



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

**“Comparación del inmunofenotipo de activación y
frecuencias de leucocitos circulantes de pacientes
adultos y neonatos con sepsis”**

TESIS
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA:
Patricia Esther Miranda Cruz



MÉXICO, D.F. 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: **Profesor: Rodolfo Pastelin Palacios**
VOCAL: **Profesor: Saturnino De León Chapa**
SECRETARIO: **Profesor: Lourdes Andrea Arriaga Pizano**
1° SUPLENTE: **Profesor: Mónica Berenice Heras Chavarría**
2° SUPLENTE: **Profesor: Sonia Mayra Pérez Tapia**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Unidad de Investigación Médica en Inmunoquímica del Hospital de Especialidades de Centro Médico Nacional Siglo XXI del IMSS

ASESOR DEL TEMA: **Dra. Lourdes Andrea Arriaga Pizano**

(Nombre y Firma)

SUPERVISOR TÉCNICO: **M. en C. Luis Angel Flores Mejía**

(Nombre y Firma)

SUSTENTANTE: **Patricia Esther Miranda Cruz**

(Nombre y Firma)

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS	iii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	iv
ABREVIATURAS	v
RESUMEN.....	vii
INTRODUCCIÓN.....	1
<i>Inflamación</i>	1
<i>SIRS/sepsis en adultos y neonatos</i>	2
<i>Respuesta inmune de adultos</i>	3
<i>Respuesta inmune de neonatos</i>	5
<i>Inmunopatología de sepsis</i>	7
<i>Diagnóstico en SIRS/Sepsis</i>	9
<i>Biomarcadores y Sepsis</i>	10
JUSTIFICACIÓN.....	14
PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	14
HIPÓTESIS.....	14
OBJETIVO GENERAL	14
OBJETIVOS PARTICULARES.....	15
MATERIAL Y MÉTODOS.....	15
<i>Diseño del estudio</i>	15
<i>Universo de trabajo</i>	15
<i>Criterios de Inclusión</i>	16
<i>Criterios de Exclusión</i>	16
<i>Criterios de Eliminación</i>	17
<i>Aspectos éticos</i>	18
<i>Recolección de las muestras</i>	18
<i>Recolección de datos clínicos</i>	19
<i>Inmunofenotipificación de leucocitos de sangre periférica mediante citometría de flujo</i>	19
<i>Análisis estadístico</i>	22
RESULTADOS.....	22
<i>Caracterización de poblaciones leucocitarias</i>	24

Evaluación de los marcadores de activación en células mieloides de sangre periférica y de cordón umbilical..... 33

Asociación de los cambios en la expresión de marcadores de superficie en leucocitos de sangre periférica de los pacientes con sepsis 44

DISCUSIÓN..... 45

CONCLUSIÓN 51

REFERENCIAS 52

ANEXO 1..... 59

ANEXO 2..... 64

ANEXO 3..... 69

ANEXO 4..... 70

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Distribución de leucocitos en diferentes tipos de muestras sanguíneas.....	6
Tabla 2. Relación de anticuerpos utilizados para evaluar los marcadores de identificación y caracterización de leucocitos circulantes en pacientes neonatos	20
Tabla 3. Relación de anticuerpos utilizados para evaluar los marcadores de identificación y caracterización de leucocitos circulantes en pacientes adultos	21
Tabla 4. Marcadores para la identificación y caracterización de células mieloides	21
Tabla 5. Características demográficas y clínicas de los sujetos incluidos en el estudio	23
Tabla 6. Resultados de Biometría Hemática de los sujetos incluidos en el estudio	24

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Elementos participantes en la respuesta inmune innata	4
Figura 2. Estrategia de análisis para la identificación de leucocitos circulantes	25
Figura 3. En pacientes con sepsis, tanto en adultos como neonatos, se modifica la distribución clásica de leucocitos por tamaño y complejidad.....	26
Figura 4. Algoritmo para la identificación y caracterización de monocitos.....	27
Figura 5. Algoritmo para la identificación y caracterización de granulocitos.....	28
Figura 6. En los pacientes con sepsis neonatos, pero no en los adultos, aumenta la proporción de monocitos y disminuye la de granulocitos	31
Figura 7. En neonatos con sepsis se incrementa el número absoluto de monocitos	32
Figura 8. La expresión de HLA-DR en monocitos de pacientes neonatos con sepsis disminuye pero no se modifica en adultos.....	35
Figura 9. La expresión de TREM-1 en monocitos de neonatos con sepsis es significativamente menor que en adultos con sepsis.....	36
Figura 10. La expresión de CD64 en monocitos disminuye en pacientes neonatos sépticos	37
Figura 11. La expresión de CD69 disminuye en monocitos de neonatos con sepsis	38
Figura 12. La expresión de TREM-1 se incrementa en granulocitos de adultos con sepsis y disminuye en pacientes neonatos.....	41
Figura 13. La expresión de CD64 disminuye en granulocitos de pacientes neonatos con sepsis	42
Figura 14. En neonatos con sepsis aumenta la proporción de granulocitos CD69+, aunque su expresión relativa disminuye respecto a sanos	43
Figura 15. La expresión de CD69 correlaciona directamente con la de TREM-1 en la superficie de monocitos de adultos sépticos	44
Figura 16. La expresión de CD69 correlaciona directamente con la de TREM-1 en la superficie de granulocitos de adultos sépticos	45

ABREVIATURAS

ACCP	American College of Clinical Pharmacy
APACHE	Acute Physiology and Chronic Health Evaluation
APC	Antigen Presenting Cell (Célula Presentadora del Antígeno)
APC	Allophycocyanin (Aloficocianina)
ATP	Adenosín Trifosfato
CARS	Compensatory Anti-inflammatory Response Syndrome (Síndrome de Respuesta Anti-inflamatoria Compensatoria)
CCR7	C-C Chemokine Receptor 7 (Receptor de Quimiocinas C-C tipo 7)
CD	Cluster of Differentiation
CLP	Cecal Ligation and Puncture (Ligadura y Punción Cecal)
CR3	Complement Receptor 3 (Receptor de Complemento tipo 3)
CRP	C- Reactive Protein (Proteína C Reactiva)
DAMP	Damage Associated Molecular Pattern (Patrón Molecular Asociado a Daño)
DNA	Deoxyribonucleic Acid (Ácido Desoxirribonucleico)
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid (Ácido Etilendiaminotetraacético)
EOS	Early Onset Sepsis (Sepsis Neonatal Temprana)
FC	Frecuencia Cardíaca
FcR	Fc Receptor (Receptor para la Fracción Cristalizable)
FITC	Fluorescein Isothiocyanate (Isotiocianato de Fluoresceína)
FR	Frecuencia Respiratoria
FSC	Forward Scatter
GM-CSF	Granulocyte Monocyte Colony Stimulating Factor (Factor Estimulante de las Colonias de Granulocitos y Monocitos)
CFU-GM	Colony Forming Unit for Granulocyte and Monocyte (Unidad Formadora de Colonias de Granulocitos y Monocitos)
G-CSF	Granulocyte Colony Stimulating Factor (Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos)
HLA	Human Leucocyte Antigen (Antígeno Leucocitario Humano)
HMGB-1	High Mobility Group Box 1
HSP	Heat Shock Protein
ICAM-1	Intercellular Adhesion Molecule 1 (Molécula de Adhesión Intercelular tipo 1)
IFN	Interferón
IL	Interleucina
IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social
LOS	Late Onset Sepsis (Sepsis Neonatal Tardía)
LPS	Lipopolisacárido

MHC	Mayor Histocompatibility Complex (Complejo Principal de Histocompatibilidad)
MIF	Macrophage Migration Inhibitory Factor
NK	Natural Killer
PAI	Plasminogen Activator Inhibitor (Inhibidor del Activador del Plasminógeno)
PAM	Presión Arterial Media
PAMP	Patogen Associated Molecular Pattern (Patrón Molecular Asociado a Patógeno)
PBS	Phosphate Buffer Solution (Solución Amortiguadora de Fosfatos)
PCT	Procalcitonina
PE	Phycoerythrin (Ficoeritrina)
PMA	Phorbol Myristate Acetate (Acetato de Forbol Miristato)
PRR	Pattern Recognition Receptor (Receptor de Reconocimiento de Patrón)
RNA	Ribonucleic Acid (Ácido Ribonucleico)
ROS	Reactive Oxygen Species (Especies Reactivas del Oxígeno)
SAPS	Simplified Acute Physiology Score
SIRS	Systemic Inflammatory Response Syndrome (Síndrome de Respuesta Inflamatoria Sistémica)
SOFA	Sequential Organ Failure Assessement
SSC	Side Scatter
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription
sTREM-1	Soluble Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells-1
TCR	T-cell Receptor (Receptor de linfocitos T)
TGF- β	Tumoral Growth Factor beta (Factor de Crecimiento Tumoral beta)
TNF- α	Tumor Necrosis Factor alpha (Factor de Necrosis Tumoral alfa)
TORCHs	Toxoplasmosis, Otros, Rubéola, Citomegalovirus y Herpes
t-PA	Tissue Plasminogen Activator (Activador Tisular del Plasminógeno)
TREM-1	Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells-1
UCI	Unidad de Cuidados Intensivos
UCIN	Unidad de Cuidado Intensivo Neonatal
UCIREN	Unidad de Cuidado Intensivo del Recién Nacido
VIH	Virus de Inmunodeficiencia Humana

RESUMEN

La sepsis se define como el síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS) asociado a un foco infeccioso. A nivel mundial, la sepsis constituye una de las primeras causas de morbi-mortalidad hospitalaria. En México, en 2009 la incidencia de sepsis en adultos fue de 27.3%, con una tasa de mortalidad del 30.4%; en el caso de sepsis neonatal, se informan tasas de 15 a 30 por cada 1,000 recién nacidos con una letalidad de entre el 25 al 30%. El éxito del tratamiento depende de la oportunidad y especificidad del mismo, tanto en sepsis en adultos como neonatal. Este tratamiento requiere no sólo de implementar antibióticos, sino también de poder controlar eficientemente la respuesta inflamatoria. En SIRS/sepsis se propone que hay una fase inflamatoria (con elevación de TNF- α , IL-1, IL-6 e IL-8); y una anti-inflamatoria (con incremento de IL-10 y TGF- β) que puede predisponer a los pacientes a infecciones agregadas.

Además de la concentración sérica de proteína C reactiva, procalcitonina, IL-6 y otras citocinas, algunos cambios en los leucocitos, como la detección de CD64 en neutrófilos, se han propuesto como biomarcadores auxiliares en el diagnóstico y/o pronóstico de SIRS/sepsis; ya que las manifestaciones clínicas son prácticamente las mismas entre las fases pro y anti-inflamatorias e incluso entre sólo SIRS y sepsis, si la evidencia de infección no es franca. Basados en la evidencia que la determinación conjunta de marcadores aumenta el poder pronóstico de la enfermedad, recientemente evaluamos, por citometría de flujo multiparamétrica, un “panel biomarcador” que nos permitió diferenciar entre adultos sanos y con sepsis a partir de la identificación de inmunofenotipos conformados por la expresión diferencial de HLA-DR, TREM-1, CD64, y CD69 en células mieloides circulantes. Dado que la sepsis neonatal es también un grave problema de salud intrahospitalario, pero que claramente existen diferencias en la distribución y capacidad de respuesta de sus leucocitos, el objetivo del presente trabajo fue aplicar este panel biomarcador a muestras (200 μ L de sangre) de neonatos con (n=3) y sin sepsis (n=4) y comparar con muestras de adultos con (n=13) y sin sepsis (n=4), el comportamiento de los marcadores y el inmunofenotipo obtenido en leucocitos circulantes.

Encontramos que, mientras en pacientes sépticos adultos hay granulocitosis y linfopenia relativa, en los neonatos tiende a ser granulocitopenia. Respecto a la expresión relativa de los marcadores de caracterización en monocitos: HLA-DR no se modifica en adultos sanos vs sépticos, como sí disminuye en monocitos de neonatos con sepsis vs sanos ($p < 0.01$). Mientras que en adultos con sepsis TREM-1 y CD69 tienden a aumentar respecto a sanos, en neonatos con sepsis bajan significativamente en sépticos respecto a sanos ($p < 0.01$). CD64 solo disminuye en monocitos de neonatos con sepsis con respecto al sano ($p < 0.001$), pero no se modifica en adultos. En granulocitos TREM-1, CD69 y CD64 disminuyen significativamente en sépticos respecto a sanos pero solo en neonatos ($p < 0.05$). En conclusión, aunque los inmunofenotipos generados no son los mismos en los pacientes con sepsis neonatos y adultos, los marcadores HLA-DR, TREM-1, CD64 y CD69 resultan de utilidad en un panel biomarcador para inmunofenotipos de monocitos y neutrófilos aplicado tanto a neonatos como a adultos con sepsis.

INTRODUCCIÓN

Inflamación

La inflamación es una respuesta de defensa que ocurre en los tejidos vascularizados ante una infección, traumatismo o lesión; involucra el reclutamiento y activación de células del sistema inmune innato a un estímulo químico, físico o microbiológico¹. La respuesta inflamatoria es caracterizada por una serie de eventos que llevan a la eliminación del agente causal y a la reparación del daño tisular a fin de mantener la homeostasis¹⁻³. Esta respuesta es desencadenada mediante la activación de receptores de reconocimiento de patrón (PRRs, por sus siglas en inglés), capaces de reconocer patrones moleculares asociados a daño (DAMPs, por sus siglas en inglés) como ATP, HMGB-1 (*high-mobility group box 1 protein*), proteínas de choque térmico (HSP, por sus siglas en inglés), ácido úrico, entre otros; y/o patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs, por sus siglas en inglés) como LPS, DNA y RNA de origen bacteriano o viral, flagelina y peptidoglicana^{2, 4, 5}. El reconocimiento de estas moléculas promueve la síntesis de mediadores inflamatorios (quimiocinas, citocinas, aminas vasoactivas, eicosanoides y moléculas de adhesión), causando el reclutamiento de células del sistema inmune innato (principalmente neutrófilos) al sitio de lesión^{5, 6}.

Una vez que se ha contenido el daño y/o eliminado al agente causal, es necesario contener la respuesta inflamatoria, con la finalidad de evitar el daño excesivo al tejido⁷. La resolución de la inflamación es iniciada por la expresión de enzimas que promueven la síntesis de mediadores anti-inflamatorios y pro-resolutivos, como lipoxinas, resolvinas y protectinas. Estos mediadores, reducen la infiltración de neutrófilos y la permeabilidad vascular; promueven la infiltración de monocitos de sangre periférica, los cuales se transforman en macrófagos y junto con las células residentes, fagocitan células apoptóticas; favorecen la síntesis de citocinas anti-inflamatorias (TGF- β e IL-10) e incrementan la salida de células fagocíticas a través de los vasos linfáticos reparando el tejido inflamado y restaurando su respectiva función^{8, 9}.

Si el daño es excesivo o persistente, y la respuesta inflamatoria no puede ser contenida, esta respuesta se vuelve sistémica y mediadores pro-inflamatorios, como TNF- α , IL-1 β , MIF (*macrophage migration inhibitory factor*) y HMGB-1¹⁰⁻¹² son liberados a la circulación. La liberación de estos mediadores ocasiona la activación de diversos tipos celulares, la inducción de fiebre, la síntesis de proteínas de fase aguda por el hígado y la activación tanto del endotelio como de las cascadas de la coagulación y del complemento¹³. La activación endotelial excesiva incrementa la permeabilidad vascular y la infiltración celular, causando edema y limitando la oxigenación de los tejidos; mientras que la activación de las cascadas de coagulación origina trombosis microvascular como resultado de la pérdida de las propiedades anticoagulantes del endotelio^{14, 15}.

SIRS/sepsis en adultos y neonatos

La inflamación sistémica genera una variedad de manifestaciones clínicas que, en conjunto, constituyen el síndrome de respuesta inflamatoria sistémica o SIRS (*Systemic Inflammatory Response Syndrome*)^{16, 17}. Este síndrome puede estar presente tanto en procesos inflamatorios infecciosos, en cuyo caso se denomina sepsis, como en procesos inflamatorios no infecciosos (quemaduras, pancreatitis, síndrome de dificultad respiratoria aguda, cirugía y trauma)¹⁸. En casos severos, generalmente el SIRS progresa a sepsis, siendo las infecciones nosocomiales (bacterianas, micóticas y virales) las causas más frecuentes¹⁶.

A nivel mundial, la sepsis constituye una de las primeras causas de morbi-mortalidad hospitalaria, reportándose más de 18 millones de casos anualmente, matando entre un tercio y la mitad de los pacientes que la padecen, y representando entre 60 y 80% de las muertes anuales en países en vías de desarrollo^{19, 20}. En las unidades de terapia intensiva en México, la incidencia de sepsis en adultos, descrita hasta el año 2009, era de 27.3%, con una tasa de mortalidad del 30.4%²¹. En el caso de sepsis neonatal, en México, se informan tasas de 15 a 30 por cada 1,000 recién nacidos con una letalidad de entre el 25 y 30%^{22, 23}.

En adultos, la sepsis suele presentarse más frecuentemente en sujetos de edad avanzada y/o con enfermedades crónico-degenerativas (como obesidad, diabetes, enfermedad obstructiva crónica), autoinmunes, inmunodeficiencias o sometidos a neurocirugías u otros procedimientos de cirugía mayor²⁴.

En neonatos, el otro grupo etario más susceptible a padecer sepsis, ésta se presenta en las primeras 72 h postparto (sepsis temprana) o después de este tiempo (sepsis tardía). La sepsis neonatal temprana (EOS, por *Early Onset Sepsis*) está relacionada con factores perinatales como edad gestacional menor a 34 semanas, bajo peso al nacer, ruptura prematura de membranas mayor a 18 horas, corioamnionitis e hipertensión/preeclampsia en la madre²⁵. Mientras que la sepsis neonatal tardía (LOS, por *Late Onset Sepsis*) suele deberse a infecciones nosocomiales adquiridas en las Unidades de Cuidado Intensivo Neonatal (UCIN) o del Recién Nacido (UCIREN).

La sepsis se clasifica de acuerdo a su severidad en: sepsis, sepsis severa (cuando se acompaña de falla orgánica) y choque séptico (si hay además compromiso hemodinámico sostenido y refractario al tratamiento médico)²⁶.

Respuesta inmune de adultos

El sistema inmune está constituido por componentes humorales (por ejemplo, citocinas, sistema del complemento, anticuerpos, entre otros) y componentes celulares (linfocitos, monocitos, células dendríticas, etc.); los cuales interaccionan y regulan de manera coordinada²⁷.

En respuesta a un estímulo, el sistema inmune innato monta una respuesta inflamatoria mediante la activación celular con la finalidad de producir mediadores biológicamente activos, tales como citocinas y quimiocinas. Estos mediadores, permiten la comunicación celular e intervienen directamente en efectos biológicos tales como la activación de las células, la quimiotaxis y la vasodilatación^{28, 29}.

Inicialmente, el estímulo es reconocido por las células del sistema inmune innato, a través de PRRs, capaces de reconocer PAMPs y/o DAMPs, desencadenando distintas

vías de señalización que llevarán a la producción de diferentes paneles de citocinas y quimiocinas. La síntesis de esos mediadores, además de conducir a la generación de respuestas pro-inflamatorias y/o antimicrobianas (como la fagocitosis, la activación del sistema de complemento, la síntesis de proteínas y péptidos antimicrobianos, entre otras), también inician el procesamiento del antígeno, necesario para la activación de la respuesta inmune adaptativa^{27, 28}.

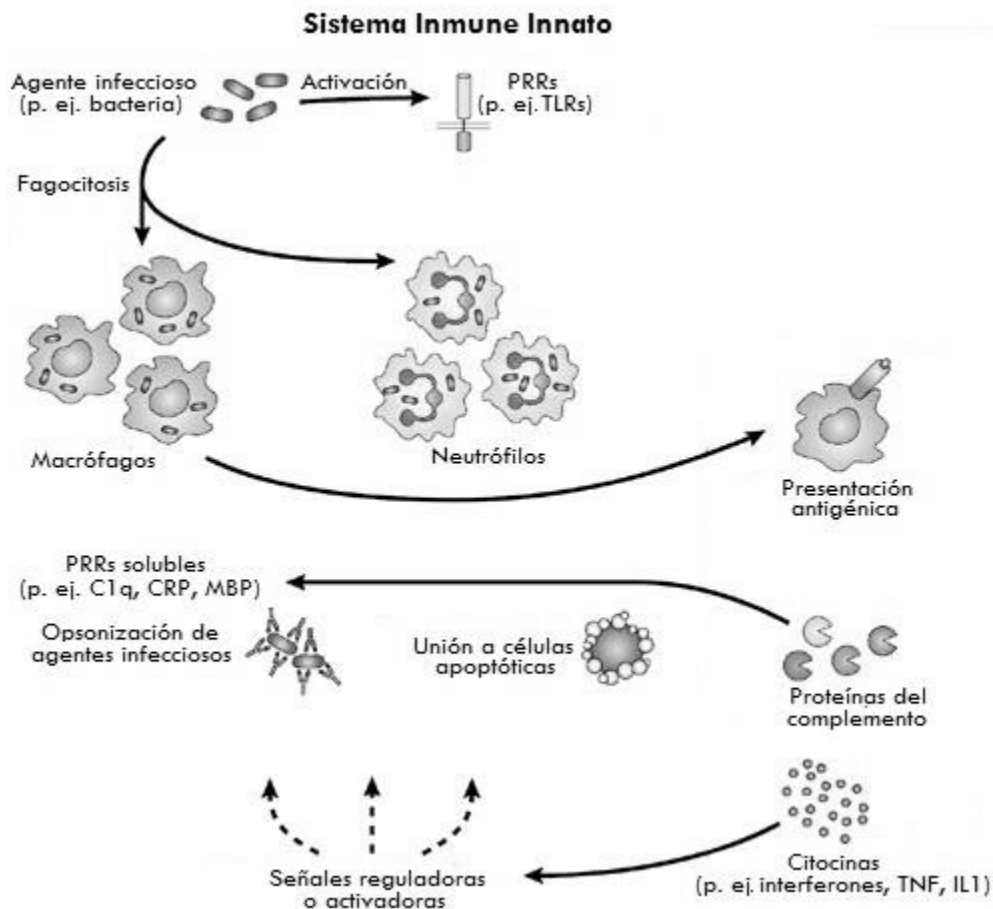


Figura 1. Elementos participantes en la respuesta inmune innata. (Modificado de Gregersen, 2006).

Los antígenos presentados por las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad de clase II (MHC-II, por *Major Histocompatibility Complex*) en células presentadoras del antígeno (APC, por *Antigen Presenting Cells*) a linfocitos T CD4+ son antígenos exógenos, mientras que los antígenos presentados por las

moléculas del complejo principal de histocompatibilidad de clase I (MHC-I) a linfocitos T CD8+ son en su mayoría endógenos. Sin embargo, para que la activación del linfocito T se lleve a cabo de manera eficiente se requiere de la interacción de las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad con el receptor de células T (TCR, por *T Cell Receptor*) y de la presencia de moléculas coestimuladoras y citocinas^{2, 30}.

El sistema inmune adaptativo, por otro lado, lleva a cabo distintas estrategias para hacer frente al estímulo; entre ellas se encuentran las respuestas mediadas por células efectoras específicas para el antígeno y las respuestas mediadas por anticuerpos²⁸. Una vez activados, los linfocitos T CD4+ y CD8+, son capaces de diferenciarse en linfocitos T cooperadores y linfocitos T citotóxicos respectivamente. Los linfocitos T cooperadores pueden promover la inmunidad mediada por células aumentando la producción de citocinas inflamatorias y quimiocinas; activar macrófagos, neutrófilos y otras células en el sitio de infección; o bien promover la producción de anticuerpos por las células B. Mientras que los linfocitos T citotóxicos, reconocen y destruyen células infectadas^{28, 30}.

Por otra parte, la mayoría de las respuestas de las células B son T dependientes, de manera que la producción óptima de anticuerpos no se puede desarrollar en ausencia de linfocitos T²⁸.

Respuesta inmune de neonatos

Se han descrito diferencias fenotípicas y funcionales entre el sistema inmune del neonato y del adulto; con base en ellas se piensa que el sistema inmune del neonato es "inmaduro". Sin embargo, también se han realizado acercamientos experimentales que demuestran una capacidad similar de la respuesta celular en neonatos y adultos^{27, 31}.

Una de las diferencias más sobresalientes entre adultos y neonatos, la constituye el número de células presentes en ambos (Tabla 1)^{32, 33}. Sin embargo, se desconoce si esto influye de alguna manera sobre la progresión y la calidad de la respuesta inmunológica en neonatos; en este sentido, la denominada leucocitosis del recién nacido no ha sido bien estudiada hasta el momento. Esta leucocitosis parece indicar

que el desarrollo de la respuesta inmune deficiente, no se debe a limitantes cuantitativas²⁷.

Tabla 1. Distribución de leucocitos en diferentes tipos de muestras sanguíneas

	Cordón umbilical³³	Sangre Periférica de Neonato³²	Sangre Periférica de Adulto
Leucocitos ($10^3/\mu\text{L}^3$)	7.2 ± 3.4	9.0-30.0	4.1–10.9
Neutrófilos ($10^3/\mu\text{L}^3$)	3.4 ± 1.8	6.0-26.0	2.09–5.97
Eosinófilos ($10^3/\mu\text{L}^3$)	0.29 ± 1.10	0.02-0.85	0.03-0.30
Basófilos ($10^3/\mu\text{L}^3$)	0.10 ± 0.25	0.00-0.64	0.01-0.08
Linfocitos ($10^3/\mu\text{L}^3$)	2.66 ± 1.29	2.0-11.0	1.1-3.5
Monocitos ($10^3/\mu\text{L}^3$)	0.8 ± 1.2	0.40-3.10	0.20-0.90

Se ha observado que, entre los factores que afectan tanto la iniciación como la progresión de la respuesta inmunológica en neonatos se encuentra la activación de vías de señalización por medio de citocinas. Marodi y colaboradores observaron que macrófagos de sangre de cordón umbilical disminuyeron su respuesta a IFN- γ (100 U/mL) en contraste con macrófagos de adultos sanos, a pesar de mostrar una mayor expresión del receptor para IFN- γ (IFN- γ R) (3141 ± 782 vs. 1670 ± 522) y niveles semejantes de STAT-1³⁴.

En cuanto a la capacidad de las células del neonato para expresar las distintas moléculas relacionadas en el proceso de activación se ha encontrado una menor expresión de este tipo de marcadores en la superficie de las células del neonato. Por ejemplo, en monocitos circulantes de neonatos se ha observado la expresión disminuida de moléculas HLA-DR, en comparación con adultos sanos (67.9 ± 36 vs. 115 ± 51.6)³⁵, contribuyendo a la defectuosa presentación del antígeno. Además, la expresión en la superficie del ligando para CD40 (CD40L), en linfocitos T, posterior al estímulo mitogénico (PMA), está disminuida en las células del neonato, en comparación con las de adulto^{36, 37}.

Por otro lado, las células presentadoras de antígeno (células dendríticas y macrófagos), necesarias para iniciar el proceso de activación de los linfocitos T, han mostrado una respuesta fagocítica menos eficiente^{34, 38}. La disminución en la capacidad fagocítica de estas células se ha asociado principalmente a la disminución en la expresión de

receptores involucrados en la endocitosis tales como el receptor de complemento tipo 3 (CR3, por sus siglas en inglés) y el receptor para la fracción cristalizante de las inmunoglobulinas (FcR3, por sus siglas en inglés)³⁸.

En neonatos, se ha observado una disminución en la síntesis de IgG e IgA como consecuencia de la disminución en la expresión de CD40L en los linfocitos T, necesaria para llevar a cabo el cambio de isotipo en los linfocitos B, provocando que el neonato dependa en gran medida del sistema inmune innato y de los anticuerpos maternos transferidos durante el último trimestre del embarazo y el periodo de lactancia^{39, 40}.

Inmunopatología de sepsis

La respuesta inmunológica en sepsis, representa una interacción entre dos fenómenos relacionados; durante el inicio de la patología prevalece una respuesta pro-inflamatoria sistémica exacerbada que es progresivamente suprimida por el desarrollo de una respuesta anti-inflamatoria compensatoria⁴¹.

En la fase inicial de la sepsis, caracterizada por una respuesta inflamatoria sistémica, denominada SIRS, la estimulación excesiva del sistema inmune; la activación de los leucocitos, el sistema de complemento y las células endoteliales, provoca la síntesis y liberación de quimiocinas y mediadores pro-inflamatorios (IL-1 β , IL-6, TNF- α , MIF) a la circulación⁴².

La activación de células fagocíticas, principalmente neutrófilos, provoca la liberación de enzimas granulares y el incremento en la síntesis de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés), tales como H₂O₂, involucrados en la eliminación de microorganismos. Sin embargo, durante SIRS/sepsis, la liberación masiva de ROS y óxido nítrico (NO) causa daño tisular incrementando la permeabilidad vascular⁴³.

Por otra parte, el aumento en la expresión de moléculas de adhesión en células endoteliales (ICAM-1, E-selectina) y neutrófilos (CD11b/CD18)¹⁶ que resulta en el incremento de la adherencia entre ambos, en tejidos no infectados⁴⁴, aunado al incremento en citocinas pro-inflamatorias como TNF, IL-6 y MIF capaces de disminuir la

apoptosis celular, originan la acumulación de neutrófilos en los tejidos^{39, 40}, donde son capaces de sintetizar más radicales libres del oxígeno y proteasas con la finalidad de eliminar a los patógenos; sin embargo, también promueven un daño al tejido.

De manera paralela al SIRS, se ha propuesto que ocurre un redireccionamiento hacia una respuesta anti-inflamatoria generalizada, denominada síndrome de respuesta anti-inflamatoria compensatoria (CARS, por sus siglas en inglés), cuya finalidad es prevenir el daño potencial a tejidos lejanos limitando el proceso inflamatorio al sitio de infección⁴⁵. El CARS comparte manifestaciones clínicas con el SIRS, y hasta la fecha únicamente pueden diferenciarse usando criterios moleculares como el incremento en la concentración sérica de IL-10, IL-1Ra (receptor antagonista de IL-1) y TGF- β , así como el decremento en la expresión de HLA-DR en la superficie de monocitos⁴⁶. Este redireccionamiento hacia una respuesta anti-inflamatoria se propone que genera un fenómeno de “tolerancia o reprogramación” celular que origina un estado denominado parálisis inmunológica, asociado a la liberación excesiva de mediadores anti-inflamatorios o la pérdida del balance entre los mediadores pro-inflamatorios y anti-inflamatorios⁴⁷, predisponiendo peligrosamente a los sujetos con SIRS a que se agreguen infecciones y desarrollando o complicando el estado de sepsis⁴⁸.

Uno de los mecanismos que se ha asociado al fenómeno de “inmunosupresión” en sepsis es el incremento en la apoptosis celular que contribuye a la disminución de las poblaciones leucocitarias. Estudios en pacientes con sepsis y modelos de ligadura y punción cecal (CLP, por Cecal Ligation and Puncture) en animales han mostrado una pérdida importante de células dendríticas esplénicas, linfocitos T CD4+ y linfocitos B^{49, 50}. Así, la disminución en la proporción de células dendríticas compromete de manera importante la presentación antigénica y por ende la función de linfocitos, mientras que pérdida de linfocitos T CD4+ y B disminuye la producción de citocinas pro-inflamatorias, la activación de macrófagos y la producción de anticuerpos⁵⁰. Además, la fagocitosis de estas células apoptóticas por macrófagos y su reconocimiento por monocitos, incrementa la síntesis y secreción de citocinas anti-inflamatorias como TGF- β e IL-10 e inhibe la producción de citocinas pro-inflamatorias promoviendo un ambiente anti-inflamatorio⁵¹.

Diagnóstico en SIRS/Sepsis

Es un hecho que el diagnóstico oportuno es fundamental para el éxito terapéutico. En un estudio realizado por Gaieski y colaboradores, se reporta que la reanimación inicial con fluidos, seguida de la administración de antibióticos específicos dentro de la primera hora de iniciado el cuadro de sepsis, disminuye la mortalidad de los pacientes del 44.4.% (cuando las medidas se implementan después de 4 horas) al 26.1%⁵². Otro estudio llevado a cabo por Kumar y colaboradores, reporta que la antibioticoterapia específica iniciada dentro de la primera hora tras el diagnóstico de sepsis se asocia a la sobrevivencia del 79.9% de los pacientes contra el 42.0% si el tratamiento con antibióticos se inicia después de 6 horas⁵³.

En adultos, el SIRS, se diagnostica por la presencia de al menos dos de los siguientes hallazgos clínicos: a) temperatura corporal mayor a 38°C o menor a 36°C, b) frecuencia cardiaca mayor a 90 latidos/min, c) frecuencia respiratoria mayor a 20 respiraciones/min o PaCO₂ menor a 32mm Hg, d) cuenta leucocitaria mayor a 12,000 células/mm³ (leucocitosis), menor a 400 células/mm³ (leucopenia) o mayor 10% de formas inmaduras (bandas)⁵⁴. En neonatos, los hallazgos clínicos de SIRS son: a) temperatura corporal mayor a 38.5°C o menor a 36°C, b) frecuencia cardiaca mayor a 180 latidos/min, c) frecuencia respiratoria mayor a 50 respiraciones/min, d) cuenta leucocitaria mayor a 34,000 células/mm³, menor a 5,000 células/mm³ o mayor a 25% de formas inmaduras^{55, 56}.

Entre las herramientas disponibles para evaluar a los pacientes con SIRS/sepsis se encuentran una variedad de exámenes de laboratorio. Algunos de estos exámenes se encuentran incluidos en sistemas de predicción como: APACHE II (*Acute Physiology and Chronic Health Evaluation*), SOFA (*Sequential Organ Failure Assessment*) y SAPS (*Simplified Acute Physiology Score*) en adultos. Estos sistemas de predicción, permiten asignar valores numéricos a escalas de gravedad, asignadas a diferentes variables clínicas o de laboratorio tales como la temperatura, la presión arterial, la frecuencia cardíaca, la frecuencia respiratoria, el hematocrito, el nivel de creatinina, la cuenta leucocitaria, el tiempo de coagulación y la función renal, entre otras. En neonatos, los

sistemas de predicción empleados son el APGAR y el SILVERMAN, que en conjunto permiten hacer una valoración del recién nacido en base a su frecuencia cardíaca, el esfuerzo respiratorio, el tono muscular, la coloración de la piel, los reflejos y la dificultad respiratoria⁵⁷. Sin embargo, estos sistemas de predicción, tanto en adultos como en neonatos, no son valorables en pacientes con enfermedades crónico-degenerativas en fase avanzada^{58, 59}. Además, estas escalas de predicción no son específicas para SIRS/sepsis, ya que se aplican a todos los pacientes en estado crítico para evaluar la severidad de la enfermedad. Así que no son capaces de diferenciar si se tratara de SIRS o sepsis, como tampoco de diferenciar las causas de la sepsis y/o la fase de respuesta en la que se encuentran los pacientes (pro o anti- inflamatoria).

Actualmente, el método considerado como “estándar de oro” para el diagnóstico de sepsis es el hemocultivo, no obstante, se requieren de 4 frascos de hemocultivo con 10 mL de sangre cada uno para detectar entre el 90 y 95% de los pacientes con bacteremia, ya que aproximadamente 50% de los pacientes tienen menos de 1.0 UFC/mL de sangre, requiriéndose entre 48 y 72 h de incubación para la obtención de una lectura confiable^{60, 61}. Además posee una baja sensibilidad, especialmente cuando los pacientes han recibido terapia antimicrobiana antes de la colección de la muestra sanguínea, lo que puede ocurrir hasta en el 55% de los casos^{62, 63}.

Biomarcadores y Sepsis

Buscando fortalecer las estrategias de diagnóstico y seguimiento de los pacientes con sepsis, se ha propuesto el empleo de biomarcadores, analitos que pueden ser empleados para evaluar procesos biológicos normales y patológicos, o respuestas farmacológicas debidas a una intervención terapéutica objetiva^{63, 64}.

En general, los biomarcadores de sepsis pueden ser clasificados, basados en su papel como mediadores de la inflamación sistémica, en proteínas de fase aguda, citocinas, quimiocinas, biomarcadores de coagulación y marcadores de superficie⁶³.

Las proteínas de fase aguda son producidas principalmente por el hígado como parte de una respuesta inflamatoria inmediata hacia una infección o lesión tisular, entre ellas

se encuentran la proteína C reactiva (CRP, por sus siglas en inglés) y la procalcitonina (PCT, por sus siglas en inglés). La CRP es sintetizada después de 6 u 8 horas del inicio del proceso, incrementando su concentración en más de 1000 veces durante una respuesta de fase aguda; sin embargo, este incremento ocurre de manera lenta durante la fase inicial^{64, 65}. Tiene una especificidad de entre un 93 y 100% y una sensibilidad que varía dentro del 60 y 84%, como marcador de infección, dependiendo de la cantidad de determinaciones y el tiempo en que éstas se realizan; sin embargo también se ha observado el incremento en el nivel de CRP en pacientes con artritis reumatoide, enfermedad de Crohn y pancreatitis⁶⁶. En lo que respecta a PCT, sus niveles se incrementan en las primeras 4 horas, alcanzando su concentración máxima entre las 6 y 8 horas posteriores al inicio del proceso. A pesar de que su concentración en suero parece no estar afectada por la edad gestacional, su concentración varía ampliamente en los primeros días de vida^{65, 67, 68}. Además, también se ha observado el aumento en el nivel de PCT en procesos inflamatorios no infecciosos como: cirugía, trauma, quemaduras y traumatismos al nacer⁶⁹.

En relación a citocinas potencialmente indicadoras de sepsis, se ha puesto especial atención a la IL-6, IL-8 y TNF- α . IL-6 es una citocina importante en la respuesta temprana del huésped ante una infección. Su concentración aumenta drásticamente tras la exposición a productos bacterianos⁶⁵. Al inicio de la infección, IL-6 presenta la mayor sensibilidad, 89%, en comparación con otros marcadores (CRP, IL-1 β y TNF- α). Tiene una vida media corta y su concentración disminuye de manera precipitada en las 24 horas posteriores al tratamiento. Clínicamente, la determinación de IL-6 en combinación con CRP durante las primeras 48 horas, ha demostrado tener una mayor sensibilidad que cualquiera de los marcadores por sí solos⁶⁸.

La IL-8 y el TNF- α , al igual que la IL-6, son citocinas pro-inflamatorias producidas principalmente por fagocitos activados en respuesta a una inflamación sistémica o inflamación. Se ha demostrado que los niveles de IL-8 se ven incrementados tanto en adultos como en neonatos tras una infección, observándose una relación directamente proporcional entre los niveles de IL-8 y la severidad de la sepsis^{65, 70}

Tanto en pacientes adultos como en neonatos pretérmino, infecciones severas se asocian a la activación de los sistemas de coagulación y fibrinolíticos, observándose un aumento en la concentración del complejo trombina-antrombina III, el inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1 (PAI-1, por sus siglas en inglés) y el activador tisular del plasminógeno (t-PA, por sus siglas en inglés)⁶⁵. La limitación de estas moléculas como biomarcadores radica en su inespecificidad, ya que otros procesos inflamatorios no infecciosos como quemaduras, pancreatitis y trauma también muestran un incremento en su concentración⁷¹.

Además de los biomarcadores solubles, varias son las moléculas de superficie celular que se han determinado empleando citometría de flujo en sepsis⁶⁵. La molécula del complejo principal de histocompatibilidad clase II (HLA-DR) se expresa en la membrana de linfocitos B, monocitos, macrófagos, células dendríticas, linfocitos T activados y células NK activadas^{72, 73}. Sin embargo, el nivel de expresión en la superficie celular difiere entre neonatos y adultos, siendo ésta menor en los recién nacidos⁷⁴. La disminución en la expresión de HLA-DR en monocitos ha sido reportada en pacientes con sepsis y en estados inflamatorios sistémicos no infecciosos como traumatismos o pancreatitis⁷⁵. En pacientes con sepsis, la baja expresión de HLA-DR se ha asociado con mal pronóstico⁷⁶.

Por otro lado, se ha observado que la expresión del receptor de inmunoglobulina G de alta afinidad o CD64, expresado comúnmente en monocitos, macrófagos y en bajos niveles en polimorfonucleares, se eleva en neutrófilos y monocitos en condiciones de inflamación e infección y después del tratamiento con GM-CSF o IFN γ ^{77, 78}. La unión de inmunoglobulina G al receptor Fc media varias funciones leucocitarias, entre las que se encuentran la fagocitosis, la endocitosis, la secreción de citocinas y la citotoxicidad dependiente de anticuerpos. Se ha observado que el nivel de expresión de CD64 en monocitos de sangre de cordón umbilical (10946 ± 2377) es similar al mostrado por monocitos de sangre periférica de adultos (10995 ± 1877); no obstante, la expresión de CD64 en granulocitos en recién nacidos a término es mayor que en adultos (1653 ± 945 vs. 330 ± 206)⁷⁹. Sin embargo, tanto pacientes neonatos como adultos con sepsis,

muestran un incremento en la expresión de CD64, alcanzando su concentración máxima 24 h después de las primeras manifestaciones clínicas⁸⁰.

Otra molécula potencialmente útil como biomarcador en sepsis es el antígeno de activación temprana o CD69; esta molécula se expresa tempranamente durante la activación de linfocitos, monocitos y plaquetas⁸¹. En pacientes sépticos, se ha observado un aumento en la expresión de CD69 en la superficie de linfocitos, principalmente en células NK⁸². Paralelamente se ha reportado que pacientes adultos muestran una disminución en la proporción de dichas células (181 ± 35 células/mm³ vs 330 ± 30 células/mm³)⁸³, mientras que pacientes neonatos, muestran un incremento en el porcentaje de células NK (330 ± 23 células/mm³ vs. 170 ± 15 células/mm³)⁸⁴.

Respecto a TREM-1 (por, Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells-1), se sabe que es expresado en neutrófilos, macrófagos y monocitos maduros⁸⁵; sin embargo también es posible encontrarlo en forma soluble (sTREM-1). Su expresión se incrementa dramáticamente en los fluidos biológicos y tejidos infectados por bacterias Gram-positivas, Gram-negativas y hongos⁸⁶. En contraste, TREM-1 no se sobreexpresa en muestras de pacientes con patologías inflamatorias no infecciosas como la psoriasis, la colitis ulcerativa y la vasculitis⁸⁷. Estudios in vitro, muestran que la estimulación de monocitos con 1 y 100 ng/mL de LPS incrementan la expresión de TREM-1 en su superficie⁸⁸. Estudios recientes han mostrado un incremento en los niveles de sTREM-1 en neonatos con sepsis tardía (1218.5 ± 430.3 pg/mL vs 612.9 ± 196 pg/mL)⁸⁹.

Dado que la sepsis es una enfermedad compleja que involucra la participación de múltiples mediadores, resulta poco probable que un sólo biomarcador describa adecuadamente esta patología⁹⁰, por lo que algunos grupos han propuesto que la determinación conjunta de varios de estos marcadores aumenta su valor diagnóstico en sepsis^{91, 92}. Aunado a esto, las diferencias entre el sistema inmune del neonato y el adulto suponen implicaciones importantes en la patofisiología y tratamiento de la sepsis, por lo que la determinación en conjunto de varios biomarcadores puede permitirnos entender el comportamiento de la sepsis en neonatos y adultos.

JUSTIFICACIÓN

Las diferencias de desarrollo entre neonatos y adultos tienen implicaciones muy importantes en la epidemiología, la fisiopatología y el tratamiento de la sepsis. Por otra parte, estas diferencias, afectan en gran medida tanto la respuesta del huésped a la infección, como la respuesta del paciente a la terapia. Uno de los desafíos particulares en el tratamiento de la sepsis es lidiar con estas diferencias ya que éste no sólo consiste en el tratamiento antibiótico que elimine al patógeno desencadenante, sino que además requiere de abordajes terapéuticos que restrinjan la respuesta pro-inflamatoria exacerbada o bien rescaten a los pacientes de la “parálisis inmune”.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Existirán diferencias en el comportamiento del inmunofenotipo leucocitario que incluye HLA-DR, TREM-1, CD64 y CD69 entre pacientes adultos y neonatos con sepsis?

HIPÓTESIS

El inmunofenotipo con disminución en HLA-DR, e incrementos en TREM-1, CD64 y CD69 en células mieloides mostrará diferencias entre ambos grupos etarios de pacientes con sepsis.

OBJETIVO GENERAL

Determinar si el inmunofenotipo conformado por la expresión de las moléculas HLA-DR, TREM-1, CD64 y CD69 en células mieloides es igual o no en pacientes adultos y neonatos con sepsis.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Cuantificar las poblaciones de monocitos, granulocitos y linfocitos de sangre periférica de pacientes adultos y neonatos con sepsis, así como del grupo de adultos sanos, y en sangre de cordón umbilical de neonatos sanos.
2. Evaluar la expresión de los marcadores de activación: HLA-DR, TREM-1, CD69 y CD64 en células mieloides de cordón umbilical de neonatos sanos y células mieloides circulantes de neonatos con sepsis.
3. Evaluar la expresión de los marcadores de activación: HLA-DR, TREM-1, CD69 y CD64 en células mieloides circulantes de adultos sanos y pacientes adultos con sepsis.
4. Comparar la expresión de los marcadores de activación: HLA-DR, TREM-1, CD69 y CD64 en células mieloides circulantes de pacientes neonatos y adultos con sepsis.
5. Establecer la correlación entre la expresión de los diferentes marcadores de activación en células mieloides circulantes de pacientes neonatos y adultos con sepsis.

MATERIAL Y MÉTODOS

Diseño del estudio

Estudio longitudinal, prospectivo y observacional.

Universo de trabajo

Se incluyeron pacientes neonatos ingresados en la Unidad de Cuidados Intensivos del Recién Nacido (UCIREN) del Instituto Nacional de Perinatología “Isidro Espinoza de los Reyes” de la Secretaría de Salud con diagnóstico de sepsis tardía y pacientes adultos ingresados en la Unidad de Cuidados Intensivos (UCI) del Hospital de Especialidades de Centro Médico Nacional “Siglo XXI” del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) con diagnóstico de sepsis de reciente inicio.

Criterios de Inclusión

- *Neonatos sanos*
 - Producto único vivo.
 - Madre sana en trabajo de parto
 - Pacientes de sexo masculino y femenino.
 - Pacientes cuyos padres otorguen su consentimiento informado firmado.

- *Neonatos con sepsis tardía*
 - Recién nacidos ingresados en la UCIREN, a los cuales se le inicie abordaje diagnóstico por sospecha de sepsis neonatal tardía, después de las primeras 72 horas de vida.
 - Pacientes cuya madre haya presentado signos y síntomas clínicos de infección intramniótica; ruptura prematura de membranas, mayor a 18 horas; o diagnosticada con corioamnionitis.
 - Pacientes de sexo masculino y femenino.
 - Pacientes cuyos padres otorguen su consentimiento informado firmado.

- *Adultos*
 - Pacientes ingresados en la UCI con diagnóstico de sepsis, con menos de 48 horas de evolución de acuerdo a los criterios de la APCCP y/o dentro de las primeras 24 horas de haber sido ingresados a la UCI.
 - Pacientes de sexo masculino y femenino.
 - Pacientes de entre 18 y 60 años de edad.
 - Pacientes que otorguen su consentimiento informado firmado. En caso de incapacidad para firmar la hoja de consentimiento, se solicitó el consentimiento a sus familiares o a su representante legal.

Criterios de Exclusión

- *Neonatos sanos*
 - Parto múltiple.
 - Recién nacido con alteración genética o cromosómica.

- Madre con antecedentes de tabaquismo, drogadicción o cualquier farmacodependencia.
 - Madre con diagnóstico de diabetes, hipertensión arterial o preclampsia.
- *Neonatos con sepsis*
 - Recién nacido que amerite reanimación avanzada con masaje cardiaco.
 - Recién nacido con alteración genética o cromosómica.
 - Pacientes asfixiados.
 - Pacientes con síndrome de aspiración de meconio.
 - Pacientes con sospecha o confirmación de enterocolitis necrozante.
 - Pacientes con diagnóstico de neumonía por gérmenes atípicos.
 - Pacientes con gastrosquisis u onfaloceles.
 - Pacientes con infecciones como VIH, TORCHs, etc.
 - Pacientes con diagnóstico de trastornos hematológicos e inmunodeficiencias.
- *Adultos*
 - Pacientes cuyos familiares o ellos mismos rechazaron participar en el estudio.
 - Pacientes con inmunodeficiencias o inmunocompromiso como los portadores de VIH, hepatitis B, hepatitis C o enfermedades autoinmunes.
 - Embarazo.
 - Pacientes que previo a su ingreso a la UCI hayan sido sometidos a procedimientos quirúrgico a fin de eliminar focos infecciosos (abscesos, peritonitis, apendicitis o perforación intestinal).
 - Pacientes con expediente clínico incompleto.

Criterios de Eliminación

- Pacientes cuyas muestras sanguíneas no fueron factibles de procesar por situaciones inherentes a la toma y/o procesamiento de la misma.
- Pacientes que decidan retirarse voluntariamente del estudio.

Aspectos éticos

Para la realización del presente protocolo se solicitó la aprobación del Comité Nacional de Investigación Científica del IMSS y del Comité de Ética del Instituto Nacional de Perinatología. Se considera que los pacientes incluidos en este estudio estuvieron expuestos a un riesgo mayor al mínimo, por lo que se solicitó la firma de una carta de consentimiento informado antes de iniciar el estudio (Anexo1 y 2). Ningún menor de edad, clínicamente sano, fue expuesto a un riesgo mayor al mínimo.

Los procedimientos propuestos estuvieron de acuerdo con las normas éticas, el Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud y con la declaración de Helsinki de 1975 y sus enmiendas^{93, 94}, así como los códigos y normas internacionales vigentes para las buenas prácticas de investigación clínica en el momento. Se respetaron cabalmente los principios contenidos en el Código de Nuremberg, el Informe de Belmont⁹⁵ y la declaración de Helsinki, así como en sus enmiendas.

Recolección de las muestras

- Neonatos

La toma de muestras en pacientes neonatos con sepsis se realizó mediante punción venosa previa asepsia de la zona. Se colectaron 500 µL de sangre periférica de neonatos; las muestras obtenidas fueron colectadas en tubos con EDTA como anticoagulante.

Por cuestiones éticas, el control de neonato sanos correspondió a sangre de cordón umbilical donde la toma de muestras se realizó mediante venopunción de la arteria umbilical post-parto inmediato. Se colectaron 10 mL de sangre de cordón umbilical; las muestras obtenidas fueron colectadas en tubos con EDTA como anticoagulante.

- Adultos

La toma de muestras en pacientes con sepsis se realizó del catéter central con previa asepsia de la zona y drenado del mismo. En voluntarios adultos sanos, la toma de muestras se realizó mediante venopunción humeral. Se colectaron 5 mL de sangre periférica de adultos; las muestras obtenidas fueron colectadas en tubos con EDTA como anticoagulante.

Recolección de datos clínicos

Empleando una hoja de recolección de datos (Anexos 3 y 4, Hojas de recolección de datos) se recabó la información general de cada paciente, así como el diagnóstico, evolución, variables clínicas y de laboratorio que se relacionan con la severidad de la enfermedad y la evolución de los pacientes. Toda esta información se manejó como confidencial, salvaguardando la intimidad de cada persona participante en el estudio.

Inmunofenotipificación de leucocitos de sangre periférica mediante citometría de flujo

Se adicionaron 1000 μ L de solución de lisis (NH_4Cl 0.15M) a 200 μ L de sangre total incubándose 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente se adicionó 1 mL de solución amortiguadora a base de fosfatos (PBS 1x) y se centrifugaron durante 5 min a 1500 rpm. El botón celular obtenido se resuspendió en 200 μ L de PBS 1x. Se agregaron 50 μ L del resuspendido celular a un tubo de autofluorescencia (sin anticuerpos, Tubo 1) y dos o tres tubos (Tubos 2, 3, y en su caso 4) de “tinción”, con diferentes mezclas de anticuerpos monoclonales (Tabla 2 y 3).

Después de 15 min de incubación a temperatura ambiente y en oscuridad, se agregaron 250 μ L de solución de lisis y fijado (BD FACS™ Lysing Solution Cat. 349202) diluida 1:10 y se incubaron por 10 min a temperatura ambiente en oscuridad. Finalmente las células se lavaron por centrifugación agregando 1 mL de PBS 1x y posteriormente se resuspendieron en 50 μ L de solución isotónica. Se adquirieron al menos cinco mil eventos correspondientes a la población de monocitos utilizando un citómetro FACS Aria (BD Biosciences, San José, CA, USA) equipado con tres láser y un

juego de filtros adecuados para la detección de los fluorocromos utilizados. El análisis multiparamétrico de las poblaciones leucocitarias se realizó empleando el programa de análisis citométrico Infinicyt (Cytognos, Euroflow, España).

Tabla 2. Relación de anticuerpos utilizados para evaluar los marcadores de identificación y caracterización de leucocitos circulantes en pacientes neonatos

ANTICUERPO	FLUOROCROMO	VOLUMEN (µL)	MARCA	CLONA
Mezcla anticuerpos Tubo 2				
CD45	P. Orange	2.0	Invitrogen	HI30
CD3	P. Blue	3.0	BD	UCTH1
CD8	PE Cy7	2.0	Biolegend	HIT8a
CD56	APC	3.0	Biolegend	HCD56
HLA-DR	PE Cy5	3.0	Biolegend	L243
CD16	APC Cy7	2.0	Biolegend	3G8
CD14	FITC	2.0	Biolegend	M5E2
TREM-1	PE	4.0	R&D	193015
Mezcla anticuerpos Tubo 3				
CD45	P. Orange	2.0	Invitrogen	HI30
CD3	P. Blue	3.0	BD	UCTH1
CD8	PE Cy7	2.0	Biolegend	HIT8a
CD56	APC	3.0	Biolegend	HCD56
CD27	PE	3.0	Biolegend	O323
CD64	FITC	3.0	Biolegend	10.1
CD45RA	PE Cy5	2.0	Biolegend	HI100
CD45RO	APC Cy7	2.0	Biolegend	UCHL1
Mezcla anticuerpos Tubo 4				
CD45	P. Orange	2.0	Invitrogen	HI30
CD3	P. Blue	3.0	BD	UCTH1
CD8	PE Cy7	2.0	Biolegend	HIT8a
CD56	APC	3.0	Biolegend	HCD56
IREM-2	PE	2.0	Immunostep	UP-H2
CD69	PE Cy5	2.0	BD	FN50
CD71	FITC	4.0		

Tabla 3. Relación de anticuerpos utilizados para evaluar los marcadores de identificación y caracterización de leucocitos circulantes en pacientes adultos

ANTICUERPO	FLUOROCROMO	VOLUMEN (µL)	MARCA	CLONA
Mezcla anticuerpos Tubo 2				
CD45	P. Orange	0.5	Invitrogen	HI30
CD3	P. Blue	0.5	Biologend	UCTH1
CD16	APC Cy7	1.0	BD	3G8
CD56	APC	0.5	BD	B159
CD14	PE Cy7	0.5	BD	HCD56
CD64	FITC	0.5	BD	M5E2
TREM-1	PE	4.0	R&D	193015
HLA-DR	PE Cy5	2.0	BD	L243
Mezcla anticuerpos Tubo 3				
CD45	P. Orange	0.5	Invitrogen	HI30
CD3	P. Blue	0.5	Biologend	UCTH1
CD16	APC Cy7	1.0	BD	3G8
CD56	APC	0.5	BD	B159
CCR7	PE Cy7	0.5	BD	3D12
TLR-2	FITC	4.0	eBioscience	TL2.1
IREM-2	PE	2.0	Immunostep	UP-H2
CD69	PE Cy5	4.0	BD	FN50

A partir de las mezclas de anticuerpos utilizadas y en base a los marcadores de identificación se clasificaron los leucocitos en: monocitos (CD45⁺ CD14⁺ IREM-2⁺) y neutrófilos (CD45⁺ CD16⁺ CD14⁻). Estos leucocitos fueron caracterizados por la expresión diferencial de TREM-1, CD69, CD64 y/o HLA-DR (Tabla 4).

Tabla 4. Marcadores para la identificación y caracterización de células mieloides

Tipo celular	Marcadores de identificación	Marcadores de activación (caracterización)
Monocitos	CD45, CD14, IREM-2, HLA-DR	HLA-DR, TREM-1, CD16, CD69
Neutrófilos	CD45, CD16	CD64, TREM-1, CD16, CD69

Análisis estadístico

Una vez determinados los inmunofenotipos y aplicadas las pruebas de Kruskal – Wallis seguidas de una prueba post-hoc de Dunn, para establecer si existen diferencias en la expresión de marcadores entre los grupos de pacientes con sepsis y sujetos sanos, y los pacientes adultos con sepsis y neonatos con sepsis, se utilizaron pruebas de análisis bivariados tipo Spearman para establecer si existen relaciones entre la expresión de los diferentes parámetros analizados mediante citometría de flujo empleando el software GraphPad Prism v6.01 (La Jolla, CA, USA).

RESULTADOS

Se realizó la recolección de muestras y datos clínicos de: 3 neonatos diagnosticados con sepsis tardía, 4 recién nacidos sanos, 13 pacientes adultos con diagnóstico de sepsis y 4 adultos sanos; los datos clínicos de éstos últimos corresponden a aquellas constantes vitales registradas después del nacimiento de los recién nacidos de quienes se obtuvo la sangre de cordón umbilical. Las características demográficas y clínicas de los pacientes se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5. Características demográficas y clínicas de los sujetos incluidos en el estudio

	Neonatos		Adultos	
	Sanos (n=4)	Sépticos (n=3)	Sanos (n=4)	Sépticos (n=13)
Edad			39 ± 10	60 ± 13
Género F:M	2 : 2	2 : 1	3 : 1	5 : 8
FC (latidos/min)	155 ± 7	117 ± 49	73 ± 7	87 ± 14
FR (respiraciones/min)	53 ± 1	60 ± 0	18 ± 2	19 ± 5
Temperatura (°C)	36.8 ± 0.3	36.9 ± 1.1	36.3 ± 0.3	37.1 ± 1.0
PAM	ND	ND	89 ± 7	85 ± 17
APACHE II	NA	NA	NA	19 ± 6
SOFA	NA	NA	NA	8 ± 3
APGAR 1m	8 ± 1	5 ± 1	NA	NA
APGAR 5m	9 ± 0	8 ± 2	NA	NA
SILVERMAN	2 ± 1	2 ± 2	NA	NA
Sobrevivientes	NA	3	NA	9

ND:No Determinado; NA: No Aplica. APACHE: Acute physiology and chronic health evaluation, SOFA: Sequential Organ Failure Asssesment. FC: Frecuencia Cardiaca, FR: Frecuencia Respiratoria, PAM: Presión Arterial Media.

La Tabla 6 muestra algunos de los resultados de los análisis de laboratorio clínico recabados (biometría hemática) y de importancia para la valoración de los pacientes.

En los neonatos no hay diferencias significativas en la cuenta de leucocitos totales ni en las diferentes poblaciones leucocitarias entre aquellos con sepsis y sanos.

En los pacientes adultos con sepsis, los leucocitos circulantes están significativamente elevados ($12.10 \pm 5.45 \times 10^3$ células/ μ L vs. $5.93 \pm 0.93 \times 10^3$ células/ μ L, $p \leq 0.05$) respecto a adultos sanos. Esta leucocitosis es a expensas de monocitos ($1.17 \pm 1.73 \times 10^3$ células/ μ L vs. $0.47 \pm 0.08 \times 10^3$ células/ μ L, $p \leq 0.05$) y neutrófilos (sépticos= $10.97 \pm 5.10 \times 10^3$ células/ μ L vs sanos= $3.74 \pm 0.90 \times 10^3$ células/ μ L, $p \leq 0.01$).

Tabla 6. Resultados de Biometría Hemática de los sujetos incluidos en el estudio

	Neonatos		Adultos	
	Sanos (n=4)	Sépticos (n=3)	Sanos (n=4)	Sépticos (n=13)
Hemoglobina (g/dL)	17.0 ± 1.1	17.9 ± 2.8	14.7 ± 1.0	11.2 ± 2.4
Hematocrito (%)	47.7 ± 4.0	52.3 ± 7.1	40.9 ± 0.2	3.3 ± 6.8
Leucocitos (x10³/μL)	9.32 ± 2.70	10.47 ± 2.12	5.93 ± 0.93	12.10 ± 5.45 ^{β, *}
Neutrófilos (x10³/μL)	2.95 ± 1.28	6.98 ± 0.97	3.74 ± 0.90	10.97 ± 5.10 ^{β, **}
Linfocitos (x10³/μL)	5.06 ± 2.23	2.56 ± 1.04	1.61 ± 0.22	1.73 ± 2.73
Monocitos (x10³/μL)	0.72 ± 0.32	0.82 ± 0.52	0.47 ± 0.08	1.17 ± 1.73 ^{β, *}
Plaquetas (x10³/μL)	181 ± 122	170 ± 35	225 ± 70	206 ± 113

Los datos son expresados como la media ± SD. La U de Mann Whitney se empleó para comparar pacientes sanos y sépticos; β se refiere a la comparación entre pacientes adultos sanos y sépticos. (* = p≤0.05, ** = p≤0.01).

Caracterización de poblaciones leucocitarias

Para la identificación y caracterización de las poblaciones leucocitarias en cada uno de los sujetos estudiados, como se describe en material y métodos se utilizó un algoritmo de análisis de datos de citometría de flujo utilizando el programa Infinicyt, que incluía mediante gráficas de puntos (o “dot-plots”) la visualización de diferentes parámetros. Como se puede ver en la Figura 2 “Estrategia de análisis para la identificación de leucocitos circulantes”, para seleccionar a los eventos o células individuales (sin agregados); se utilizó una gráfica de FSC-H (o señal pico del parámetro tamaño) vs FSC-A (o señal área del parámetro tamaño); además, se utilizó una gráfica de tamaño (FSC-A) vs complejidad (SSC-A) para identificar a las células completas y potencialmente viables (población “células”); y una gráfica de complejidad (SSC-A) vs la expresión de CD45 (CD45-A), para discriminar a los leucocitos de los eritrocitos remanentes. Con todas éstas gráficas, utilizando simultáneamente los tres parámetros proyectados en las cuatro gráficas, se hizo una primera identificación de las tres subpoblaciones mayoritarias de leucocitos en circulación: linfocitos que tienen poco tamaño y complejidad y alta expresión de CD45 (FSC^{lo}, SSC^{lo}, CD45⁺⁺⁺), monocitos con tamaño, complejidad y expresión de CD45 media (entre linfocitos y granulocitos)

(FSC^{med}, SSC^{med}, CD45⁺⁺) y neutrófilos con tamaño heterogéneo (de mediano a grande), complejidad alta y baja expresión de CD45 (FSC^{het}, SSC^{hi}, CD45⁺).

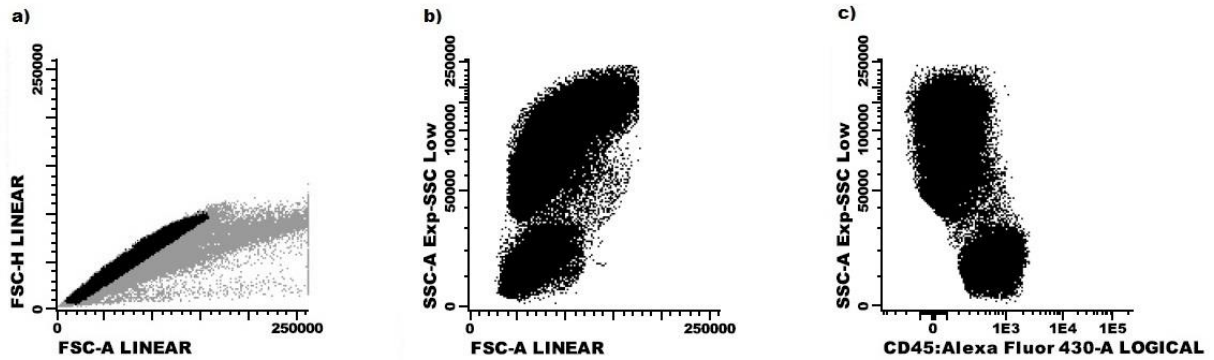


Figura 2. Estrategia de análisis para la identificación de leucocitos circulantes. Utilizando las señales pico (H) y área (A) para el parámetro tamaño (FSC) se genera la gráfica que permite selección de eventos sencillos (inciso a). Con la visualización del patrón de tamaño (FSC) vs complejidad (SSC) (inciso b) y la expresión diferencial de CD45 (inciso c), se obtiene la población de leucocitos totales. La visualización de todos estos gráficos se utilizó tanto en neonatos como adultos sanos y con sepsis.

Como se puede visualizar en la Figura 3 tanto en adultos como en neonatos, los patrones de tamaño y complejidad varían dramáticamente entre los sujetos sanos y los pacientes con sepsis, de allí la gran importancia de incluir CD45, así como otros marcadores de identificación como CD14 para monocitos, y CD16 y HLA-DR para granulocitos.

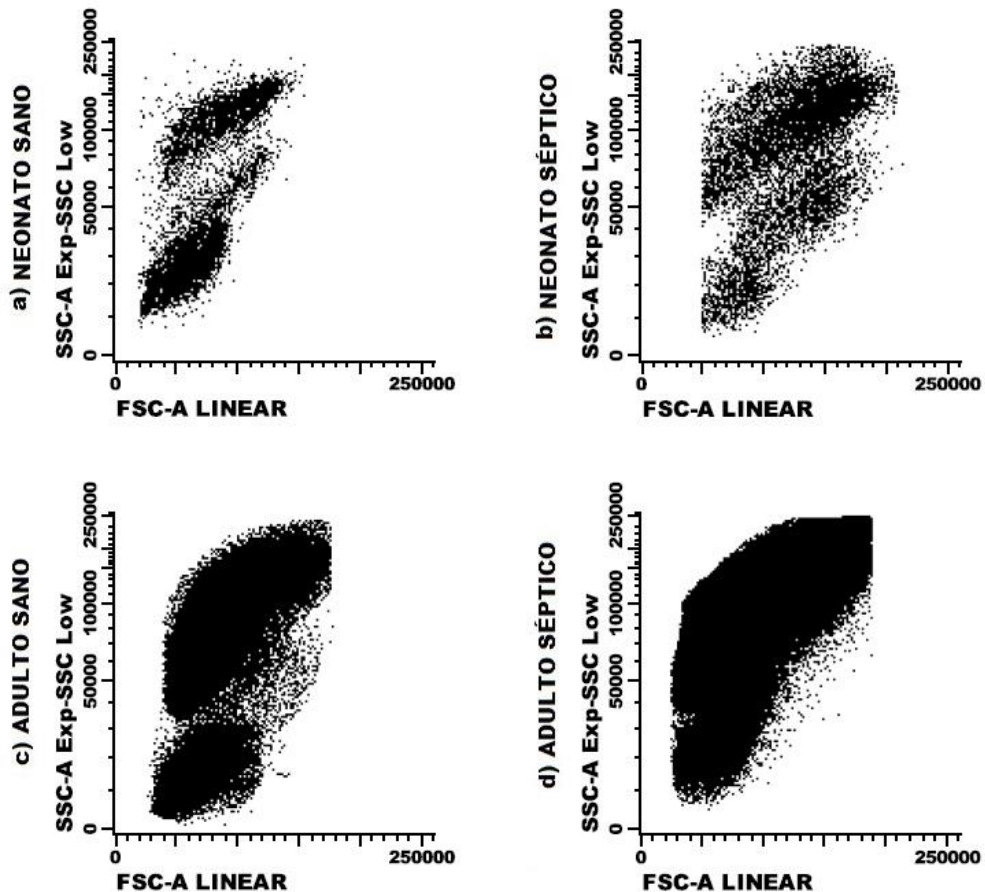


Figura 3. En pacientes con sepsis, tanto en adultos como neonatos, se modifica la distribución clásica de leucocitos por tamaño y complejidad. Utilizando el software Infinicyt para análisis de datos de citometría de flujo, se seleccionaron los eventos sin agregados y de allí se desplegaron gráficos FSC (tamaño) vs SSC (complejidad). En las muestras de a) neonatos sanos y c) adultos sanos, se observa el patrón clásico de obtenido por estos parámetros para leucocitos de humano, con tres poblaciones: linfocitos ($FSC^{low} SSC^{low}$), monocitos ($FSC^{medium} SSC^{medium}$) y granulocitos ($FSC^{heterogeneo/high} SSC^{high}$) de los pacientes. En el caso de b) neonatos sépticos, y d) adultos sépticos se observa claramente que se vuelven difusos los límites entre las tres poblaciones mayoritarias de leucocitos, a expensas de pérdida de complejidad y tamaño de granulocitos e incrementos en complejidad de monocitos.

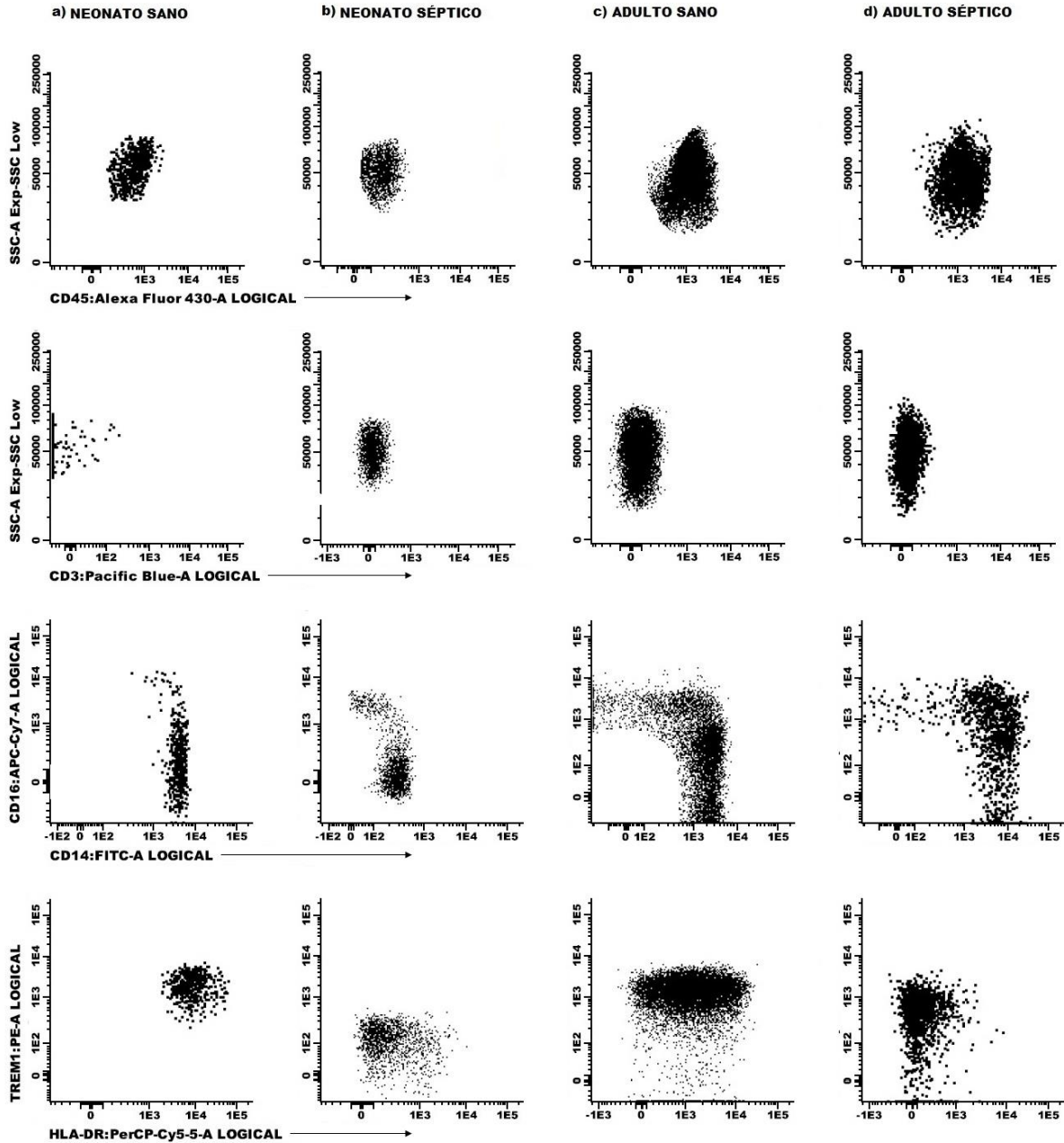


Figura 4. Algoritmo para la identificación y caracterización de monocitos. Empleando la expresión diferencial de CD45 en leucocitos, las características de tamaño y complejidad, y la expresión de marcadores de identificación, se seleccionó la población de monocitos.

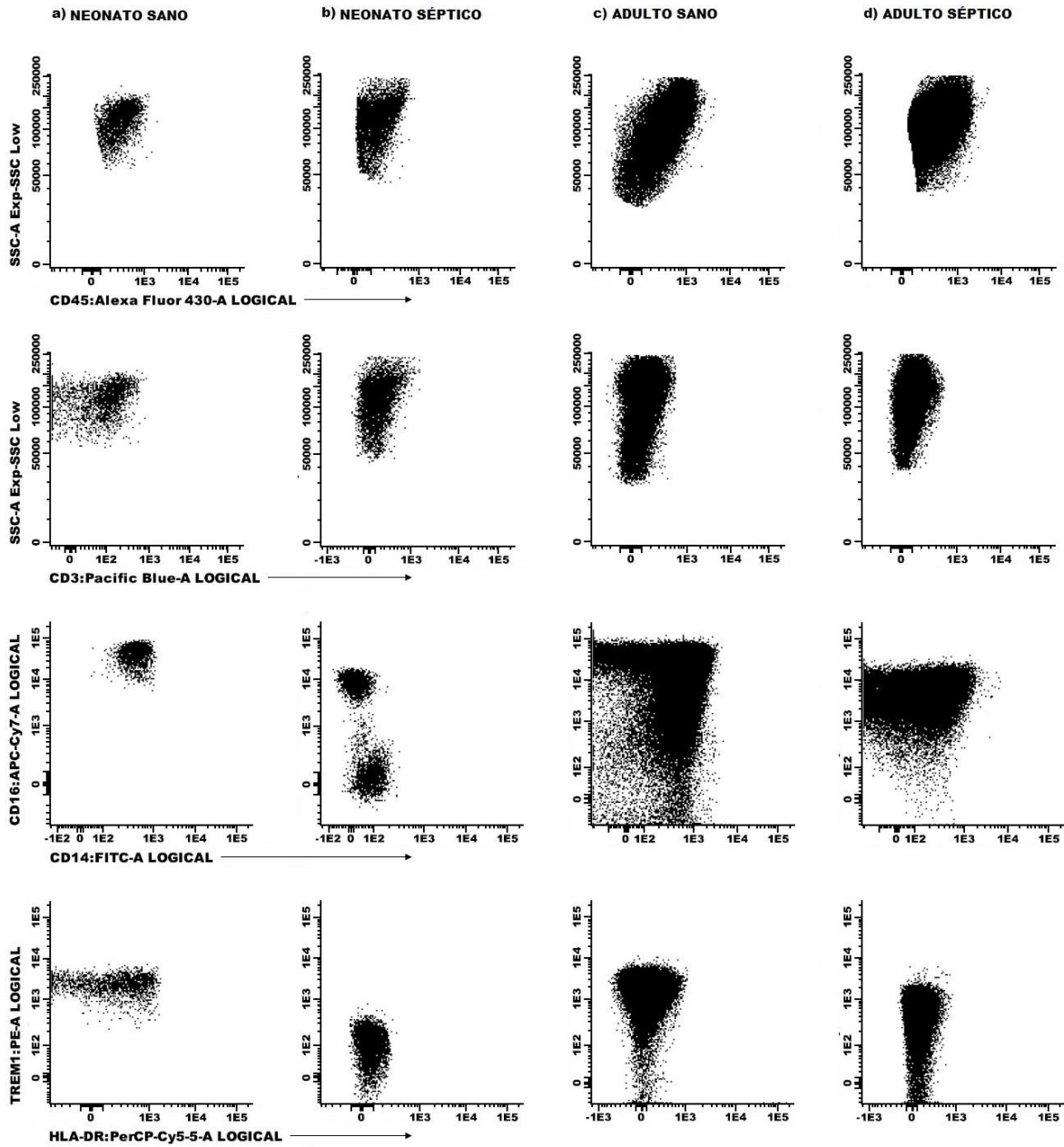


Figura 5. Algoritmo para la identificación y caracterización de granulocitos. Empleando la expresión diferencial que presentan los leucocitos para el marcador CD45, las características de tamaño y complejidad, y la expresión de marcadores de identificación, se seleccionó la población de granulocitos.

Con esta estrategia establecimos las frecuencias de linfocitos, monocitos y granulocitos de los cuatro grupos analizados (Figura 6). En éste caso encontramos que para los linfocitos no hay diferencias significativas entre los pacientes con sepsis y sanos, aunque en adultos si hay una tendencia a ser menor en sépticos. La proporción de monocitos tiende a ser mayor en neonatos con sepsis respecto a neonatos sanos, aunque la diferencia no es significativa, lo mismo que la frecuencia de monocitos en adultos, la cual es prácticamente la misma entre los diagnosticados con sepsis y sanos. En granulocitos no encontramos diferencias significativas entre los pacientes con sepsis y los sanos, ni en el grupo de neonatos, ni en adultos.

Ahora bien, cuando comparamos a los grupos de neonatos contra adultos, encontramos que no hay diferencias significativas en las frecuencias de ninguna de las tres poblaciones mayoritarias, aunque se observa una tendencia a ser mayor en neonatos. Sin embargo, al comparar a los pacientes neonatos con los pacientes adultos con sepsis, encontramos que la frecuencia de monocitos circulantes es significativamente mayor en neonatos con sepsis en comparación con adultos con sepsis ($19.19 \pm 7.95\%$ vs. $2.98 \pm 1.75\%$, $p \leq 0.01$); mientras que inversamente para granulocitos, la frecuencia en neonatos con sepsis es significativamente menor que en adultos sépticos ($33.64 \pm 30.73\%$ vs. $91.44 \pm 5.93\%$, $p \leq 0.01$).

A partir de las frecuencias de las diferentes poblaciones leucocitarias, y en relación al número de leucocitos totales obtenido de la biometría hemática, se calcularon los números absolutos de linfocitos, monocitos y granulocitos (Figura 7).

El conteo leucocitario diferencial de neonatos sépticos vs. neonatos sanos fue para linfocitos ($4.60 \pm 2.97 \times 10^3$ células/ μL vs. $4.22 \pm 2.04 \times 10^3$ células/ μL), monocitos ($2.12 \pm 1.17 \times 10^3$ células/ μL vs. $0.66 \pm 0.43 \times 10^3$ células/ μL) y granulocitos ($3.75 \pm 3.48 \times 10^3$ células/ μL vs. $4.44 \pm 1.74 \times 10^3$ células/ μL). En el caso de adultos sépticos vs. adultos sanos, los números absolutos obtenidos fueron, para linfocitos ($0.65 \pm 0.52 \times 10^3$ células/ μL vs. $1.60 \pm 0.45 \times 10^3$ células/ μL), monocitos ($0.36 \pm 0.21 \times 10^3$ células/ μL vs. $0.26 \pm 0.07 \times 10^3$ células/ μL) y granulocitos ($11.10 \pm 5.25 \times 10^3$ células/ μL vs. $4.09 \pm 0.72 \times 10^3$ células/ μL). Encontramos que el número absoluto de las diferentes poblaciones leucocitarias analizadas (linfocitos, monocitos y granulocitos) muestran un

comportamiento similar al observado en las frecuencias leucocitarias. En linfocitos, encontramos que no existen diferencias significativas en el número de células entre pacientes con sepsis y sanos; aunque en adultos, esta población, si tiende a disminuir en pacientes con sepsis. El número absoluto de monocitos no presenta diferencias significativas entre sépticos y sanos en ambos grupos etarios; sin embargo, el número de monocitos tiende a ser mayor en neonatos sépticos respecto a sanos. Tampoco encontramos diferencias en cuanto al número de granulocitos en pacientes con sepsis y sanos, no obstante el número de granulocitos tiende a ser mayor en adultos con sepsis respecto a adultos sanos.

Al comparar el grupo de neonatos con sepsis contra el grupo de adultos con sepsis, encontramos que el número de linfocitos circulantes no presenta diferencias significativas entre ambos grupos, aunque el número de linfocitos tiende a ser mayor en neonatos. El número de monocitos es significativamente mayor en neonatos con sepsis en comparación con adultos con sepsis ($2.12 \pm 1.17 \times 10^3$ células/ μ L vs. $0.35 \pm 0.21 \times 10^3$ células/ μ L, $p \leq 0.05$). A diferencia de la tendencia observada en linfocitos y monocitos, el número de granulocitos tiende a ser menor en pacientes neonatos con sepsis.

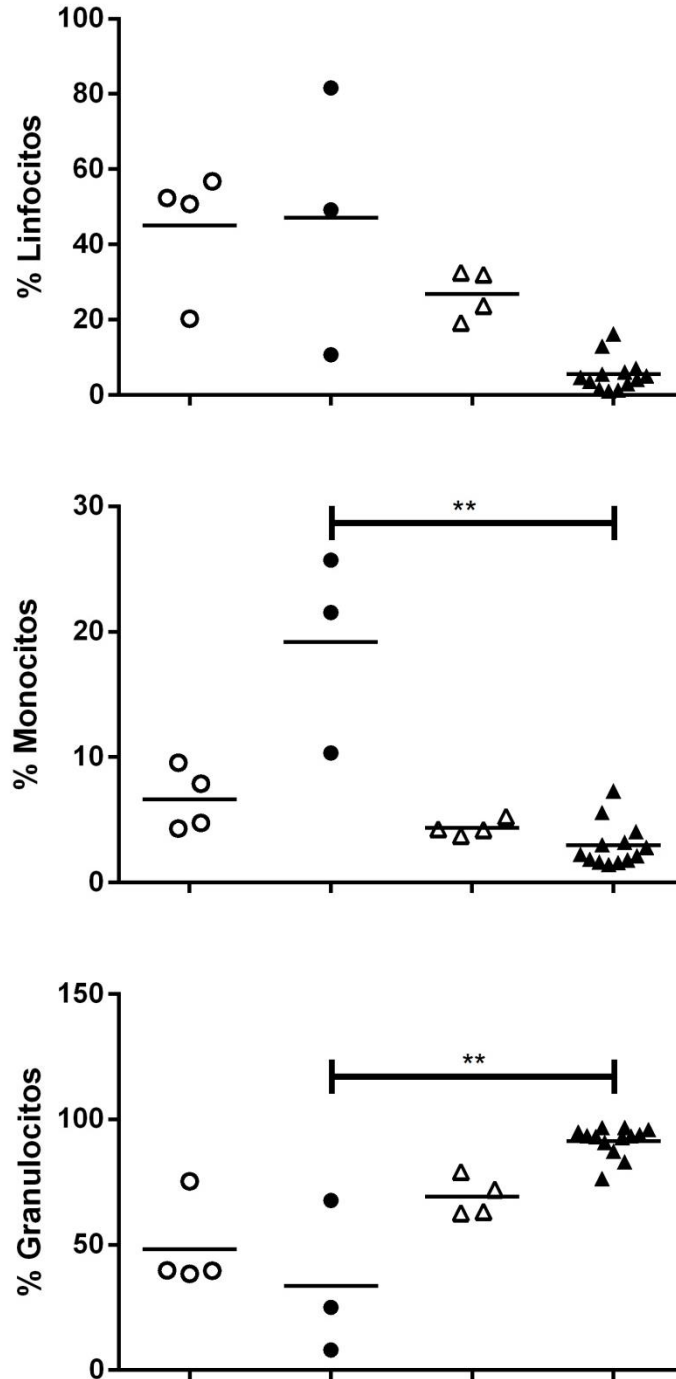


Figura 6. En los pacientes con sepsis neonatos, pero no en los adultos, aumenta la proporción de monocitos y disminuye la de granulocitos. Se muestran los porcentajes para las poblaciones mayoritarias de leucocitos en circulación de neonatos sanos (○, n=4), neonatos sépticos (●, n=3), adultos sanos (△, n=4) y adultos sépticos (▲, n=13). a) Porcentaje de linfocitos. b) Porcentaje de monocitos. c) Porcentaje de granulocitos. Se representan los valores individuales; las barras en cada columna representan la media. Prueba estadística: Kruskal-Wallis, post-hoc de Dunn (** = $p \leq 0.01$).

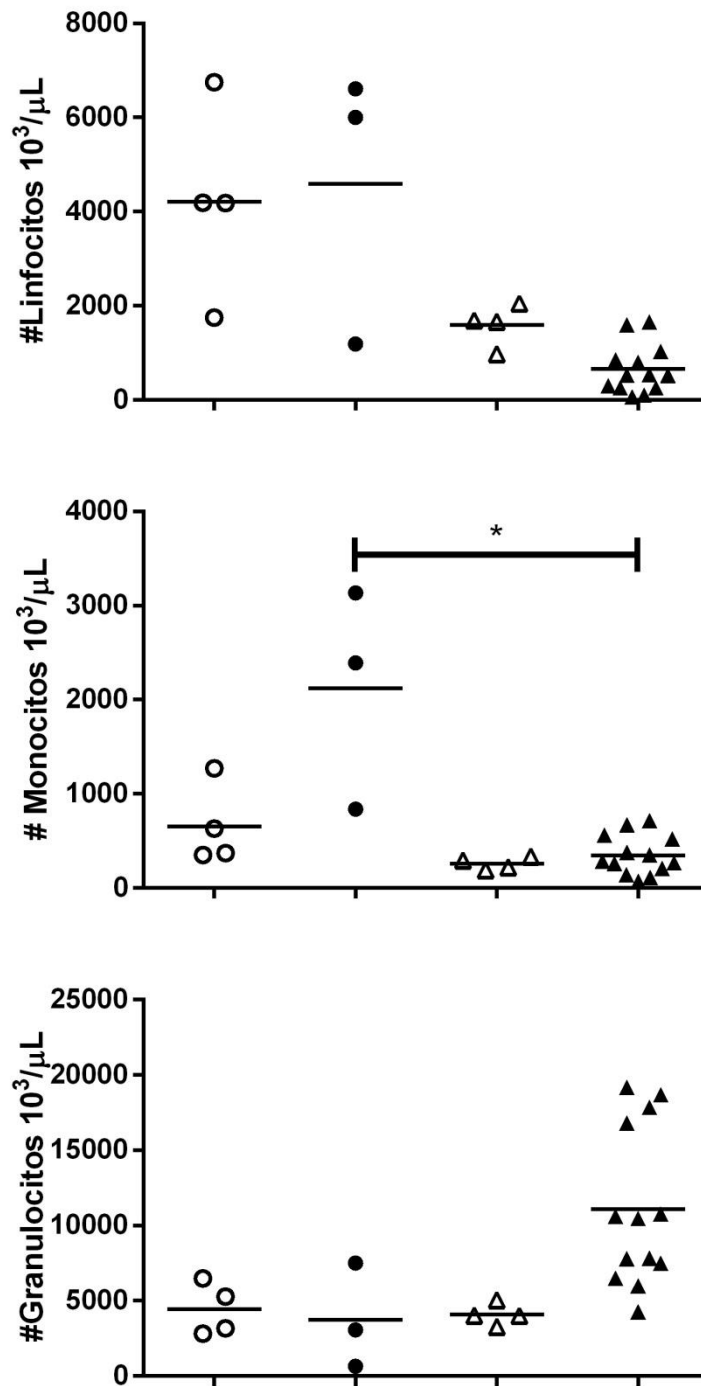


Figura 7. En neonatos con sepsis se incrementa el número absoluto de monocitos. Se muestran gráficos comparativos de los números absolutos de: a) linfocitos b) monocitos y c) granulocitos de: neonatos sanos (○, n=4), neonatos sépticos (●, n=3), adultos sanos (△, n=4) y adultos sépticos (▲, n=13). Las barras en cada grupo representan la media de los valores. Prueba estadística: Kruskal-Wallis, post-hoc de Dunn (* = p<0.05).

Evaluación de los marcadores de activación en células mieloides de sangre periférica y de cordón umbilical

Para la evaluación de los marcadores de activación en monocitos y granulocitos se determinó y comparó tanto el porcentaje de células positivas a cada marcador (HLA-DR, TREM-1, CD64 y CD69) como su expresión.

En cuanto a la proporción de monocitos HLA-DR+ (Figura 8a) no encontramos diferencias significativas entre los pacientes con sepsis y sanos, aunque en adultos si existe una tendencia a ser menor en sépticos. No obstante, si observamos que la expresión de HLA-DR (Figura 8b) disminuye significativamente en neonatos sépticos respecto a los sanos (674.9 ± 230.0 vs. 7587.0 ± 3131.0 , $p \leq 0.01$).

Al comparar los grupos de neonatos y adultos con sepsis, encontramos que el porcentaje de monocitos HLA-DR+ es significativamente mayor en neonatos sépticos respecto a adultos con sepsis ($10.7\% \pm 6.4\%$ vs $61.5\% \pm 38.8\%$, $p \leq 0.05$); sin embargo, no encontramos diferencias significativas en cuanto a la expresión de HLA-DR entre ambos grupos.

Respecto a TREM-1, no observamos diferencias significativas entre los distintos grupos en cuanto la frecuencia de monocitos TREM-1+ (Figura 9a), pero se observa una tendencia a ser menor en pacientes neonatos con sepsis respecto a sanos. Ahora bien, la expresión de TREM-1 (Figura 9b) en monocitos tiende a ser menor en neonatos sépticos respecto a neonatos sanos y de manera inversa en adultos, en quienes la expresión de TREM-1 tiende a ser mayor en sépticos en comparación con sanos; sin embargo, no encontramos diferencias significativas entre pacientes con y sin sepsis.

Cuando comparamos pacientes adultos y neonatos con sepsis, encontramos que la expresión de TREM-1 en monocitos de neonatos sépticos es significativamente menor respecto a la observada en monocitos de pacientes adultos con sepsis (264.0 ± 127.0 vs. 1986.0 ± 782.9 , $p \leq 0.05$).

En lo que respecta a CD64, la proporción de monocitos CD64+ (Figura 10a) no muestra diferencias significativas entre los grupos analizados; sin embargo, la expresión de CD64 (Figura 10b) muestra diferencias significativas entre neonatos sanos y sépticos, siendo menor la expresión de este marcador en neonatos con sepsis respecto a neonatos sanos (146.9 ± 91.3 vs 1964.7 ± 317.5 , $p \leq 0.001$).

Al comparar los grupos de neonatos y adultos con sepsis, no observamos diferencias significativas tanto en el porcentaje de monocitos CD64+ como en la expresión de CD64. No obstante, la expresión de CD64 tiende a ser menor en pacientes neonatos con sepsis respecto a adultos.

En cuanto al porcentaje de monocitos CD69+ (Figura 11a), no observamos diferencias significativas entre los pacientes con y sin sepsis. Observamos que la expresión de CD69 (Figura 11b) disminuye significativamente en neonatos sépticos respecto a sanos (176.0 ± 52.2 vs. 1809.8 ± 440.6 , $p \leq 0.01$), aunque en adultos no observamos diferencias significativas entre sujetos sanos y sépticos.

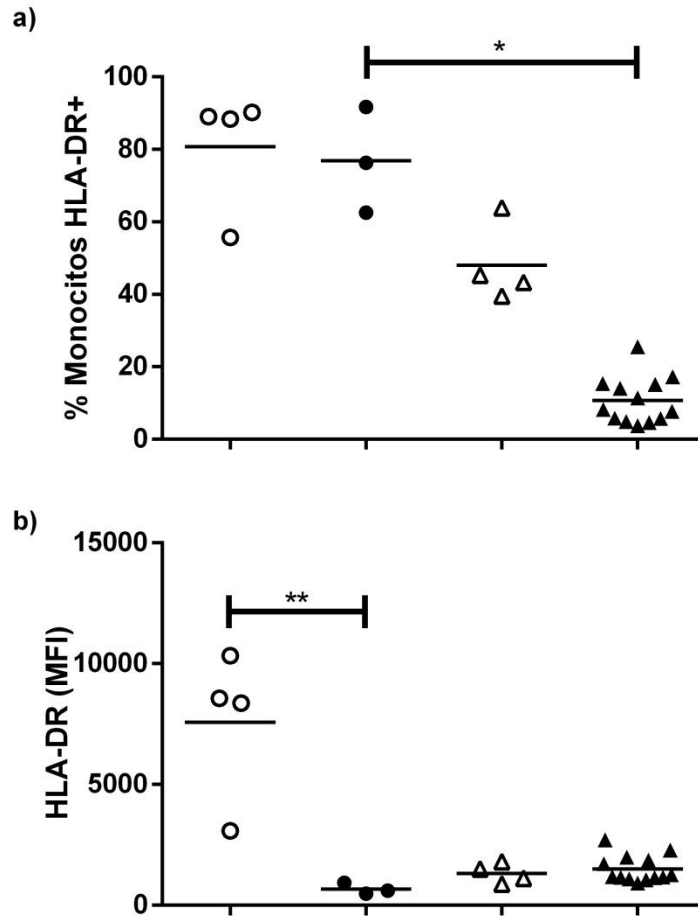


Figura 8. La expresión de HLA-DR en monocitos de pacientes neonatos con sepsis disminuye pero no se modifica en adultos. a) Porcentaje de monocitos HLA-DR+. b) Intensidad media de fluorescencia de monocitos HLA-DR+. Se representan los valores individuales de neonatos sanos (○, n=4), neonatos sépticos (●, n=3), adultos sanos (△, n=4) y adultos sépticos (▲, n=13); las barras representan la media de los valores. Prueba estadística: Kruskal-Wallis, post-hoc de Dunn (* = $p \leq 0.05$; ** = $p \leq 0.01$).

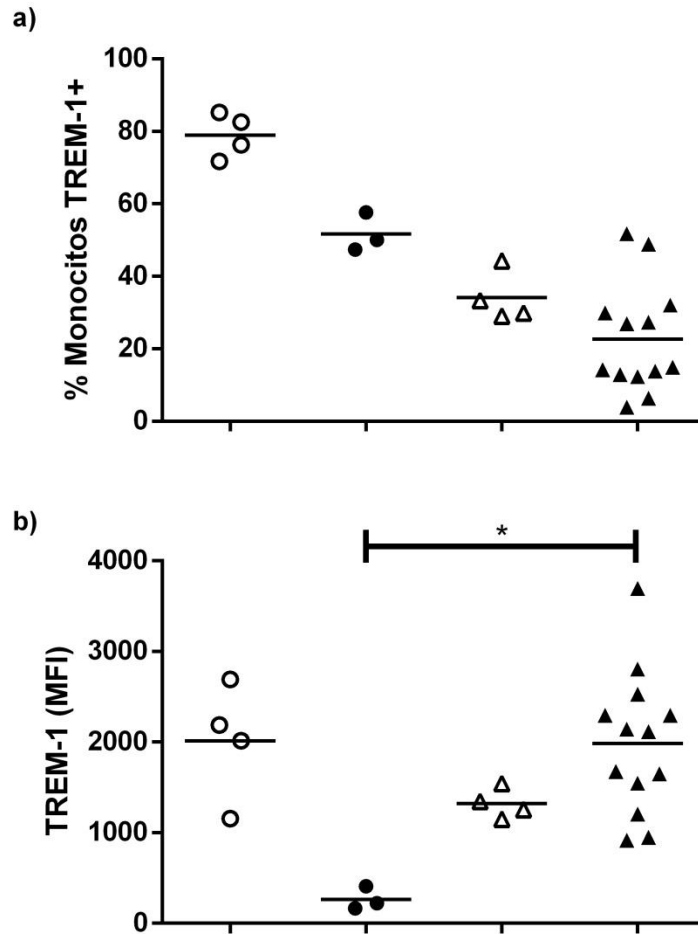


Figura 9. La expresión de TREM-1 en monocitos de neonatos con sepsis es significativamente menor que en adultos con sepsis. a) Porcentaje de monocitos TREM-1+. b) Intensidad media de fluorescencia de monocitos TREM-1+. Se representan los valores individuales de neonatos sanos (○, n=4), neonatos sépticos (●, n=3), adultos sanos (△, n=4) y adultos sépticos (▲, n=13); las barras representan la media de los valores. Prueba estadística: Kruskal-Wallis, post-hoc de Dunn (* = p<0.05).

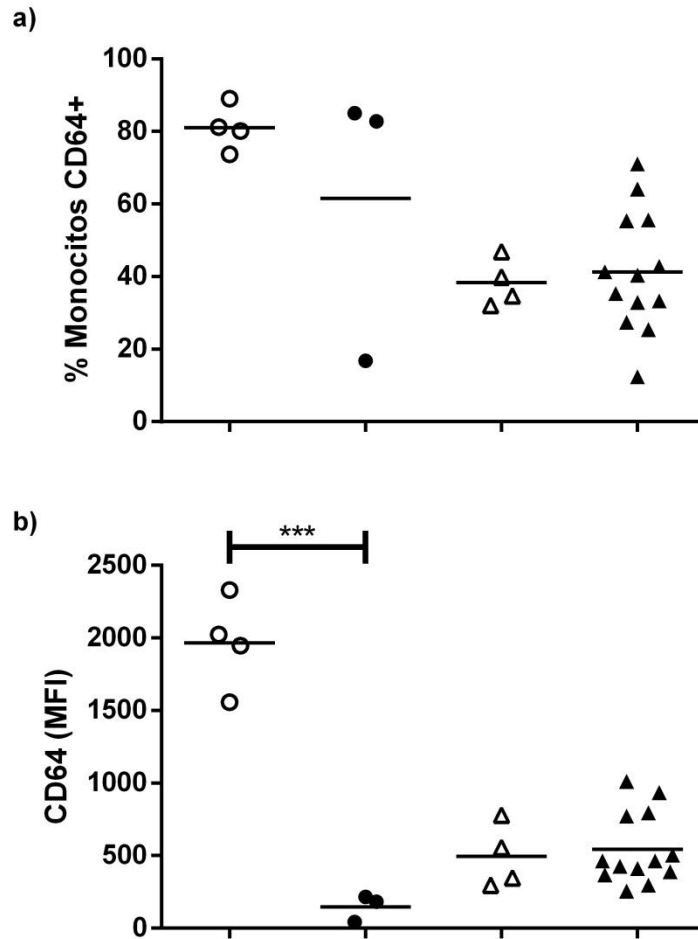


Figura 10. La expresión de CD64 en monocitos disminuye en pacientes neonatos sépticos. a) Porcentaje de monocitos CD64+. b) Intensidad media de fluorescencia de monocitos CD64+. Se representan los valores individuales de neonatos sanos (○, n=4), neonatos sépticos (●, n=3), adultos sanos (△, n=4) y adultos sépticos (▲, n=13); las barras representan la media de los valores. Prueba estadística: Kruskal-Wallis, post-hoc de Dunn (***) = $p \leq 0.001$.

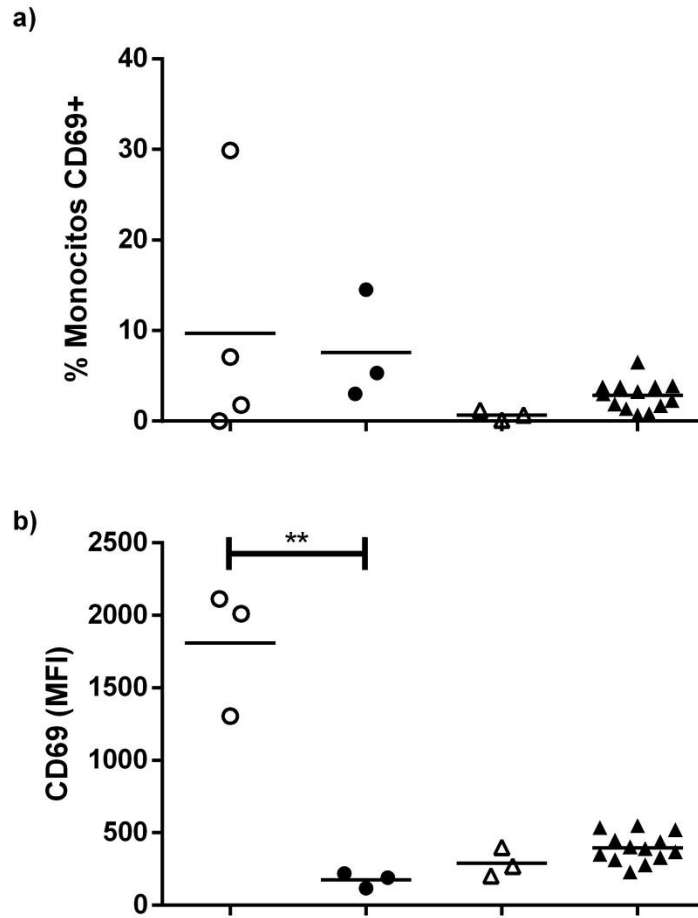


Figura 11. La expresión de CD69 disminuye en monocitos de neonatos con sepsis. a) Porcentaje de monocitos CD69+. b) Intensidad media de fluorescencia de monocitos CD69+. Se representan los valores individuales de neonatos sanos (○, n=4), neonatos sépticos (●, n=3), adultos sanos (△, n=4) y adultos sépticos (▲, n=13); las barras representan la media de los valores. Prueba estadística: Kruskal-Wallis, post-hoc de Dunn (** = p≤0.01).

En cuanto a la proporción de granulocitos TREM-1+ (Figura 12a) no encontramos diferencias significativas entre los pacientes con sepsis y sanos, aunque en ambos grupos etarios, si existe una tendencia a ser menor en sépticos. Ahora bien, la expresión de TREM-1 (Figura 12b) en granulocitos es significativamente menor en neonatos sépticos respecto a neonatos sanos (214.6 ± 83.4 vs. 2258.8 ± 867.9 , $p \leq 0.05$). Al comparar adultos con y sin sepsis no se observan diferencias significativas entre ambos grupos, no obstante, observamos que la expresión de TREM-1 tiende a ser mayor en sépticos en comparación con sanos.

Cuando comparamos pacientes neonatos y adultos con sepsis encontramos que la expresión de TREM-1 en granulocitos es significativamente menor en neonatos con respecto a adultos (214.6 ± 83.4 vs. 367.7 ± 101.5 , $p \leq 0.05$), sin embargo, no observamos diferencias significativas en cuanto a la proporción de granulocitos TREM-1+ entre ambos grupos.

Respecto a CD64, la proporción de granulocitos CD64+ (Figura 13a) no observamos diferencias significativas entre los grupos analizados; sin embargo, el porcentaje de granulocitos CD64+ tiende a ser mayor en adultos sépticos respecto a adultos sanos, no así en neonatos. Por otra parte, la expresión de CD64 en granulocitos (Figura 13b) es significativamente menor en pacientes neonatos con sepsis con respecto a neonatos sanos (113.2 ± 47.2 vs. 1195.0 ± 204.2); no así en pacientes adultos, los cuales no muestran una diferencia en la expresión de CD64 respecto a sujetos sanos.

Al comparar los grupos de neonatos y adultos con sepsis, no observamos diferencias significativas tanto en el porcentaje de granulocitos CD64+ como en la expresión de CD64. No obstante, la proporción de células CD64+ tiende a ser mayor en pacientes neonatos con respecto a adultos, mientras que la expresión de CD64 tiende a ser menor en pacientes neonatos con respecto a adultos.

En el caso de CD69, no observamos diferencias significativas en cuanto al porcentaje de granulocitos CD69+ (Figura 14a) entre pacientes con sepsis y sanos, pero observamos que la proporción de células CD69+ tiende a ser menor en neonatos con sepsis al compararlos con neonatos sanos; no así en el caso de adultos. Por otra parte,

la expresión de CD69 en granulocitos (Figura 14b) es significativamente menor en neonatos sépticos respecto a sanos (195.5 ± 34.6 vs. 2070.9 ± 604.1 , $p \leq 0.01$), no así en pacientes adultos.

Al comparar pacientes neonatos y adultos con sepsis encontramos que el porcentaje de granulocitos CD69+ es significativamente mayor en neonatos sépticos respecto a adultos con sepsis ($17.2\% \pm 5.7\%$ vs $3.1\% \pm 1.9\%$, $p \leq 0.05$); sin embargo, no encontramos diferencias significativas en cuanto a la expresión de CD69 entre ambos grupos.

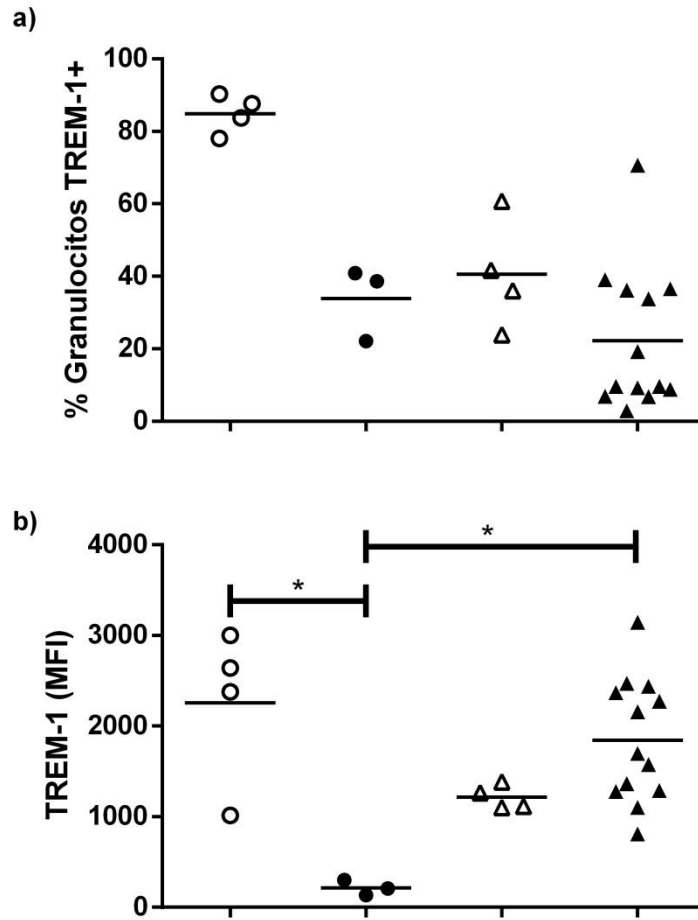


Figura 12. La expresión de TREM-1 se incrementa en granulocitos de adultos con sepsis y disminuye en pacientes neonatos. a) Porcentaje de granulocitos TREM-1+. b) Intensidad media de fluorescencia de granulocitos TREM-1+. Se representan los valores individuales de neonatos sanos (○, n=4), neonatos sépticos (●, n=3), adultos sanos (△, n=4) y adultos sépticos (▲, n=13); las barras representan la media de los valores. Prueba estadística: Kruskal-Wallis, post-hoc de Dunn (* = $p \leq 0.05$).

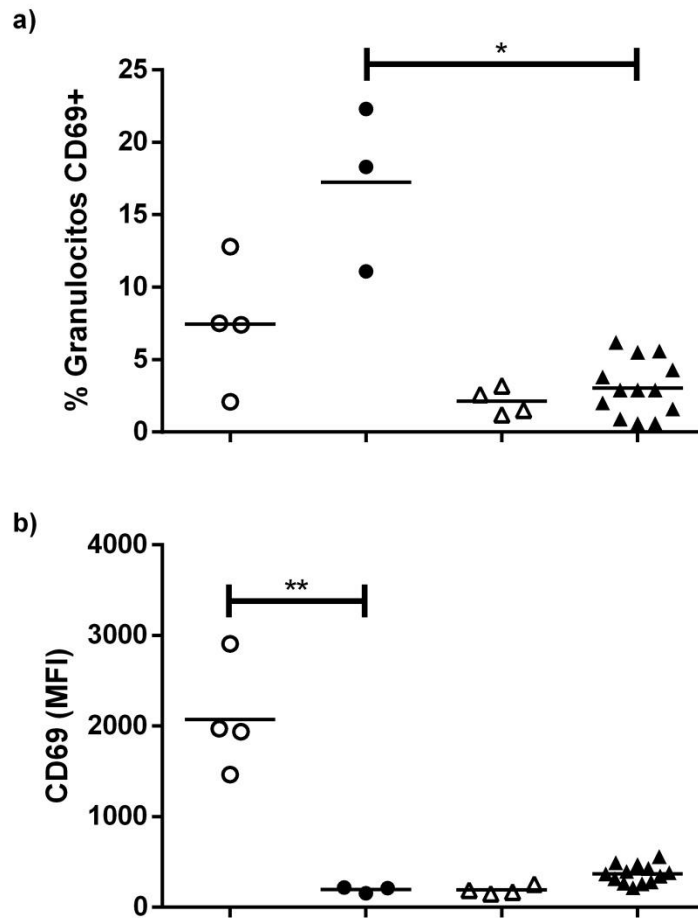


Figura 14. En neonatos con sepsis aumenta la proporción de granulocitos CD69+, aunque su expresión relativa disminuye respecto a sanos. a) Porcentaje de granulocitos CD69+. b) Intensidad media de fluorescencia de granulocitos CD69+. Se representan los valores individuales de neonatos sanos (○, n=4), neonatos sépticos (●, n=3), adultos sanos (△, n=4) y adultos sépticos (▲, n=13); las barras representan la media de los valores. Prueba estadística: Kruskal-Wallis, post-hoc de Dunn (* = p≤0.05; ** = p≤0.01).

Asociación de los cambios en la expresión de marcadores de superficie en leucocitos de sangre periférica de los pacientes con sepsis

Se evaluó la existencia de la correlación entre la expresión de los diferentes marcadores de superficie (CD64, TREM-1, CD69 y HLA-DR) en monocitos (Figura 15) y en granulocitos (Figura 16) de pacientes neonatos y adultos con sepsis.

Los pacientes neonatos con sepsis no mostraron correlación entre la expresión de CD69 y TREM-1; no obstante, tanto monocitos como granulocitos de pacientes adultos con sepsis presentan una correlación positiva entre la expresión de CD69 y la expresión de TREM-1 ($r_s = 0.6868$ y $p = 0.0118$); es decir que a medida que CD69 aumenta, TREM-1 también lo hace.

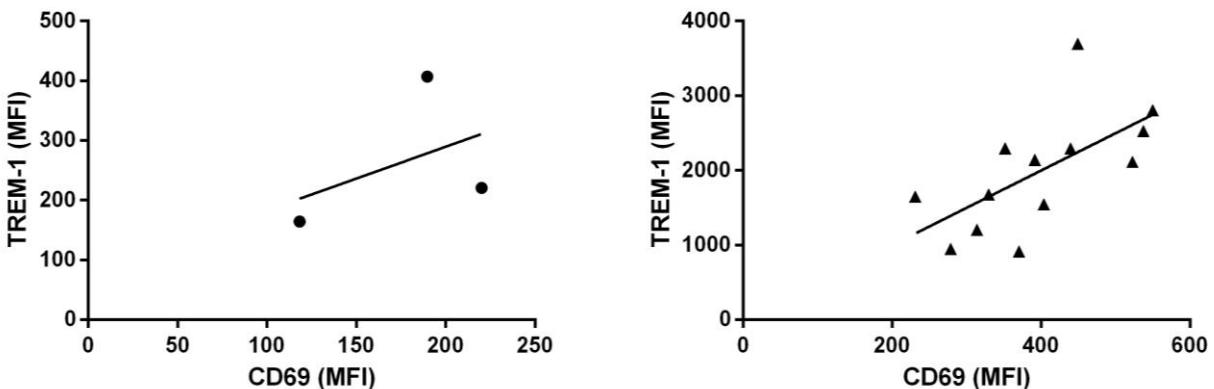


Figura 15. La expresión de CD69 correlaciona directamente con la de TREM-1 en la superficie de monocitos de adultos sépticos. La expresión de CD69 correlaciona positivamente con la expresión de TREM-1 en monocitos de pacientes adultos con sepsis ($r_s = 0.6868$ y $p = 0.0118$), no así en monocitos de neonatos con sepsis ($r_s = 0.5000$ y $p > 0.9999$). Se representan los valores individuales de neonatos sépticos (●, $n=3$) y adultos sépticos (▲, $n=13$). Correlación Rho de Spearman.

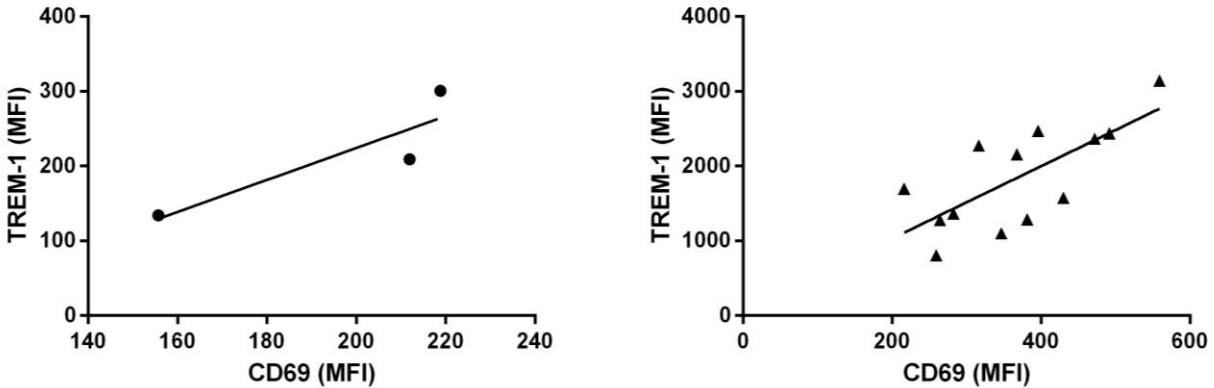


Figura 16. La expresión de CD69 correlaciona directamente con la de TREM-1 en la superficie de granulocitos de adultos sépticos. La expresión de CD69 correlaciona positivamente con la expresión de CD69 en granulocitos con sepsis ($r_s = 0.6868$ y $p = 0.0118$), no así en monocitos de neonatos con sepsis ($r_s = 1.000$ y $p = 0.3333$). Se representan los valores individuales de neonatos sépticos (●, $n=3$) y adultos sépticos (▲, $n=13$). Correlación Rho de Spearman. Correlación Rho de Spearman.

DISCUSIÓN

La sepsis es un problema de salud hospitalaria a nivel mundial asociado a la falta de tratamientos oportunos y/o específicos que se les debe dar a los pacientes. Esto por la dificultad que representa, en ocasiones, conocer su etiología, así como poder diferenciar entre las fases por y anti-inflamatorias. Además, se ha observado que las diferencias entre el sistema inmune de adultos y neonatos tienen implicaciones importantes en la patofisiología y el tratamiento de la sepsis en estos dos grupos etarios⁹⁶.

Tanto para entender mejor la fisiopatología del proceso séptico como en la búsqueda de biomarcadores, varios han sido los enfoques utilizados para explorar las modificaciones en la respuesta inmune, tanto de neonatos como de adultos. Sin embargo, pocos son los trabajos que comparan la expresión de biomarcadores solubles⁹¹, la distribución de leucocitos circulantes⁹⁷, o la expresión de algún marcador asociado a activación en estas células^{80, 98}, con los correspondientes grupos de sujetos sanos, entre pacientes adultos y neonatos con sepsis.

En el presente trabajo exploramos la distribución diferencial de los grupos mayoritarios de leucocitos circulantes y la expresión en estas mismas células de los marcadores asociados a activación: TREM-1, HLA-DR, CD69 y CD64.

Para establecer los porcentajes y números absolutos de linfocitos y monocitos de los sujetos incluidos en el estudio, contamos con el reporte de hemograma, así como del análisis por citometría de flujo. A este respecto observamos que la cuenta diferencial reportada por biometría hemática difiere de la obtenida mediante citometría de flujo. Dado que como se observa en la Figura 3, los patrones característicos para la clasificación de estos leucocitos por parámetro de tamaño y complejidad se modifican en pacientes con sepsis, tanto adultos como neonatos, pensamos que estas diferencias se deben a que el reporte del hemograma sólo se basa en estos dos valores con la utilización de plantillas de referencia pre-establecidas que si bien funcionan para muchas muestras, en estos pacientes pueden darse sub o sobre valoraciones. Dado que con el algoritmo que utilizamos para citometría de flujo se emplea conjuntamente los patrones de tamaño, complejidad y la expresión de marcadores de identificación como CD45, los datos obtenidos por esta técnica son los que utilizamos para las comparaciones en el resto del trabajo. Además, la diferencia en la cuenta diferencial leucocitaria de pacientes sépticos puede ser consecuencia de la alta proporción de agregados observados en estos pacientes, así como de la degranulación de neutrófilos, secundaria a su activación⁹⁹. La alta cantidad de agregados puede influir directamente sobre la cuenta diferencial leucocitaria obtenida mediante biometría hemática, ya que al identificar las poblaciones en base a su tamaño y complejidad, un agregado celular puede ser confundido con un tipo celular de alto tamaño y complejidad; empleando citometría de flujo esto se previene al emplear el algoritmo de identificación de leucocitos y eliminación de agregados (o detección de “singletes”). Por otra parte, si únicamente se toman en cuenta los parámetros de tamaño y complejidad, la degranulación de neutrófilos, al disminuir la complejidad de este tipo celular, puede ocasionar que éstos sean confundidos con otros leucocitos de menor complejidad.

Tomando en cuenta los datos tanto porcentuales como de números absolutos obtenidos mediante el análisis por citometría de flujo, se observa que, los controles sanos, tanto

de adultos como de neonatos, presentan porcentajes y números absolutos normales de acuerdo a los reportes existentes para cada una de las poblaciones celulares¹⁰⁰. Los pacientes neonatos con sepsis presentan granulocitopenia (menor a 6.02×10^3 células/ μL o menor a 61%), mientras que los adultos con sepsis presentan granulocitosis (mayor a 6.35×10^3 células/ μL o mayor a 80%) y linfopenia (menor a 1.1×10^3 células/ μL o menor a 14%). La disminución en el número de granulocitos en pacientes neonatos puede estar asociada tanto a la incapacidad para aumentar la proliferación de progenitores tempranos, como CFU-GM, como a la cantidad disminuida de neutrófilos preformados en la médula ósea de neonatos al momento de la infección¹⁰¹. Por otra parte, el incremento en el número de granulocitos en pacientes adultos puede estar compensando la pérdida de linfocitos, pues se ha reportado que en esta patología, estas células presentan gran cantidad de apoptosis¹⁰².

Los porcentajes correspondientes a cada uno de los tipos celulares muestran un incremento en la proporción de monocitos circulantes en neonatos con sepsis respecto a adultos con sepsis, quienes a su vez presentan un aumento en el porcentaje de granulocitos en comparación con neonatos sépticos. Dicho incremento en el porcentaje de monocitos puede estar actuando como un mecanismo de compensación ante los defectos en la funcionalidad de estas células³⁵, con el fin de contener la infección. La diferencia en la proporción de granulocitos entre pacientes adultos y neonatos con sepsis puede asociarse a la reserva de CFU-GM, pues reportes existentes señalan que el porcentaje de CFU-GM en reserva es mayor en adultos que en neonatos¹⁰¹.

En lo que respecta a HLA-DR, propuesto biomarcador para SIRS/sepsis¹⁰³, aun cuando observamos proporciones semejantes de monocitos HLA-DR+ entre neonatos sépticos y sanos, la expresión de HLA-DR es menor en neonatos sépticos. Dicha disminución en la expresión de HLA-DR podría estar asociada a la presencia de un ambiente anti-inflamatorio, pues se ha demostrado que existe una correlación inversa entre la expresión de HLA-DR y la concentración de IL-10 y TGF- β o el ratio de IL-10/TNF- α ⁷⁶. Esta disminución, también podría encontrarse relacionada con la baja proporción de monocitos no clásicos (CD14+ CD16+) en neonatos sépticos, ya que se ha demostrado que estos monocitos tienen mayor expresión de HLA-DR en comparación con los

monocitos clásicos^{104, 105}. Además, se ha observado que éstos monocitos CD14+ CD16+ producen mayor cantidad de TNF- α y una nula o baja cantidad de IL-10¹⁰⁵. La baja expresión de HLA-DR en neonatos sépticos, respecto a neonatos sanos, podría tener un impacto directo sobre la funcionalidad de éstos leucocitos, puesto que la expresión de HLA-DR resulta esencial para el procesamiento y la presentación antigénica a linfocitos T CD4+. Sin embargo, esta disminución en la expresión de HLA-DR también podría estar actuando como un mecanismo de regulación a fin de evitar un daño mayor debido a una sobreactivación.

En cuanto a TREM-1, contrario a lo que se esperaba, observamos disminución de TREM-1 en la superficie de granulocitos, de neonatos con sepsis respecto a sanos. Estudios previos han reportado el aumento en la expresión de TREM-1 en la superficie de neutrófilos, monocitos y macrófagos al estimularlos con LPS, bacterias Gram-positivas y Gram-negativas; sin embargo, también se ha reportado el aumento en los niveles de sTREM-1 en neonatos con sepsis tardía⁸⁹. Dicha disminución en la expresión de TREM-1 en la superficie de granulocitos de neonatos sépticos podría correlacionar con un aumento en los niveles de sTREM-1 en el suero de estos pacientes, pues se ha observado que neutrófilos de sujetos sanos retados con LPS muestran inicialmente niveles elevados de TREM-1 en su superficie, los cuales disminuyen progresivamente a medida que sTREM-1 aumenta⁸⁸.

Por otra parte, monocitos de neonatos sépticos muestran menor expresión de TREM-1 en comparación a adultos sépticos. Dicha expresión, podría estar relacionada con la cantidad de monocitos no clásicos (CD14+ CD16+), pues existen reportes de incrementos en la expresión de TREM-1 en la superficie de estos monocitos de pacientes con SIRS, y no así en monocitos clásicos (CD14+ CD16-)¹⁰⁶. Tal y como se observa en la Figura 4, la proporción de monocitos no clásicos pareciera ser menor en neonatos que en adultos con sepsis; esto puede afectar directamente la expresión de TREM-1, así que sería conveniente en un futuro comparar las frecuencias de monocitos clásicos y no clásicos en grupos de estudio como los que aquí utilizamos.

Al comparar la expresión de TREM-1 en granulocitos de pacientes neonatos y adultos con sepsis, se observa un comportamiento similar al observado en monocitos.

Resultados previos de nuestro grupo de trabajo han mostrado una correlación negativa entre la expresión de CD16 y la concentración de sTREM-1 en granulocitos de pacientes adultos con sepsis¹⁰⁷. Al igual que en monocitos, la expresión de CD16 en granulocitos de neonatos con sepsis parece ser menor que la observada en adultos con sepsis, de manera que esperaríamos observar una mayor concentración de sTREM-1 en el suero de pacientes neonatos respecto a pacientes adultos. Cabe destacar que se ha propuesto que TREM-1 en forma soluble activa ineficientemente las vías de transducción de señales, al carecer de un dominio transmembranal que interaccione con DAP12, sugiriendo que sTREM-1 es un mecanismo por el cual las células regulan la señalización de TREM-1^{85, 108, 109} con la finalidad de evitar una respuesta inflamatoria exacerbada.

En lo que respecta a CD64, no observamos cambios significativos en la expresión de este marcador tanto en monocitos como en granulocitos de pacientes adultos con sepsis, contrario a lo que sugerían trabajos previos donde se reportan incrementos en dicho marcador⁷⁷. Sin embargo, sí observamos la disminución en la expresión de CD64 en monocitos y granulocitos de pacientes neonatos con sepsis. Actualmente sólo existen un par de trabajos publicados acerca de la expresión de CD64 en monocitos de neonatos sépticos cuyos resultados contrastan con los obtenidos, pues ambos reportan un incremento en la expresión de CD64^{80, 110}. La disminución en la expresión de CD64, en monocitos y granulocitos de neonatos con sepsis, puede asociarse a la reducción de cerca del 70% en la síntesis de GM-CSF en recién nacidos y de cerca del 90% en neonatos pre-término en comparación con adultos sanos¹¹¹, pues se ha demostrado que tanto IFN- γ como GM-CSF inducen la expresión de CD64 en monocitos y granulocitos^{78, 112}. Valdría la pena determinar los niveles de GM-CSF, ya que además de explicar la disminución de CD64 en la superficie de granulocitos de neonatos sépticos, podría a su vez explicar el menor porcentaje de granulocitos observado en neonatos con sepsis respecto a adultos con sepsis.

La expresión disminuida de CD64 en neonatos con sepsis con respecto a neonatos sanos podría indicar una disminución en la activación de monocitos, la cual traería

como consecuencia una disminución en la síntesis de mediadores pro-inflamatorios y en la fagocitosis de los microorganismos causantes de la patología^{113, 114}.

Respecto a CD69, la disminución en la expresión de este marcador tanto en monocitos como en granulocitos, de pacientes neonatos con sepsis respecto a controles sanos, podría relacionarse con un ambiente predominantemente anti-inflamatorio, pues se ha reportado que la expresión de CD69 se incrementa en respuesta a mediadores pro-inflamatorios como IFN- γ y GM-CSF¹¹⁵, por lo que sería conveniente hacer la correlación de los marcadores de superficie celular con las determinaciones de mediadores pro y anti-inflamatorios en suero. Reportes existentes señalan que en presencia de un estímulo inflamatorio, anticuerpos monoclonales anti-CD69, incrementan la concentración de TNF- α , la secreción de óxido nítrico por monocitos y la degranulación de neutrófilos, sugiriendo que CD69 pudiera actuar como un receptor pro-inflamatorio^{81, 98}.

La correlación positiva observada entre la expresión de CD69 y TREM-1 en monocitos y granulocitos de pacientes adultos con sepsis podría explicarse por la interacción de TREM-1 con sus ligandos, ya que se ha observado que dicha interacción promueve la síntesis de citocinas pro-inflamatorias¹¹⁵; de tal manera que una mayor expresión de TREM-1 supondría un aumento en la presencia de mediadores inflamatorios. Estos mediadores a su vez, podrían estar favoreciendo el aumento en la expresión de CD69, pues como anteriormente se mencionó, este marcador se ha propuesto como un receptor pro-inflamatorio^{81, 98}. Recientemente se ha propuesto que la interacción de CD69 con su ligando, promueve la síntesis de TGF- β como un mecanismo capaz de atenuar la respuesta inflamatoria¹¹⁵, lo que nos hace suponer que el aumento en la expresión de este marcador tanto en monocitos como en granulocitos de pacientes adultos podría indicar el inicio de una respuesta compensatoria ante una respuesta pro-inflamatoria excesiva.

CONCLUSIÓN

Aunque diferenciales entre neonatos y adultos, los inmunofenotipos generados con los marcadores HLA-DR, TREM-1, CD64 y CD69 como parte de un panel biomarcador basado en la inmunofenotipificación de monocitos y neutrófilos pueden ser de utilidad adultos y en neonatos con sepsis.

REFERENCIAS

1. Villarreal, G., Zagorski, J. & Wahl, S. in Encyclopedia of Life Sciences 1-8 (Nature Publishing Group, 2001).
2. Medzhitov, R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature* **449**, 819-826 (2007).
3. Ortega-Gomez, A., Perretti, M. & Soehnlein, O. Resolution of inflammation: an integrated view. *EMBO molecular medicine* **5**, 661-674 (2013).
4. Bianchi, M.E. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *Journal of leukocyte biology* **81**, 1-5 (2007).
5. Medzhitov, R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* **454**, 428-435 (2008).
6. Serhan, C.N. *et al.* Resolution of inflammation: state of the art, definitions and terms. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **21**, 325-332 (2007).
7. Soehnlein, O. & Lindbom, L. Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation. *Nature reviews. Immunology* **10**, 427-439 (2010).
8. Serhan, C.N., Chiang, N. & Van Dyke, T.E. Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. *Nature reviews. Immunology* **8**, 349-361 (2008).
9. Serhan, C.N. & Savill, J. Resolution of inflammation: the beginning programs the end. *Nature immunology* **6**, 1191-1197 (2005).
10. Bannenberg, G.L. *et al.* Molecular circuits of resolution: formation and actions of resolvins and protectins. *J Immunol* **174**, 4345-4355 (2005).
11. Goris, R.J. MODS/SIRS: result of an overwhelming inflammatory response? *World journal of surgery* **20**, 418-421 (1996).
12. Weigand, M., Hörner, C., Bardenheuer, H. & Bouchon, A. The systemic inflammatory response syndrome. *Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology* **18**, 455-475 (2004).
13. Gruys, E., Toussaint, M.J., Niewold, T.A. & Koopmans, S.J. Acute phase reaction and acute phase proteins. *Journal of Zhejiang University. Science. B* **6**, 1045-1056 (2005).
14. Fiuza, C. *et al.* Inflammation-promoting activity of HMGB1 on human microvascular endothelial cells. *Blood* **101**, 2652-2660 (2003).
15. Schouten, M., Wiersinga, W.J., Levi, M. & van der Poll, T. Inflammation, endothelium, and coagulation in sepsis. *Journal of leukocyte biology* **83**, 536-545 (2008).
16. Laszlo, M., Hoesel, P. & Ward, A. Mechanisms of inflammatory response syndrome in sepsis. *Drug Discovery Today* **1**, 345-350 (2004).
17. Levy, M.M. *et al.* 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Critical care medicine* **31**, 1250-1256 (2003).
18. Robertson, C.C., C. The systemic inflammatory response syndrome. *Microbes and Infection* **8**, 1382-1389 (2006).
19. Hall, M.J., Williams, S.N., DeFrances, C.J. & Golosinskiy, A. Inpatient care for septicemia or sepsis: a challenge for patients and hospitals. *NCHS data brief*, 1-8 (2011).

20. Kisson, N. *et al.* World Federation of Pediatric Intensive Care and Critical Care Societies: Global Sepsis Initiative. *Pediatric critical care medicine : a journal of the Society of Critical Care Medicine and the World Federation of Pediatric Intensive and Critical Care Societies* **12**, 494-503 (2011).
21. Carrillo, R., Carrillo, J. & Carrillo, L. Estudio epidemiológico de la sepsis en unidades de terapia intensiva mexicanas. *Cirugía y Cirujanos* **77**, 301-308 (2009).
22. Ganatra, H.A., Stoll, B.J. & Zaidi, A.K. International perspective on early-onset neonatal sepsis. *Clinics in perinatology* **37**, 501-523 (2010).
23. Vergnano, S., Sharland, M., Kazembe, P., Mwansambo, C. & Heath, P.T. Neonatal sepsis: an international perspective. *Archives of disease in childhood. Fetal and neonatal edition* **90**, F220-224 (2005).
24. Wang, H.E. *et al.* Chronic medical conditions and risk of sepsis. *PloS one* **7**, e48307 (2012).
25. Newton, E.R. Preterm labor, preterm premature rupture of membranes, and chorioamnionitis. *Clinics in perinatology* **32**, 571-600 (2005).
26. Gupta, S.J., M. Sepsis, septic shock and multiple organ failure. *Anaesthesia and Intensive Care Medicine* **7**, 143-146 (2006).
27. Cébulo, A., Ortíz, F. & Arredondo, J. La respuesta inmune celular del neonato. *Revista de Perinatología y Reproducción Humana* **14**, 88-97 (2000).
28. Lilic, D. Immune Response to Infection. *Anaesthesia and Intensive Care Medicine* **10**, 218-220 (2009).
29. Turvey, S.E. & Broide, D.H. Innate immunity. *The Journal of allergy and clinical immunology* **125**, S24-32 (2010).
30. Hansson, G.K., Libby, P., Schonbeck, U. & Yan, Z.Q. Innate and adaptive immunity in the pathogenesis of atherosclerosis. *Circulation research* **91**, 281-291 (2002).
31. Marodi, L. Innate cellular immune responses in newborns. *Clin Immunol* **118**, 137-144 (2006).
32. Gregory, G. & Andropoulos, D. White Blood cell count and differential count during the first 2 weeks of life, in *Practice of Pediatric Anesthesia*, Edn. 5. (ed. Wiley-Blackwell) 4802011).
33. Katsares, V. *et al.* Reference Ranges for Umbilical Cord Blood Hematological Values. *LabMedicine* **40**, 437-439 (2009).
34. Marodi, L. Deficient interferon-gamma receptor-mediated signaling in neonatal macrophages. *Acta Paediatr Suppl* **91**, 117-119 (2002).
35. Birle, A., Nebe, C.T. & Gessler, P. Age-related low expression of HLA-DR molecules on monocytes of term and preterm newborns with and without signs of infection. *Journal of perinatology : official journal of the California Perinatal Association* **23**, 294-299 (2003).
36. Brugnani, D. *et al.* Ineffective expression of CD40 ligand on cord blood T cells may contribute to poor immunoglobulin production in the newborn. *European journal of immunology* **24**, 1919-1924 (1994).
37. Durandy, A. *et al.* Undetectable CD40 ligand expression on T cells and low B cell responses to CD40 binding agonists in human newborns. *J Immunol* **154**, 1560-1568 (1995).

38. Filias, A. *et al.* Phagocytic ability of neutrophils and monocytes in neonates. *BMC pediatrics* **11**, 29 (2011).
39. Levy, O. Innate immunity of the newborn: basic mechanisms and clinical correlates. *Nature reviews. Immunology* **7**, 379-390 (2007).
40. Wynn, J.L., Neu, J., Moldawer, L.L. & Levy, O. Potential of immunomodulatory agents for prevention and treatment of neonatal sepsis. *Journal of perinatology : official journal of the California Perinatal Association* **29**, 79-88 (2009).
41. Hotchkiss, R.S., Coopersmith, C.M., McDunn, J.E. & Ferguson, T.A. The sepsis seesaw: tilting toward immunosuppression. *Nature medicine* **15**, 496-497 (2009).
42. Kleinpell, R.M., Graves, B.T. & Ackerman, M.H. Incidence, pathogenesis, and management of sepsis: an overview. *AACN advanced critical care* **17**, 385-393 (2006).
43. Martins, P.S. *et al.* Upregulation of reactive oxygen species generation and phagocytosis, and increased apoptosis in human neutrophils during severe sepsis and septic shock. *Shock* **20**, 208-212 (2003).
44. Parent, C. & Eichacker, P.Q. Neutrophil and endothelial cell interactions in sepsis. The role of adhesion molecules. *Infectious disease clinics of North America* **13**, 427-447, x (1999).
45. Cavaillon, J.M., Adib-Conquy, M., Cloez-Tayarani, I. & Fitting, C. Immunodepression in sepsis and SIRS assessed by ex vivo cytokine production is not a generalized phenomenon: a review. *Journal of endotoxin research* **7**, 85-93 (2001).
46. Adib-Conquy, M. & Cavaillon, J.M. Compensatory anti-inflammatory response syndrome. *Thrombosis and haemostasis* **101**, 36-47 (2009).
47. Bone, R.C. Immunologic dissonance: a continuing evolution in our understanding of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS) and the multiple organ dysfunction syndrome (MODS). *Annals of internal medicine* **125**, 680-687 (1996).
48. Netea, M.G., van der Meer, J.W., van Deuren, M. & Kullberg, B.J. Proinflammatory cytokines and sepsis syndrome: not enough, or too much of a good thing? *Trends in immunology* **24**, 254-258 (2003).
49. Biswas, S.K. & Lopez-Collazo, E. Endotoxin tolerance: new mechanisms, molecules and clinical significance. *Trends in immunology* **30**, 475-487 (2009).
50. Wang, T.S. & Deng, J.C. Molecular and cellular aspects of sepsis-induced immunosuppression. *J Mol Med (Berl)* **86**, 495-506 (2008).
51. Mikolajczyk, T.P. *et al.* Interaction of human peripheral blood monocytes with apoptotic polymorphonuclear cells. *Immunology* **128**, 103-113 (2009).
52. Gaieski, D.F. *et al.* Impact of time to antibiotics on survival in patients with severe sepsis or septic shock in whom early goal-directed therapy was initiated in the emergency department. *Critical care medicine* **38**, 1045-1053 (2010).
53. Kumar, A. *et al.* Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock. *Critical care medicine* **34**, 1589-1596 (2006).
54. Nystrom, P.O. The systemic inflammatory response syndrome: definitions and aetiology. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* **41 Suppl A**, 1-7 (1998).
55. Afsharpaiman, S. *et al.* Trends in incidence of neonatal sepsis and antibiotic susceptibility of causative agents in two neonatal intensive care units in tehran, I.R Iran. *Journal of clinical neonatology* **1**, 124-130 (2012).

56. Goetzl, L. *et al.* Maternal epidural use and neonatal sepsis evaluation in afebrile mothers. *Pediatrics* **108**, 1099-1102 (2001).
57. Collado, F. *Patología infantil estructurada: bases fisiopatológicas del diagnóstico y tratamiento*, Vol. 1. (Capitel, 1984).
58. Rapsang, A.G. & Shyam, D.C. Scoring systems in the intensive care unit: A compendium. *Indian journal of critical care medicine : peer-reviewed, official publication of Indian Society of Critical Care Medicine* **18**, 220-228 (2014).
59. Silva, I., Moody, G., Scott, D.J., Celi, L.A. & Mark, R.G. Predicting In-Hospital Mortality of ICU Patients: The PhysioNet/Computing in Cardiology Challenge 2012. *Computing in cardiology* **39**, 245-248 (2012).
60. Towns, M.L., Jarvis, W.R. & Hsueh, P.R. Guidelines on blood cultures. *Journal of microbiology, immunology, and infection = Wei mian yu gan ran za zhi* **43**, 347-349 (2010).
61. Wang, K., Bhandari, V., Chepustanova, S., Huber, G., O'Hara, S., O'Hern, C., Shattuck, M. & Kirby, M. Which Biomarkers Reveal Neonatal Sepsis? *Ploze One* **8**, 1-8 (2013).
62. Grace, C.J., Lieberman, J., Pierce, K. & Littenberg, B. Usefulness of blood culture for hospitalized patients who are receiving antibiotic therapy. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* **32**, 1651-1655 (2001).
63. Riedel, S. & Carroll, K.C. Laboratory detection of sepsis: biomarkers and molecular approaches. *Clinics in laboratory medicine* **33**, 413-437 (2013).
64. Ventetuolo, C.E. & Levy, M.M. Biomarkers: diagnosis and risk assessment in sepsis. *Clinics in chest medicine* **29**, 591-603, vii (2008).
65. Ng, P.C. Diagnostic markers of infection in neonates. *Archives of disease in childhood. Fetal and neonatal edition* **89**, F229-235 (2004).
66. Vincent, J.L., Donadello, K. & Schmit, X. Biomarkers in the critically ill patient: C-reactive protein. *Critical care clinics* **27**, 241-251 (2011).
67. Sankar, V. & Webster, N.R. Clinical application of sepsis biomarkers. *Journal of anaesthesia* **27**, 269-283 (2013).
68. Mokart, D. *et al.* Procalcitonin, interleukin 6 and systemic inflammatory response syndrome (SIRS): early markers of postoperative sepsis after major surgery. *British journal of anaesthesia* **94**, 767-773 (2005).
69. Reinhart, K. & Meisner, M. Biomarkers in the critically ill patient: procalcitonin. *Critical care clinics* **27**, 253-263 (2011).
70. Boskabadi, H., Maamouri, G., Afshari, J.T., Ghayour-Mobarhan, M. & Shakeri, M.T. Serum interleukin 8 level as a diagnostic marker in late neonatal sepsis. *Iranian journal of pediatrics* **20**, 41-47 (2010).
71. Dellinger, R.P. Inflammation and Coagulation: Implications for the Septic Patient. *Clinical Infectious Diseases* **36**, 1259-1265 (2003).
72. Evans, J.H. *et al.* A distinct subset of human NK cells expressing HLA-DR expand in response to IL-2 and can aid immune responses to BCG. *European journal of immunology* **41**, 1924-1933 (2011).
73. Salgado, F.J. *et al.* Interleukin-dependent modulation of HLA-DR expression on CD4 and CD8 activated T cells. *Immunology and cell biology* **80**, 138-147 (2002).

74. Ng, P.C. *et al.* Quantitative measurement of monocyte HLA-DR expression in the identification of early-onset neonatal infection. *Biology of the neonate* **89**, 75-81 (2006).
75. Genel, F., Atlıhan, F., Ozsu, E. & Ozbek, E. Monocyte HLA-DR expression as predictor of poor outcome in neonates with late onset neonatal sepsis. *The Journal of infection* **60**, 224-228 (2010).
76. Lekkou, A., Karakantza, M., Mouzaki, A., Kalfarentzos, F. & Gogos, C.A. Cytokine production and monocyte HLA-DR expression as predictors of outcome for patients with community-acquired severe infections. *Clinical and diagnostic laboratory immunology* **11**, 161-167 (2004).
77. Hirsh, M., Mahamid, E., Bashenko, Y., Hirsh, I. & Krausz, M.M. Overexpression of the high-affinity Fcγ receptor (CD64) is associated with leukocyte dysfunction in sepsis. *Shock* **16**, 102-108 (2001).
78. Barth, E. *et al.* Differences in the expression of CD64 and mCD14 on polymorphonuclear cells and on monocytes in patients with septic shock. *Cytokine* **14**, 299-302 (2001).
79. Maeda, M. *et al.* Differential expression of Fc receptors for IgG by monocytes and granulocytes from neonates and adults. *Clinical and experimental immunology* **103**, 343-347 (1996).
80. Ng, P.C. *et al.* Neutrophil CD64 is a sensitive diagnostic marker for early-onset neonatal infection. *Pediatric research* **56**, 796-803 (2004).
81. Sancho, D., Gomez, M. & Sanchez-Madrid, F. CD69 is an immunoregulatory molecule induced following activation. *Trends in immunology* **26**, 136-140 (2005).
82. Hodge, G., Hodge, S., Han, P. & Haslam, R. Multiple leucocyte activation markers to detect neonatal infection. *Clinical and experimental immunology* **135**, 125-129 (2004).
83. Holub, M. *et al.* Lymphocyte subset numbers depend on the bacterial origin of sepsis. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* **9**, 202-211 (2003).
84. Hotoura, E., Giapros, V., Kostoula, A., Spirou, P. & Andronikou, S. Tracking Changes of Lymphocytes Subsets and Pre-inflammatory Mediators in Full-term Neonates with Suspected or Documented Infection. *Scandinavian journal of immunology* **73**, 250-255 (2011).
85. Bouchon, A., Dietrich, J. & Colonna, M. Inflammatory Responses Can Be Triggered by TREM-1, a Novel Receptor Expressed on Neutrophils and Monocytes. *Journal of Immunology* **16**, 4991-4995 (2000).
86. Gibot, S. Clinical review: role of triggering receptor expressed on myeloid cells-1 during sepsis. *Crit Care* **9**, 485-489 (2005).
87. Bouchon, A., Facchetti, F., Weigand, M.A. & Colonna, M. TREM-1 amplifies inflammation and is a crucial mediator of septic shock. *Nature* **410**, 1103-1107 (2001).
88. Knapp, S. *et al.* Cutting edge: expression patterns of surface and soluble triggering receptor expressed on myeloid cells-1 in human endotoxemia. *J Immunol* **173**, 7131-7134 (2004).

89. Adly, A.A., Ismail, E.A., Andrawes, N.G. & El-Saadany, M.A. Circulating soluble triggering receptor expressed on myeloid cells-1 (sTREM-1) as diagnostic and prognostic marker in neonatal sepsis. *Cytokine* **65**, 184-191 (2014).
90. Casserly, B., Read, R. & Levy, M.M. Multimarker panels in sepsis. *Critical care clinics* **27**, 391-405 (2011).
91. Kofoed, K., Eugen-Olsen, J., Petersen, J., Larsen, K. & Andersen, O. Predicting mortality in patients with systemic inflammatory response syndrome: an evaluation of two prognostic models, two soluble receptors, and a macrophage migration inhibitory factor. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology* **27**, 375-383 (2008).
92. Shapiro, N.I. *et al.* A prospective, multicenter derivation of a biomarker panel to assess risk of organ dysfunction, shock, and death in emergency department patients with suspected sepsis. *Critical care medicine* **37**, 96-104 (2009).
93. Wilson, C.B. An updated Declaration of Helsinki will provide more protection. *Nature medicine* **19**, 664 (2013).
94. Shaw, D. & McMahon, A. Ethicovigilance in clinical trials. *Bioethics* **27**, 508-513 (2013).
95. Vollmer, S.H. & Howard, G. Statistical power, the Belmont report, and the ethics of clinical trials. *Science and engineering ethics* **16**, 675-691 (2010).
96. Wheeler, D.S., Wong, H. & Zingarelli, B. Children are not small adults! *The Open Inflammation Journal* **4**, 4-15 (2011).
97. Venet, F. *et al.* Early assessment of leukocyte alterations at diagnosis of septic shock. *Shock* **34**, 358-363 (2010).
98. Ramirez, R., Carracedo, J., Castedo, M., Zamzami, N. & Kroemer, G. CD69-induced monocyte apoptosis involves multiple nonredundant signaling pathways. *Cellular immunology* **172**, 192-199 (1996).
99. Amulic, B., Cazalet, C., Hayes, G.L., Metzler, K.D. & Zychlinsky, A. Neutrophil function: from mechanisms to disease. *Annual review of immunology* **30**, 459-489 (2012).
100. Basford, C., Forraz, N. & McGuckin, C. Optimized multiparametric immunophenotyping of umbilical cord blood cells by flow cytometry. *Nature protocols* **5**, 1337-1346 (2010).
101. Carr, R. Neutrophil production and function in newborn infants. *British journal of haematology* **110**, 18-28 (2000).
102. Hotchkiss, R.S. *et al.* Sepsis-induced apoptosis causes progressive profound depletion of B and CD4+ T lymphocytes in humans. *J Immunol* **166**, 6952-6963 (2001).
103. Gonzalez-Roldan, N. *et al.* Expression of triggering receptor on myeloid cell 1 and histocompatibility complex molecules in sepsis and major abdominal surgery. *World journal of gastroenterology : WJG* **11**, 7473-7479 (2005).
104. Abeles, R.D. *et al.* CD14, CD16 and HLA-DR reliably identifies human monocytes and their subsets in the context of pathologically reduced HLA-DR expression by CD14(hi) /CD16(neg) monocytes: Expansion of CD14(hi) /CD16(pos) and contraction of CD14(lo) /CD16(pos) monocytes in acute liver failure. *Cytometry. Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology* **81**, 823-834 (2012).

105. Belge, K.U. *et al.* The proinflammatory CD14+CD16+DR++ monocytes are a major source of TNF. *J Immunol* **168**, 3536-3542 (2002).
106. Golovkin, A.S. *et al.* Perioperative Dynamics of TLR2, TLR4, and TREM-1 Expression in Monocyte Subpopulations in the Setting of On-Pump Coronary Artery Bypass Surgery. *ISRN inflammation* **2013**, 817901 (2013).
107. Flores, L. in Departamento de Inmunología, Vol. Maestría en Ciencias en Inmunología 77 (Instituto Politécnico Nacional. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, México; 2013).
108. Gingras, M.C., Lapillonne, H. & Margolin, J.F. TREM-1, MDL-1, and DAP12 expression is associated with a mature stage of myeloid development. *Mol Immunol* **38**, 817-824 (2002).
109. Mahdy, A.M., Lowes, D.A., Galley, H.F., Bruce, J.E. & Webster, N.R. Production of soluble triggering receptor expressed on myeloid cells by lipopolysaccharide-stimulated human neutrophils involves de novo protein synthesis. *Clinical and vaccine immunology : CVI* **13**, 492-495 (2006).
110. Groselj-Grenc, M., Ihan, A. & Derganc, M. Neutrophil and monocyte CD64 and CD163 expression in critically ill neonates and children with sepsis: comparison of fluorescence intensities and calculated indexes. *Mediators of inflammation* **2008**, 202646 (2008).
111. Johnston, R.B., Jr. Function and cell biology of neutrophils and mononuclear phagocytes in the newborn infant. *Vaccine* **16**, 1363-1368 (1998).
112. Bovolenta, C., Gasperini, S., McDonald, P.P. & Cassatella, M.A. High affinity receptor for IgG (Fc gamma RI/CD64) gene and STAT protein binding to the IFN-gamma response region (GRR) are regulated differentially in human neutrophils and monocytes by IL-10. *J Immunol* **160**, 911-919 (1998).
113. Ravetch, J.V. & Bolland, S. IgG Fc receptors. *Annual review of immunology* **19**, 275-290 (2001).
114. van der Poel, C.E., Spaapen, R.M., van de Winkel, J.G. & Leusen, J.H. Functional characteristics of the high affinity IgG receptor, Fc gamma RI. *J Immunol* **186**, 2699-2704 (2011).
115. Sancho, D. *et al.* CD69 downregulates autoimmune reactivity through active transforming growth factor-beta production in collagen-induced arthritis. *The Journal of clinical investigation* **112**, 872-882 (2003).

ANEXO 1

México, D.F., a ____ de _____ de _____

Título del proyecto: “Desarrollo de una prueba diagnóstica y diferencial de sepsis y síndrome de respuesta inflamatoria sistémica en periodo neonatal”

Número de Protocolo: _____

Investigador Principal: Dr. Arturo Cébulo Vázquez

Señor(a), por este medio se le invita a formar parte del proyecto de Investigación “Desarrollo de una prueba diagnóstica y diferencial de sepsis y síndrome de respuesta inflamatoria sistémica en periodo neonatal”, la sepsis es una enfermedad en la que se detecta la presencia de bacterias en la sangre del sujeto infectado y como resultado el paciente desarrolla un proceso de inflamación en varios tejidos del cuerpo que puede llevarlo a la muerte, si usted decide dar su consentimiento, su participación consiste en permitir que nosotros colectemos una muestra de sangre de 10 mililitros del cordón umbilical unido a la placenta o de medio mililitro de sangre periférica de su hijo(a). Antes de que decida participar es importante que entienda porque se está realizando la investigación y en qué consiste ésta. Tómese el tiempo necesario para decidir si desea o no participar, y discuta su participación con su familia y su médico si así lo desea. Este documento le proporciona información sobre el estudio, haga cualquier pregunta que tenga sobre el estudio de manera que usted pueda tomar una decisión acerca de su participación. Si después de leer y entender este documento decide participar se le pedirá que firme esta carta de consentimiento informado y se le entregará una copia de la misma.

1.- Justificación y Objetivos

El objetivo de este estudio es saber si es posible diferenciar por una técnica en el laboratorio (citometría de flujo) a recién nacidos que sufren de sepsis de los que sufren de inflamación general. Mientras más temprano se llegue a el diagnostico de estas enfermedades, mayores son las posibilidades de que el tratamiento sea exitoso. Así mismo, se identificaran las características de la respuesta de su organismo a esta

infección, principalmente en lo que corresponde a los mecanismos de defensa (sistema inmune).

2.- Procedimientos

Si usted está de acuerdo en participar en este programa, usted nos permitirá coleccionar 10 mL de sangre del cordón umbilical unido a la placenta o de medio mililitro de sangre periférica de su hijo(a) la cual se estudiará en el laboratorio. Los 10 mL que se obtendrán de la placenta no afectarán la salud de su hijo(a) ya que la muestra será coleccionada cuando la placenta ya haya sido analizada por los médicos ginecobstetras y esté por enviarse al servicio de patología y posteriormente ser desechada. En el caso del medio mililitro de sangre, este será coleccionado como parte adicional del protocolo de estudio a un recién nacido potencialmente infectado, tal volumen no agrava o afecta negativamente la salud de su hijo(a) y si podría ayudar a diagnosticar su estado más rápido de lo habitual. Las muestras serán coleccionadas en el momento en el que el neonatólogo o pediatra infectólogo que trate a su hijo(a) inicie el protocolo de atención para neonatos con factores de riesgo para sepsis. La sangre coleccionada se usará para en ella contar las células que tengan en superficie marcas que sean útiles para identificar qué células están en estado activo, así mismo se buscarán proteínas en el suero que sean marcas útiles para reconocer qué células en el recién nacido están o han estado en estado activado.

3.- ¿Cuáles son los riesgos o molestias por participar en este proyecto?

Usted y su hijo(a) no corren riesgo mayor al mínimo al participar en este estudio. La cantidad de sangre que usted permitirá que se colecciona no afectará su salud o la de su hijo(a). Si es necesario coleccionar de su hijo(a) una muestra de sangre, él o ella no tendrá una molestia ya que se aprovechará la punción venosa que realice el equipo médico tratante para de ahí obtener la muestra de sangre (0.5 mL, medio mililitro) necesaria para este estudio.

4.- ¿Cuáles son los beneficios esperados para usted por participar en este proyecto?

Si usted decide ingresar al estudio, el beneficio para usted y su hijo(a) no será directo. La información que se obtenga podría permitir en un futuro implementar nuevas medidas de atención y nuevos esquemas de tratamiento, que mejoren el pronóstico materno-neonatal.

5.- ¿Cuáles son los procedimientos alternos que pueden ser ventajosos para el neonato con sepsis?

Para diagnosticar sepsis en el neonato se debe realizar un hemocultivo (estudio de la sangre para buscar bacterias o virus en sangre) donde se necesitan hasta dos mililitros de sangre y se reporta el resultado hasta 48-72 horas después de la toma de muestra, nosotros proponemos este estudio en el cual solo se necesitaría medio mililitro de sangre para llegar al diagnóstico, además el resultado sería reportado una hora y media después de la toma de muestra. Si los resultados de este estudio son positivos, podremos diagnosticar los casos de sepsis más rápido y con menos sangre de la que actualmente se necesita.

6.- ¿Tengo garantía de recibir respuesta a cualquier pregunta y aclaración a cualquier duda?

Podrá hacer preguntas en cualquier momento acerca de este estudio. Si tiene cualquier duda sobre el proceso de consentimiento informado o sus derechos como un sujeto en investigación deberá ponerse en contacto con el Comité de Investigación para estudios en Humanos en el Instituto Nacional de Perinatología localizado en Montes Urales 800 Colonia Lomas Virreyes, teléfono 55209900 extensión 160. En caso de alguna duda o si requiere de mayor información sobre su infección identificada se debe comunicar con el Dr. Arturo Cébulo Vázquez al departamento de Biología Celular del Instituto Nacional de Perinatología al teléfono 5520-9900 extensión 340.

7.- ¿Puedo retirar mi consentimiento en cualquier momento?

Su participación es voluntaria y usted está en libertad de retirarse del proyecto en cualquier momento sin perjuicio para su atención inmediata o futura.

8.- ¿Cómo se mantendrá la confidencialidad de mis registros?

El manejo de la información médica obtenida en este proyecto está regido por las reglamentaciones de protección de datos nacionales e internacionales y la confidencialidad médica. La información médica obtenida durante este proyecto solo será revisada por el personal de salud participante tanto en el proyecto, como en la atención de usted y su hijo(a), por lo que se mantendrá la confidencialidad de su historia clínica y su identidad seguirá siendo confidencial. En el análisis de los datos y la información, sus resultados no serán identificados con su nombre y se mantendrá la exactitud de los datos comprobando el número de expediente del hospital. Sólo el personal vinculado con este proyecto podrá vincular los resultados con usted y los datos se guardarán en un archivo bajo llave.

9.- ¿Se me proporcionara información actualizada durante el estudio aunque esta pudiera afectar mi decisión para continuar participando en el estudio?

Usted será notificada de manera oportuna respecto a cualquier información que pueda relacionarse con su disposición para continuar en el estudio. Reiteramos que si decide no continuar con su participación la atención médica que se le otorgue no se verá afectada negativamente de ninguna manera.

10.- ¿A que tengo derecho si se generaran daños directamente causados por este estudio?

Se proporcionara tratamiento médico y la indemnización a la que legalmente tendría derecho si ocurrieran daños directamente causados por participar en este estudio.

11.- ¿Cuánto me costará participar en este proyecto?

No hay ningún costo para usted por participar en este estudio, pero si hay un costo por la atención de su parto o la atención de su hijo(a) con respecto al tratamiento médico y los días de hospitalización que este conlleva.

Al firmar este documento usted confirma que:

a) Todas sus preocupaciones y preguntas acerca de este proyecto de investigación han sido resueltas a su satisfacción.

b) Está de acuerdo en ser parte de este proyecto y que ha recibido una copia de este documento.

c) Está de acuerdo en que se usen para investigación los datos obtenidos.

d) Usted entiende que su participación en este proyecto es voluntaria y que está en libertad de retirarse en cualquier momento, sin dar alguna razón y sin que su atención médica o derechos legales se vean afectados.

La realización de este estudio ha sido aprobada y supervisada por el Comité de Investigación y de Bioética de este hospital, quienes son un grupo de expertos que revisan detalladamente los protocolos de estudio y el riesgo para los sujetos de estudio.

Consentimiento

Yo, _____ he leído la hoja de consentimiento informado que se me ha entregado. Mi participación en el proyecto es enteramente voluntaria y soy libre de rehusar a tomar parte o a abandonar en cualquier momento, sin afectar ni poner en peligro mi atención médica futura.

Consiento en participar en este proyecto, he tenido la oportunidad de plantear mis dudas, temores, expectativas respecto al estudio. Se me ha proporcionado información suficiente acerca de todo lo referente al estudio, han respondido todas mis preguntas y me han otorgado información complementaria del proyecto y me han dado tiempo para tomar mi decisión.

México D. F. a _____ de _____ del _____

Paciente: _____ Firma _____

1er Testigo: _____ Firma _____

Relación con el paciente: _____

2do Testigo: _____ Firma _____

Relación con el paciente: _____

Investigador _____ Firma _____

ANEXO 2

México, D.F., a ____ de _____ de _____

Título del proyecto: “Validación de un panel biomarcador para el diagnóstico y pronóstico de sepsis, basado en la inmunofenotipificación de leucocitos circulantes humanos”

Número de Protocolo: _____

Investigador Principal: Dra. Lourdes Andrea Arriaga Pizano

Por este medio se le invita a formar parte del proyecto de investigación sobre la evaluación de un panel para la identificación del estado de activación de leucocitos (glóbulos blancos) de la sangre. Esto es importante porque durante las infecciones muy serias, las cirugías mayores o los pacientes con atropellamiento, por ejemplo, se desarrollan estados de inflamación generalizada (llamada SIRS) que pueden llevar a las personas a un estado crítico de salud. Desafortunadamente, en estos pacientes es difícil saber que tan bien o mal responderán a los tratamientos y esto se debe a que los médicos no tienen pruebas que les definan claramente cuál es el estado en el que se encuentran sus células de defensa o si este estado se debe a la presencia de una infección (o sepsis). Sí lo pudieran conocer a mayor detalle, podrían implementarse tratamientos de forma más rápida y más efectivos para cada paciente. Antes de que decida participar es importante que entienda porque se está realizando la investigación y en qué consiste esta. Tómese el tiempo necesario para decidir si desea o no participar, y discuta su participación con su familia y su médico si así lo desea. Este documento le proporciona información sobre el estudio. Lea este documento de solicitud de consentimiento informado con cuidado y haga cualquier pregunta que tenga sobre el estudio de manera que usted pueda tomar una decisión informada acerca de su participación. Si después de leer y entender este documento decide participar se le pedirá que firme esta carta de consentimiento informado y se le entregará una copia de la misma.

1.- Información del estudio de investigación.

El objetivo de este estudio es saber si es posible reconocer por una técnica en laboratorio (citometría de flujo) el estado de activación de los leucocitos de sangre periférica y establecer los valores de referencia de un panel de activadores preseleccionados. **METODOLOGÍA:** Si usted está de acuerdo en participar en este programa, usted nos permitirá coleccionar 5 ml de su sangre al puncionarle una vena del brazo. La sangre obtenida se utilizará para la evaluación del panel de marcadores, cuyos resultados le pueden ser proporcionados, aunque esto no traerá ningún beneficio directo en la atención de su salud.

2.- ¿Por qué se me pidió participar en este proyecto?

Adultos: por tratarse Ud. o su familiar de un individuo con diagnóstico de SIRS o sepsis.

3.- ¿Cuántas personas estarán participando en este proyecto?

Durante dos años se reclutarán aproximadamente 120 personas que cumplan con los criterios de inclusión y que asistan a este hospital.

4.- ¿Qué tipos de tratamiento será evaluado?

El estudio no propone evaluar ningún tipo especial de tratamiento, lo que se hará será observar cómo se activa el sistema de defensa (inmunológico) en sujetos de diferente edad y sexo y definir si los marcadores que proponemos pueden ser utilizados en cualquier edad o habrá que adecuarlos dependiendo de la edad y el género de los pacientes.

5.- ¿Cuál será mi responsabilidad si participo en el estudio?

Si está de acuerdo en participar en este estudio de investigación se le pedirá que firme esta carta de consentimiento. Al aceptar participar el compromiso que adquiere es permitir que se coleccionen las muestras de sangre antes mencionadas.

6.- ¿Cuáles son los riesgos por participar en este proyecto?

El riesgo es mínimo ya que la cantidad de sangre que se tomará es muy pequeña (5mL o una cucharada)

7.- ¿Cuáles son los riesgos asociados con los procedimientos realizados en este proyecto?

El riesgo habitual por la toma de cualquier muestra mínima de sangre.

9.- ¿Cuáles son los beneficios esperados para usted por participar en este proyecto?

Si usted decide ingresar al estudio, el beneficio para usted y/o su familiar no será directo. La información que se obtenga podría permitir en un futuro implementar nuevas medidas de atención y nuevos esquemas de tratamiento.

10.- ¿Cuánto me costará participar en este proyecto?

No hay ningún costo para usted por participar en este estudio.

11.- ¿Cómo se mantendrá la confidencialidad de mis registros?

El manejo de la información médica obtenida en la información clínica está regido por las reglamentaciones de protección de datos nacionales e internacionales y la confidencialidad médica. La información médica obtenida durante este proyecto solo será revisada por el personal de salud participante tanto en el proyecto, como en la atención de usted o su familiar, por lo que se mantendrá la confidencialidad de su historia clínica y su identidad seguirá siendo confidencial.

La información obtenida durante el proyecto, podrá ser transferida del expediente clínico a las bases de datos del estudio y procesada para permitir que los resultados sean analizados y publicados. En el análisis de los datos y la información, sus resultados no serán identificados con su nombre y se mantendrá la exactitud de los datos comprobando el número de expediente del hospital. Sólo el personal vinculado con este proyecto podrá vincular los resultados con usted y los datos se guardarán en un archivo bajo llave.

12.- Si estoy de acuerdo en participar en este estudio ¿de qué estoy asegurado?

Su participación es voluntaria y está en libertad de retirarse del proyecto en cualquier momento sin perjuicio para su atención inmediata o futura. Usted será notificado(a) de manera oportuna respecto a cualquier información que pueda relacionarse con su disposición para continuar en el estudio a criterio de los investigadores. Podrá hacer preguntas en cualquier momento acerca de este estudio.

Ni usted y(o su familiar no está obligado a tomar parte de este proyecto, y si decide no participar la atención médica que se le proporciones no se verá afectada de ninguna manera. En caso de alguna duda o si requiere de mayor información sobre el protocolo, se debe comunicar con la Dra. Lourdes A. Arriaga Pizano a la Unidad de Investigación en Inmunoquímica del Hospital de Especialidades, del Centro Médico Nacional Siglo XXI del IMSS al teléfono 56276915. Agradecemos de antemano su atención.

Al firmar este documento usted confirma que

- a) Todas sus preocupaciones y preguntas acerca de este proyecto de investigación han sido resueltas a su satisfacción.
- b) Está de acuerdo en ser parte de este proyecto y que ha recibido una copia de este documento.
- c) Está de acuerdo en que se usen para investigación los datos obtenidos.
- d) Usted entiende que su participación en este proyecto es voluntaria y que está en libertad de retirarse en cualquier momento, sin dar alguna razón y sin que su atención médica o derechos legales se vean afectados.

La realización de este estudio ha sido aprobada y supervisada por el Comité de Investigación y de Bioética de este hospital, quienes son un grupo de expertos que revisan detalladamente los protocolos de estudio y el riesgo para los sujetos de estudio.

Consentimiento

Yo, _____ he leído la hoja de consentimiento informado que se me ha entregado. Mi participación en el proyecto es enteramente voluntaria y soy libre de rehusar a tomar parte o a abandonar en cualquier momento, sin afectar ni poner en peligro mi atención médica futura.

Consiento en participar en este proyecto, he tenido la oportunidad de plantear mis dudas, temores, expectativas respecto al estudio. Se me ha proporcionado información suficiente acerca de todo lo referente al estudio, han respondido todas mis preguntas y me han otorgado información complementaria del proyecto y me han dado tiempo para tomar mi decisión.

México D. F. a _____ de _____ del _____

Paciente: _____

Firma _____

1er Testigo _____

Firma _____

Relación con el paciente _____

2o Testigo _____

Firma _____

Relación con el paciente _____

Investigador _____

Firma _____

ANEXO 3

Instituto Nacional de Perinatología

Departamento de Biología Celular

Datos generales de la Madre

Nombre		No. de Pac.		Registro Interno	
Filiación		Edad			
Peso		Talla		Frecuencia cardiaca	
F. Respiratoria		Presión Arterial			
Dx.					
Intervención.					
Factores de riesgo para infección neonatal					

Datos generales del Neonato

Nombre		No. de Pac.		Registro Interno	
Filiación		Edad		Sexo	M F
Peso		Talla		F. Cardiaca	
F. Respiratoria		Presión Arterial			
Capurro	APGAR:	SILVERMAN:			
Patología agregada					
Dx.					
Continua su manejo	Binomio / C. Patológico / T. intermedia / UCIN / Bajo peso / C. intermedio				

Observaciones: _____

ANEXO 4

Hospital de Especialidades
 Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS
 Unidad de Investigación Médica en Inmunoquímica

Protocolo: "Validación de un panel biomarcador para el diagnóstico y pronóstico de sepsis, basado en la inmunofenotipificación de leucocitos circulantes humanos"

Ficha de identificación

Nombre			Filiación				No. De Paciente	
Fecha de hospitalización	Fecha de egreso de Hospitalización	Días de estancia intrahospitalaria	Ingreso a UCI	Fecha de ingreso a UCI	Fecha de egreso de UCI	Días de estancia en UCI	INICIALES	
			Si / No				Procedencia (Hospital, Domicilio)	
Diagnóstico de ingreso							Sexo	
							Edad	
							Peso	
							Talla	
Sistema afectado que desencadenó SIRS / SEPSIS								

De la Muestra

Fecha de diagnóstico de SIRS	Severidad a la toma de muestra	Días transcurridos desde inicio de SIRS hasta toma de muestra	Días transcurridos desde inicio de SEPSIS hasta toma de muestra

Antecedentes Médicos

	Si / No	Años	Tratamiento		Si / No	Años	Tratamiento
DM				Cardiopatía isquémica			
Hipertensión				Cáncer			
Traumáticos				Toxicomanías			
Quirúrgicos				Otros			

Padecimiento Actual

Diagnóstico	Comentario
1.-	
2.-	
3.-	
4.-	

SIRS

Fecha	Frecuencia Cardíaca	Frecuencia Respiratoria	Temperatura	Leucocitosis	T/A
Antibioticoterapia Empírica	Si / NO	Especificar			

SEPSIS

Foco de inicio		Sepsis de origen hospitalario	SI / NO	Cultivo Positivo	Si / No
Tipo de muestra	Patógenos	Comentario / Sensibilidad			
Presento Sepsis grave	Si / No	Tiempo de duración			Numero de órganos afectados
Presento choque séptico	Si / No	Tratamiento	Quirúrgico	Antibioticoterapia	Antibiótico usado

Gravedad al momento de toma de muestra

	Puntaje
APACHE II	
SOFA	
SAPS	
MODS	

Evolución Final

Curación Total	Motivo de egreso
	Mejoría
Si	Curación total
No	Envío a otro centro Hospitalario
Defunción	Muerte tiene relación a proceso infeccioso
Si	Si
No	No

Laboratoriales

Fecha		%Monos		Col T		AST		Amitasa		Gasometria
ERITROS		%Eos		Trigl		ALT		Lipasa		PH
HB		%Bas		PT		GGT		Glu		FI02
HTO		#Neos		Albumina		DHL		UREA		PO2
Ptt		#LINFOS		Globulina		FA		CREAT		PCO2
Leucos T		#Monos		BT		Na		TP		HCO3
%Neos		#Eos		BD		K		TTP		BE
%LINFOS		#Bas		BI		Ca		INR		LACTATO