing Solution, BD Cat. 349202) previamente diluida a 1:10 del STOCK y se incubaron por 10 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Finalmente las células se lavaron por centrifugación agregando 1 mL de Solución Buffer de Fosfatos (PBS) y fueron resuspendidas las células en volumen mínimo residual de 70 μ L.

Adquisición de datos en el citómetro de flujo.

Las muestras se adquirieron en el citómetro FACSAria de BD, se realizó el ajuste de los voltajes usando los parámetros FL1, FL2, FL3, FL4, FL5, FL6, FL7 y FL8 hasta obtener los niveles basales de fluorescencia. Se adquirieron para el análisis hasta 10,000 células por muestra. El análisis de los datos se realizó utilizando el software Infinicyt.

RESULTADOS

Datos descriptivos de la población analizada

Se analizaron 22 muestras de sangre de cordón umbilical, de 13 recién nacidos sanos y 9 de neonatos diagnosticados con Síndrome de Respuesta Inflamatoria Sistémica. Las características clínicas de la población de pacientes seleccionados se muestra en el cuadro 1 en el caso de los neonatos sanos la edad promedio en semanas de gestación fue de 39.1 ± 1.3 SDG. Los recién nacidos fueron sanos al nacimiento y con pesos y talla adecuados para sus edades gestacionales, todas las muestras fueron capturadas al momento del nacimiento. La calificación Apgar al minuto y cinco minutos de vida fueron altas, lo que representa un buen indicador de que las muestras podrían reflejar la proporción de células con inmunofenotipos en condiciones fisiológicas. De la misma manera podemos mencionar que las calificaciones de Silverman reportadas al nacimiento para los recién nacidos son indicativas de que los inmunofenotipos detectados podrían ser los presentes en condiciones fisiológicas. En el caso de los pacientes con SIRS la edad gestacional fue menor edad promedio 34.5 ± 4.1 con peso y talla adecuadas para la edad gestacional, el Apgar al minuto y a los 5 minutos fue menor con respecto a grupo de SIRS y la puntuación de Silverman fue mayor

Análisis del inmunofenotipo celular.

1. Patrones clásicos de tamaño contra complejidad relativa por citometría de flujo.

Las células de sangre fueron colectadas como se describe metodología para ser teñidas y analizadas por citometría de flujo.

La FIGURA 1 expone gráficos de puntos (Dot plots) de complejidad celular (SSC-A Exp) contra tamaño (FSC-A Linear) de muestras de sangre de cordón umbilical, este grafico nos permite distinguir tres poblaciones leucocitarias: poblaciones de bajo tamaño y baja complejidad (linfocitos), mediano tamaño y mediana complejidad (monocitos), poblaciones de mayor tamaño y mayor complejidad (granulocitos) tanto en neonatos sanos(A) como de neonatos con SIRS (B).

2. Definición de leucocitos totales.

La figura 2 muestra las imágenes representativas que sirvieron para definir leucocitos totales de muestras de sangre de cordón umbilical, donde se logro identificar leucocitos de forma simultanea a partir de 6 parametros.

La estrategia de análisis para cada unos de los sujetos estudiados fue la misma, donde se utilizaron 3 gráficos de puntos:

Grafico 1, FS-tamaño área (FSC-A) contra FS-tamaño altura (FSC- H), lo que permite distinguir eventos agregados y eventos que fueron adquiridos de forma individual (singletes) por el citómetro.

Grafico 2, Complejidad celular (SSC-A Exp) contra tamaño (FSC-A Linear) que permite seleccionar eventos viables de tamaño contra complejidad.

Grafico 3, Complejidad celular (SSC-A) contra CD45, permite distinguir leucocitos de eritrocitos, al ser CD45 el antígeno común leucocitario.

3. Estrategia de análisis para la definición de sub poblaciones leucocitarias

Ya definida las poblaciones celulares positivas para CD45, se procedió a la identificación de A) linfocitos, B) monocitos y C) granulocitos; a partir de patrones de tamaño contra tamaño, tamaño contra complejidad relativa, así como la utilización de marcadores de identificación (CD3, CD56) como se muestra en la FIGURA 3

Como podemos observar en la GRAFICA 1 hay una menor proporción de linfocitos en neonatos con SIRS comparados con los neonatos sanos; en monocitos se puede observar que hay una mayor proporción en muestras de neonatos con SIRS, sin embargo en granulocitos no se observan diferencias significativas.

Una vez identificadas las poblaciones de leucocitos (linfocitos, monocitos y granulocitos), se procedió a la clasificación de linfocitos, utilizando marcadores de identificación (CD3, HLA-DR), como se puede observar en la FIGURA 4 para la definición de linfocitos T y linfocitos B.

A células de menor tamaño y complejidad que resultaran ser positivas para CD3⁺, negativas para CD56⁻, CD16⁻ y CD14⁻ se clasificaron como linfocitos T; a células fueran negativas para CD3⁻, CD16⁻, y CD56⁻, pero positivas para HLA-DR⁺, se definieron como linfocitos B.

La GRAFICA 2 resume los resultados encontrados con respecto al porcentaje y el nivel de expresión (MFIs) de los poblaciones celulares analizadas en sangre de cordón umbilical de A) neonatos sanos y B) con Síndrome de respuesta inflamatoria sistémica. Los resultados obtenidos mostraron un aumento en el nivel de expresión de células CD3⁺ en muestras de pacientes con Síndrome de Respuesta Inflamatoria Sistémica .

La proporción de linfocitos B es mayor en neonatos con SIRS que en neonatos sanos, no se observan diferencias significativas en el nivel de expresión de HLA-DR , y en la proporción de linfocitos T.

Una vez que las poblaciones celulares linfoides y mieloides fueron definidas en muestras de sangre de cordón umbilical, el siguiente objetivo fue analizar la proporción y el nivel de expresión de marcadores de activación en las diferentes poblaciones celulares a analizar. Para el análisis de los marcadores se generaron dos estrategias;

a) analizar la proporción y nivel de expresión de marcadores de activación de linfocitos T y B en las muestras sangre de cordón umbilical de neonatos sanos y con SIRS como es en el caso del marcador CD69, y b) para el caso de monocitos los marcadores analizados fueron: HLA-DR, TREM-1, IREM-2, CD16 y CD64

Caracterización de células linfoides CD69⁺ en muestras de sangre de cordón umbilical.

La Figura 5 muestra imágenes representativas de la expresión de CD69⁺ en células T y B de muestras de sangre de cordón umbilical de neonatos sanos y con SIRS, estos resultados muestran una clara expresión de células CD69 en muestras de neonatos con SIRS para linfocitos T y B.

CD69 es un marcador de activación temprana, que como podemos apreciar en la grafica 3 se expresa en mayor proporción en linfocitos de pacientes con SIRS, comparados con la proporción de linfocitos de neonatos sanos.

Caracterización de células mieloides para marcadores de activación IREM-2⁺, TREM-1⁺, HLA-DR⁺, CD64⁺, CD16⁺ en muestras de sangre de cordón umbilical.

En la figura 6 se muestran imágenes representativas de los marcadores TREM-1⁺, IREM-2⁺, HLA-DR⁺, CD64⁺ y CD16⁺ expresados en monocitos (CD45⁺CD14⁺) de sangre de cordón umbilical de neonatos sanos (A) y de neonatos con diagnóstico de SIRS (B)

El valor promedio y las desviaciones estándar de las proporciones e intensidad media de la fluorescencia de células positivas para los marcadores de caracterización propuestos en el panel son mostrados en la grafica 4

En estas graficas se puede observar que la expresión de IREM-2 en monocitos de sangre de cordón umbilical de neonatos sanos es mayor que en neonato con SIRS, sin embargo no muestra diferencia significativas en cuanto a la intensidad media de la fluorescencia. El porcentaje de expresión de TREM-1 y HLA-DR muestra diferencias significativas entre los grupos analizados, con una mayor proporción en el grupo de neonatos con SIRS.

DISCUSION.

Aunque existen diferentes estrategias que tratan de mejorar el manejo de sepsis, lo cierto es que todavía no se cuenta con una herramienta de laboratorio que valore más de cinco parámetros de forma simultánea y que sea útil para la rápida toma de decisiones (aproximadamente 2 horas) en el manejo de pacientes con SIRS/sepsis. Por lo que pretendemos es entonces generar un panel diagnóstico que ayude a diferenciar e identificar con certeza pacientes que estén cursando un cuadro de síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS) y pacientes con sepsis neonatal basado en citometría de flujo, de fácil interpretación, rápido en su realización (2 horas), con un volumen mínimo de muestra (150 μ L de sangre de cordón umbilical) que iguale el valor predictivo positivo del abordaje diagnóstico en el Instituto Nacional de Perinatología.

Para cumplir nuestro objetivo, se identificó clínicamente pacientes neonatos con signos clínicos de Síndrome de Respuesta Inflamatoria Sistémica o con sospecha de sepsis temprana, se determinó la presencia de linfocitos T y B, así como de monocitos y polimorfonucleares por citometría de flujo.

En el presente trabajo se caracterizó poblaciones monocíticas a través de la expresión de moléculas de activación celular: TREM-1, HLA-DR, IREM-2, CD16, CD64, CD69. Se sabe que estas moléculas indicadoras de activación celular modifican su expresión en superficie celular hasta con dos logaritmos de diferencia en los estadios tanto pro-inflamatorios como de inmunoparálisis característicos de sepsis de adultos, aunque se desconoce si estos mismos marcadores cuentan con el mismo valor al ser analizados en muestras de neonatos sépticos.

Hasta el momento para el manejo de sepsis no se cuenta con una herramienta de laboratorio que sea útil para la toma rápida de decisiones en el manejo de pacientes (después de 2 horas de tomada la muestra), el contar con herramientas diagnósticas para SIRS, de alto valor pronóstico y/o diagnóstico, “temprano y oportuno”, basados en citometría de flujo, permitirá que el análisis de paneles y no de marcadores únicos se puedan implementar para su uso en centros de segundo y tercer nivel de atención, ya que en varios de estos centros de atención se cuenta con citómetros de flujo en los laboratorios clínicos.

Adicionalmente, la citometría de flujo permite la obtención de múltiples datos respecto a las células que expresan los marcadores de activación y las modificaciones en la expresión de los mismos a partir de un volumen pequeño de muestra (0.25 de sangre total) en un corto tiempo (dos horas a partir de la recepción de la muestra para los marcadores de superficie).

Una vez identificados los paneles de utilidad, la técnica podrá adaptarse para poder ser utilizada con citómetros de flujo, como los que se encuentran en los laboratorios clínicos de segundo nivel de atención, lo que deja accesible estos paneles a un gran número de médicos tratantes de pacientes con sepsis neonatal.

CONCLUSIONES

1. Leucocitos de sangre de cordón umbilical de sujetos sanos y pacientes con SIRS NO presentan diferencias mayores en los patrones de tamaño contra complejidad clásicos por citometría.
2. Los porcentajes de linfocitos y monocitos analizados por citometría de flujo podrían ser de utilidad para diferenciar muestras de neonatos sanos de las de pacientes con SIRS.
3. El porcentaje y valor MFI para CD69 en linfocitos T y B es un marcador útil para diferenciar entre muestras de sujetos sanos de las de muestras de casos.
4. El porcentaje de TREM-1 y HLA-DR, así como el valor MFI para CD64 en monocitos es de utilidad para diferenciar entre muestras de sujetos sanos de las de muestras de casos.

REFERENCIAS

1. Pérez-González LF, Ruiz-González JM, Noyola DE Nosocomial bacteremia in children: a 15-year experience at a general hospital in México.. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2007 Apr;28(4):418-22
2. Moreno MT, Vargas S, Poveda R, Sáez-Llorens X. Neonatal sepsis and meningitis in a developing Latin American Country. *Pediatr Infect Dis J* 1994; 13: 516-20.
3. Rodríguez MA, and cols. Morbilidad y mortalidad por sepsis neonatal en un hospital de tercer nivel de atención. *Salud Publica de Mexico* 2003 Marzo – Abril; 45(2) 90 - 95
4. J S Remington, JO Klein. *Infectious Diseases of the fetus and newborn infant.* Forth edition 2005. ISBN: 0721605370, ISBN-13: 9780721605371, 978-0721605371. W.b. Saunders Company
5. Instituto Nacional de Perinatología. Normas y procedimientos de Neonatología 2009. Capítulo VIII Problemas infecciosos.
6. Goldstein G; Brett G; and cols. International pediatric sepsis consensus conference: Definitions for sepsis and organ dysfunction in pediatrics. *Pediatr Crit Care Med* 2005; 6 (1) 2 – 7.
7. Wong-Baeza I, et al. Triggering receptor expressed on myeloid cells (TREM-1) is regulated post-transcriptionally and its ligand is present in the sera of some septic patients. *Clin Exp Immunol.* 2006 Sep;145(3):448-55
8. González-Roldán N et al. Expression of triggering receptor on myeloid cell 1 and histocompatibility complex molecules in sepsis and major abdominal surgery. *World J Gastroenterol.* 2005 Dec 21;11(47):7473-9
9. Cohen J, The immunopathogenesis of sepsis, *Nature* 2002; 420. 885-91

10. Davies MG, Hagen PO. Systemic inflammatory response syndrome. *Br J Surg* 1997; 84:920–35.
11. Bone RC. Sir Isaac Newton, sepsis, SIRS, and CARS. *Crit Care Med*. 1996; 24:1125–8.
12. Weigand MA, Horner C, Bardenheuer HJ, Bouchon A. The systemic inflammatory response syndrome. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol* 2004; 18:455–75.
13. Cavaillon JM. Pro- versus anti-inflammatory cytokines: myth or reality. *Cell Mol Biol* 2001; 47:695–702.
14. How Reliable Is a Negative Blood Culture Result? Volume of Blood Submitted for Culture in Routine Practice in a Children's Hospital. Connell T, Rele M, Cowley D, BATTERY JP and Curtis N. *Pediatrics*, 2007, 119 (5):891-896
15. Mishra UK; Jacobs SE. Never approaches to the diagnosis of early onset neonatal sepsis. *Arch Dis Child Fetal Neonatal*. 2006; 91:F208–F212.
16. Simon C, Schroder H, Beyer C, Zerbst T. Neonatal sepsis in a intensive care unit and results of treatment. *Infection* 1991 May-Jun 19 (39: 146-9
17. Philip AGS. The changing face of neonatal infection experience at a regional medical center. *Pediatr Infect Dis J* 1994 13: 1098-1102.
18. Pruebas diagnósticas: uso e interpretación, Jaimes F. *Acta Med Colomb* 2007; 32: 29-33
19. Edmond K, Zaidi A (2010) New Approaches to Preventing, Diagnosing, and Treating Neonatal Sepsis. *PLoS Med* 7(3): e1000213
20. Ratei R et al, Normal lymphocytes from leukemic samples as an internal quality control for Ratei R fluorescence intensity in immunophenotyping of acute leukemias. *Cytometry B Clin Cytom*. 2006 Jan;70(1):1-9

21. Vidriales MB, Orfao A, San Miguel JF Immunologic monitoring in adults with acute lymphoblastic leukemia. *Curr Oncol Rep.* 2003 Sep;5(5):413-8.
22. Dorado Moles MJ, Figueredo Delgado MA, Fernández Pérez C, Moro Serrano M. T lymphocyte immunophenotype as a diagnostic marker of late-onset neonatal sepsis. *An Pediatr (Barc).* 2007 Dec;67(6):536-43.
23. Marshall JC et al. Biomarkers of sepsis. *Crit Care Med.* 2009; 37(7):2290-8.
24. Docke WD, Randow F, Syrbe U et al. Monocyte deactivation in septic patients: restoration by IFN-gamma treatment. *Nat Med* 1997; 3:678–81.
25. Orfao A et al. Clinically useful information provided by the flow cytometric immunophenotyping of hematological malignancies: current status and future directions. *Clin Chem.* 1999 Oct;45(10):1708-17
26. Sánchez-Madrid F. Overview of CD69. En: Schlossman S, L Bloumsell, W Gilkis et al. *Leukocyte typing V: White Cell Differentiation Antigens.* Oxford University Press, New York. Eds 1995: 1123-1129
27. Trowbridge IS. Overview of CD71. En: Schlossman S, L Bloumsell, W Gilkis et al. *Leukocyte typing V: White Cell Differentiation Antigens.* Oxford University Press, New York. 1995: 1139-41
28. Hodge G, Hodge S, Han P, Haslam R. Multiple leucocyte activation markers to detect neonatal infection. *Clin Exp Immunol.* 2004 Jan;135(1):125-9.
29. Bleharski JR, Kiessler V, Buonsanti C et al. A role for triggering receptor expressed on myeloid cells-1 in host defense during the early-induced and adaptive phases of the immune response. *J Immunol* 2003; 170:3812–8.

30. Bouchon A, Dietrich J, Colonna M. Cutting edge: inflammatory responses can be triggered by TREM-1, a novel receptor expressed on neutrophils and monocytes. *J Immunol* 2000; 164:4991–5.
31. Bouchon A, Facchetti F, Weigand MA, Colonna M. TREM-1 amplifies inflammation and is a crucial mediator of septic shock. *Nature* 2001; 410:1103–7.
32. Rothstein DM, Yamada A, Schlossman SF, Morimoto C. Cyclic Regulation of CD45 isoform expression in a long term human CD4+ CD45RA+ T cell line. *J immunol* 1990; 146: 1175-83.
33. Rothstein DM, Sozen S, Daley JF, Schlossman SF, Morimoto C. CD4+ CD45RA+ and CD4+ CD45RA- T cell subsets in man maintain distinct function and CD45RA expression persists on a subpopulation of CD45RA+ cell after activation with Con A. *Cell immunol* 1990; 129: 449-67.
34. Bell EB, Sparshott SM. Interconversion of CD45R subsets of CD4 T cell in vivo. *Nature* 1990; 348: 163-66.
35. Pinto L, Covas MJ, Victoriano RM. Loss of CD45RA and gain of CD45RO after in vitro activation of lymphocytes from HIV-infected patients. *Immunol* 1991; 73: 147-50
36. Juretic E, Juretic A, Uzarevic B, Petroveckii M. Alterations in lymphocyte phenotype of infected preterm newborns. *Biol Neonate* 2001;80(3):223-7
37. Michie C, Harvey D. Can expression of CD45RO, a T-cell surface molecule be used to detect congenital infection? *Lancet* 1994; 21; 343 (8908): 1250-60.
38. Spittler A, Razenberger M, Kupper H, Kaul M, Hackl W, Boltz-Nitulescu G, Függer R, Roth E. Relationship between interleukin-6 plasma concentration in patients with sepsis, monocyte phenotype, monocyte phagocytic properties and cytokine production. *Clin Infect Dis*. 2000 Dec;31(6):1338-42. Epub 2000 Nov 22

APÉNDICE 1. CUADROS Y FIGURAS

Cuadro 1. Datos somatométricos de la población en estudio Promedio \pm DE		
Variable	Sanos	SIRS
GENERO M/F	M (7) , F (6)	M (6) , F (3)
Edad gestacional (SDG)	39.1 \pm 1.3	34.5 \pm 4.1
Peso (g)	2911.3 \pm 458.2	1833.6 \pm 957.6
Talla(cm)	48.7 \pm 2.4	43.1 \pm 5.6
APGAR (minuto 1)	8	6
APGAR (minuto 5)	9	8
SILVERMAN	2	3

FIGURA 1

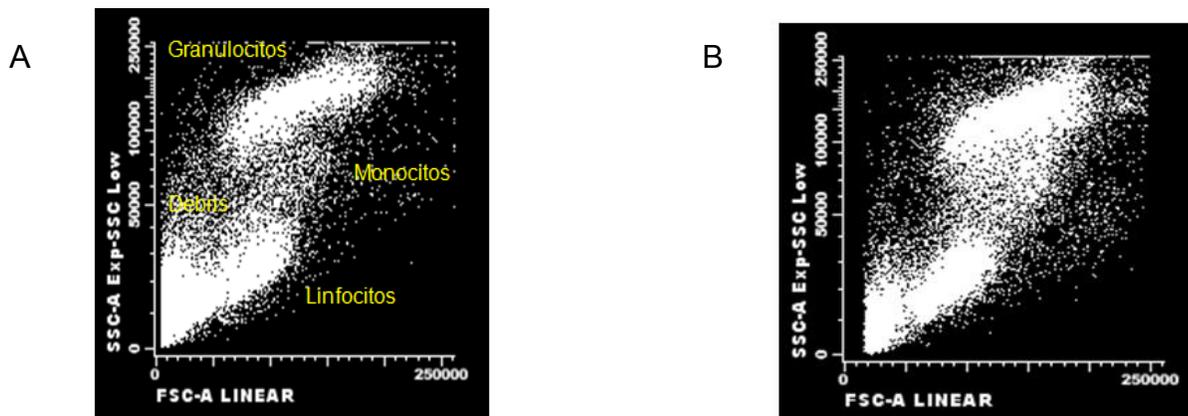


Figura 1. Patrones clásicos de tamaño contra complejidad de muestras de sangre de cordón umbilical de A) neonatos sanos y B) neonatos con SIRS

FIGURA 2

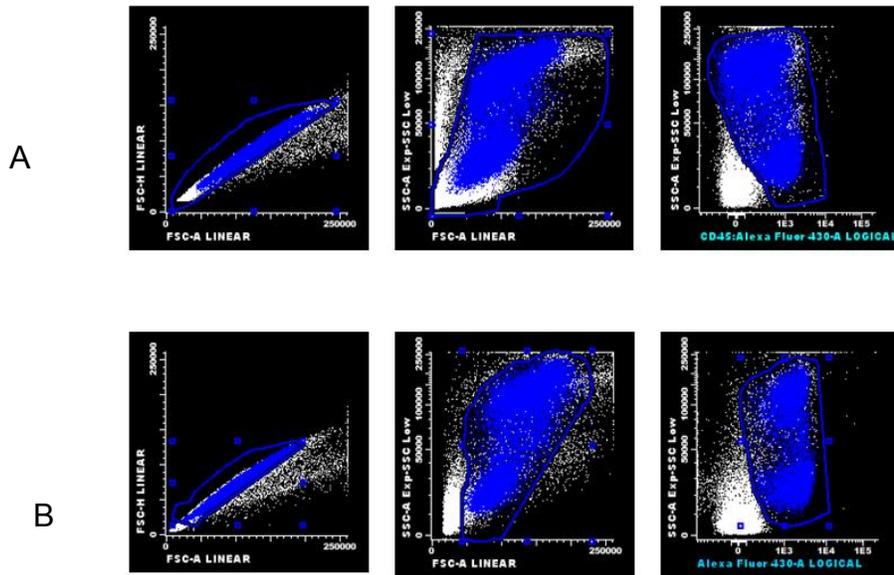


Figura 2. Definición de leucocitos totales en muestras de UCB de A) neonatos sanos y con B) SIRS, en esta figura se pueden visualizar patrones de distribución leucocitaria ,discriminación de debris que se hace de manera simultánea a partir de 6 parámetros (FSC-A, FSC- H, SC-A Exp, FSC-A Linear, CD45).

FIGURA 3

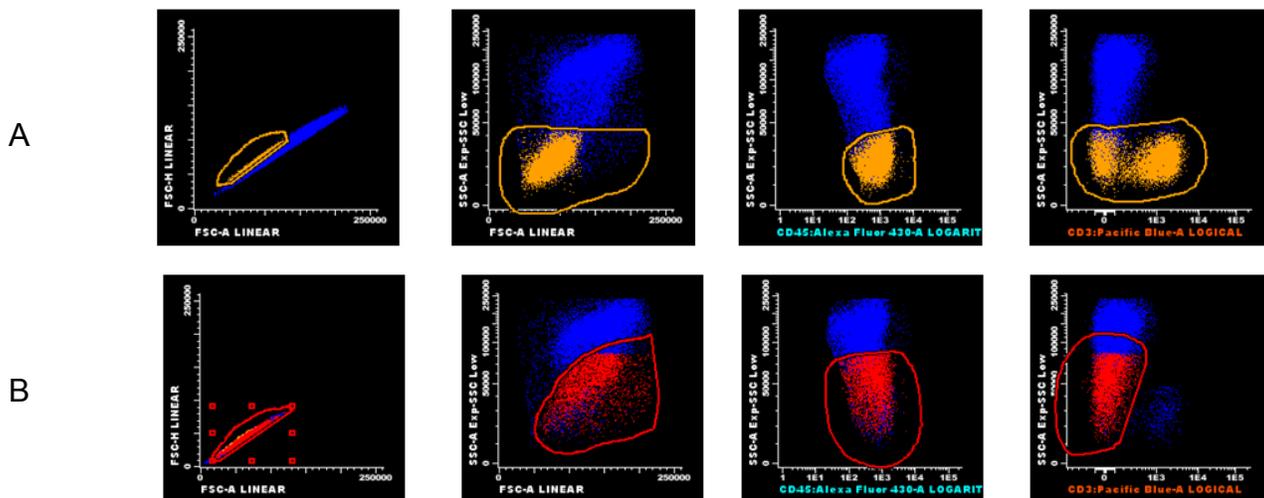


Figura 3. Definición y clasificación de poblaciones leucocitarias. A) Definición de Linfocitos, se selecciono poblaciones de baja complejidad y tamaño, así como células positivas y negativas para CD3.

B). Definición de monocitos, se selecciono poblaciones celulares de mediana complejidad y mediano tamaño, negativos para CD3

FIGURA 4

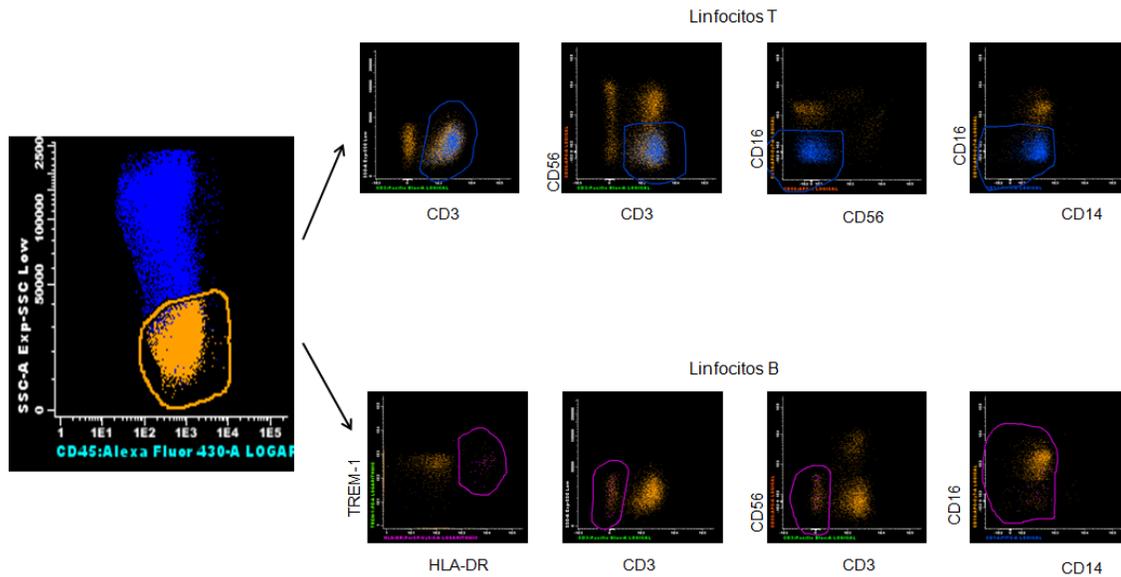


Figura 4 Estrategia de análisis para la definición de subpoblaciones linfocitarias

FIGURA 5

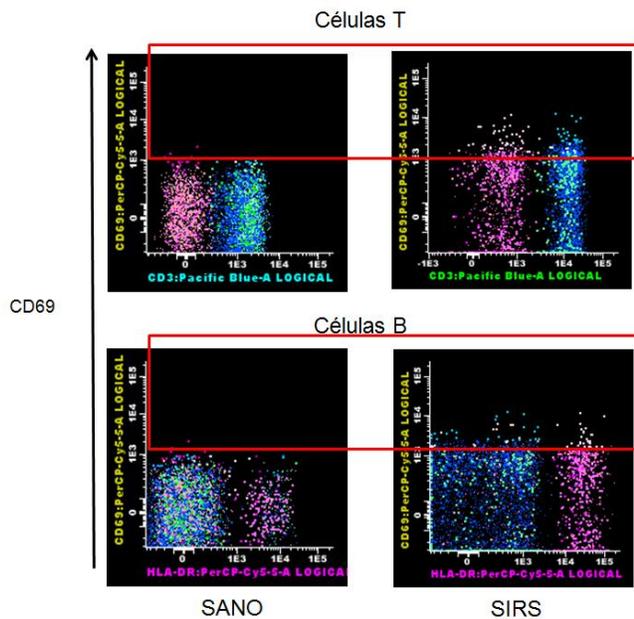


Figura 5. Caracterización de linfocitos CD69+ en Sangre de Cordón Umbilical (UCB). Imágenes representativas de la proporción de linfocitos T y B positivos para CD69 en UCB de sujetos sanos y SIRS.

FIGURA 6

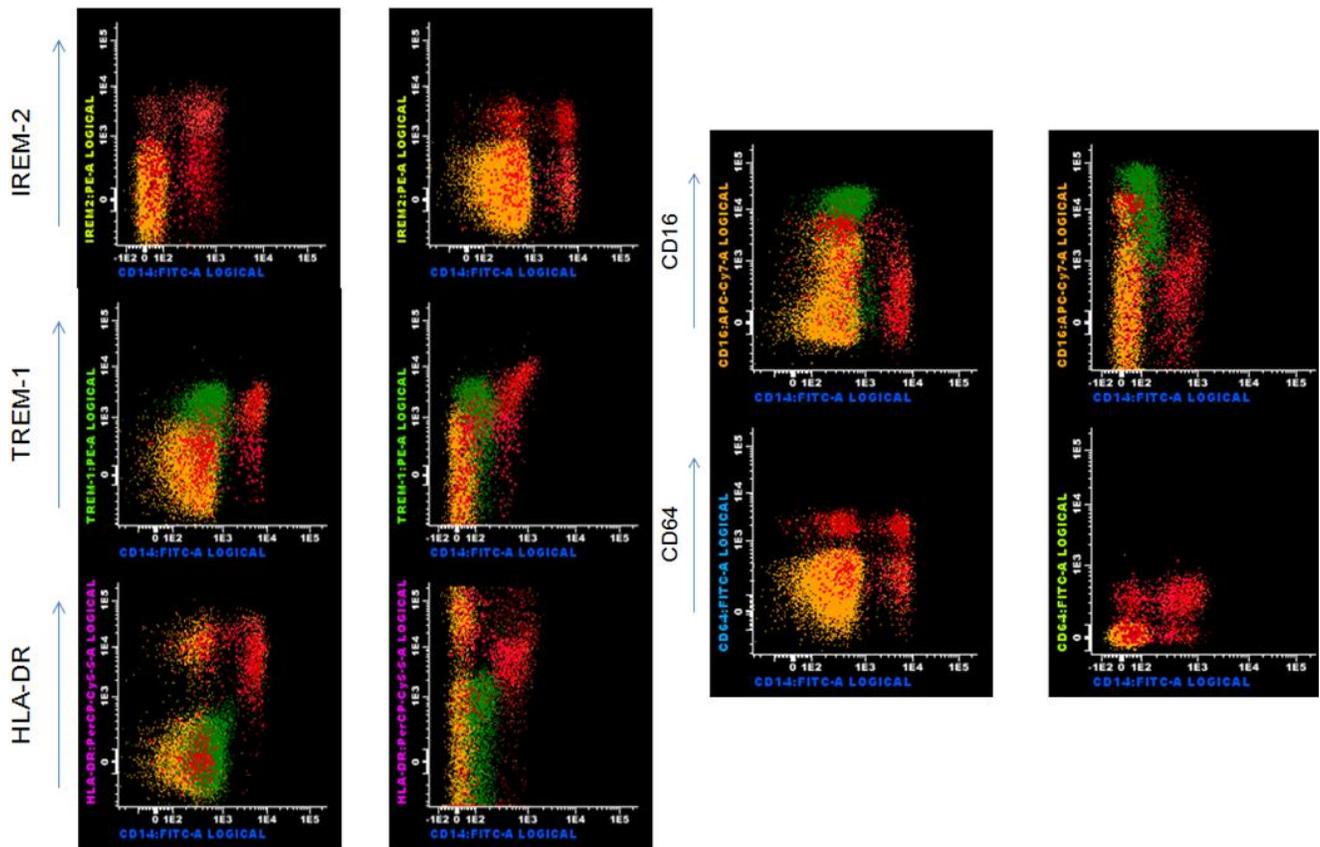
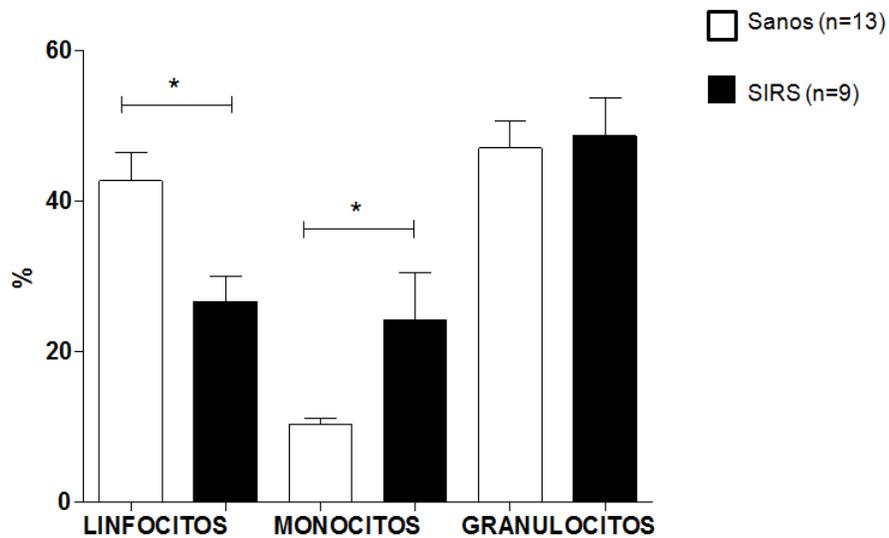


Figura 6 Proporción de monocitos en sangre de cordón umbilical (UCB) de sujetos A) sanos y con B) SIRS

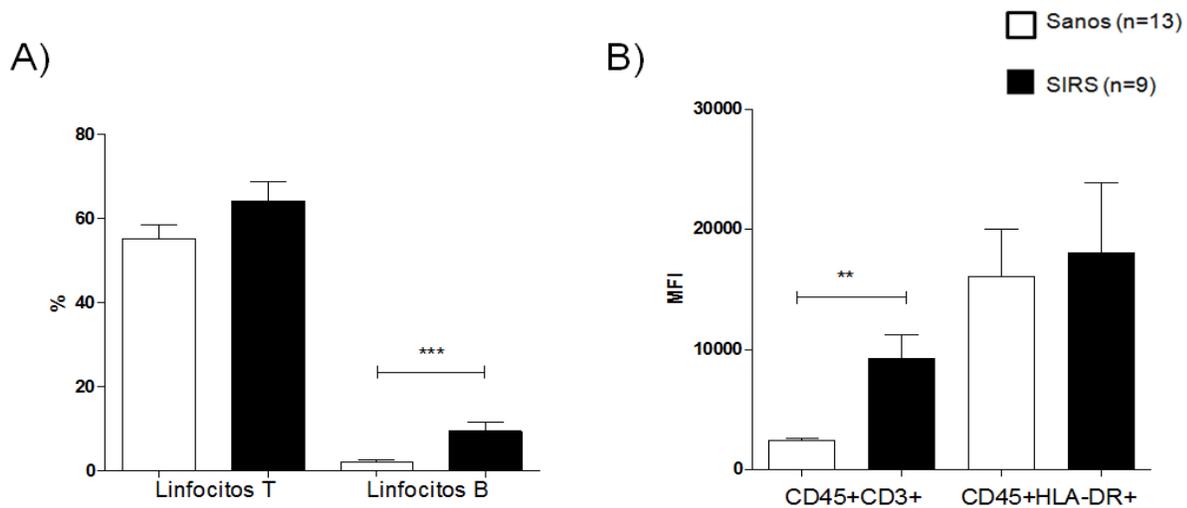
APÉNDICE 2. GRÁFICAS.

GRÁFICA 1



Grafica 1. Proporción leucocitaria. Se muestra el valor promedio y error estándar de los porcentajes de las poblaciones leucocitarias (linfocitos, monocitos y granulocitos), de muestras de sangre de cordón umbilical de sujetos sanos y con SIRS. $P < 0.05$, * $P = 0.0135$, * $P = 0.0101$, U de Mann Whitney.

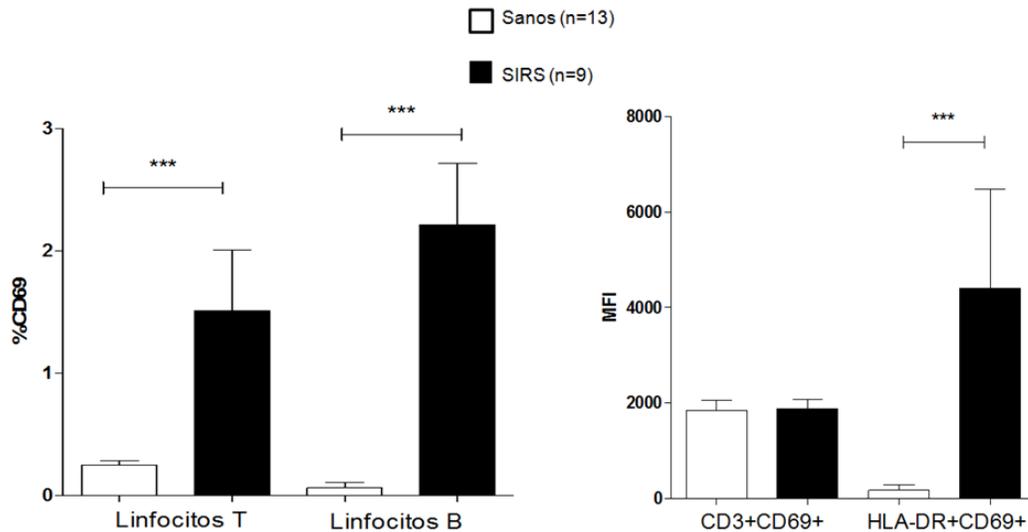
GRÁFICA 2



Grafica 2. Porcentaje e MFI de linfocitos de sangre de cordón umbilical. Porcentaje e MFI de linfocitos de sangre de cordón umbilical.

Se muestra el valor promedio y error estándar de las proporciones e intensidades media de la fluorescencia de los linfocitos T y B de muestras de sangre de cordón umbilical de neonatos sanos y con Síndrome de Respuesta Inflamatoria Sistémica. A) $P < 0.05$: *** $P < 0.0009$ B) ** $P < 0.0062$ U de Mann Whitney

GRÁFICA 3



Grafica 3 Proporción e Intensidad Media de la Fluorescencia (MFI) de linfocitos T y B. Se muestra el valor promedio y error estándar de las (a) proporciones y (b) MFI para los marcadores CD69 de muestras de sangre de cordón umbilical de sujetos sanos y con SIRS. Prueba de U de Mann Whitney. *** $p < 0.05$

GRÁFICA 4

