



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**“UTILIDAD DEL MARCADOR CD45 PARA LA IDENTIFICACIÓN DE  
POBLACIONES LEUCOCITARIAS EN SANGRE PERIFÉRICA DE  
PACIENTES CON SEPSIS”.**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**PRESENTA**

**JUAN MIGUEL CHAVIRA TAPIA**

**Ciudad Universitaria, CD. MX.**

**2018**





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 PASTELÍN PALACIOS**  
**VOCAL:**                           **Profesor: JULIO CÉSAR MARTÍNEZ ÁLVAREZ**  
**SECRETARIO:**               **Profesor: LOURDES ANDREA ARRIAGA PIZANO**  
**1er. SUPLENTE:**           **Profesor: OCTAVIO CASTRO ESCAMILLA**  
**2° SUPLENTE:**               **Profesor: ALBERTO GARCÍA LOZANO**

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

UNIDAD DE INVESTIGACIÓN MÉDICA EN INMUNOQUÍMICA, HOSPITAL DE ESPECIALIDADES “BERNARDO SEPÚLVEDA”, CENTRO MÉDICO NACIONAL SIGLO XXI, INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL (IMSS).

**ASESOR DEL TEMA:**

**SUPERVISOR TÉCNICO:**

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

**LOURDES ANDREA ARRIAGA PIZANO**

**LORENA HERNÁNDEZ TORRES**

**SUSTENTANTE:**

\_\_\_\_\_

**JUAN MIGUEL CHAVIRA TAPIA**

## **FINANCIAMIENTO**

El presente trabajo fue financiado con recursos del proyecto CONACyT Salud-2013-01-202621 y parcialmente con recursos del protocolo FIS/IMSS/PROT/G15/1484 del Fondo de Investigación en Salud del Instituto Mexicano del Seguro Social.

*All we have to decide  
is what to do with the time  
that is given us.*

- **J.R.R. Tolkien**

## **ÍNDICE**

<b>Índice de Figuras y Tablas</b>	<b>i</b>
<b>Abreviaturas</b>	<b>iii</b>
<b>Resumen</b>	<b>1</b>
<b>Introducción</b>	<b>3</b>
- Inicio del proceso inflamatorio	<b>5</b>
- Inflamación sistémica: SIRS y Sepsis	<b>7</b>
- Alteraciones de leucocitos en el desarrollo de sepsis	<b>12</b>
- Subpoblaciones de monocitos y su papel en sepsis	<b>15</b>
- Identificación y caracterización de leucocitos en SIRS/Sepsis	<b>18</b>
- CD45	<b>20</b>
<b>Planteamiento del problema</b>	<b>24</b>
<b>Justificación</b>	<b>25</b>
<b>Hipótesis</b>	<b>25</b>
<b>Objetivos</b>	
- Objetivo General	<b>26</b>
- Objetivos Particulares	<b>26</b>
<b>Materiales y Métodos</b>	<b>26</b>
<b>Resultados</b>	<b>32</b>
<b>Discusión de Resultados</b>	<b>41</b>
<b>Conclusiones</b>	<b>45</b>
<b>Referencias</b>	<b>45</b>
<b>Anexo 1: Carta de Consentimiento Informado</b>	<b>53</b>

## **ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS**

<b>Fig. 1:</b> Órganos del sistema inmunológico.	<b>3</b>
<b>Fig. 2:</b> Inicio del proceso inflamatorio.	<b>6</b>
<b>Fig. 3:</b> Evolución de un proceso inflamatorio local hasta el desarrollo de sepsis.	<b>8</b>
<b>Fig. 4:</b> Respuesta inmune inflamatoria y antiinflamatoria observada durante la sepsis.	<b>11</b>
<b>Fig. 5:</b> Alteraciones celulares observadas en neutrófilos durante el desarrollo del proceso inflamatorio local y el desarrollo de sepsis.	<b>14</b>
<b>Fig. 6:</b> Desarrollo de las subpoblaciones de monocitos.	<b>18</b>
<b>Fig. 7:</b> Estructura de CD45.	<b>21</b>
<b>Fig. 8:</b> Inmunofenotipificación de poblaciones leucocitarias con múltiples marcadores.	<b>23</b>
<b>Fig. 9:</b> Algoritmos de análisis utilizados con y sin la inclusión de CD45 para la identificación de las principales subpoblaciones leucocitarias.	<b>30</b>
<b>Fig. 10:</b> Aplicación de algoritmos de análisis.	<b>33</b>
<b>Fig. 11:</b> Identificación de leucocitos en sangre periférica.	<b>35</b>
<b>Fig. 12:</b> CD45 favorece la identificación de linfopenia y granulocitosis en pacientes con sepsis.	<b>36</b>

**Fig. 13.** En pacientes con sepsis la variación entre la aplicación del algoritmo A y B es mayor . **37**

**Fig. 14.:** Subpoblaciones de monocitos identificadas con el algoritmo A y B. **40**

---

**Tabla 1:** Componentes celulares y solubles del sistema inmunológico. **4**

**Tabla 2:** Anticuerpos Monoclonales utilizados en el panel de análisis y el volumen utilizado de cada uno. **29**

**Tabla 3:** Inmunofenotipo de las subpoblaciones de monocitos. **31**

**Tabla 4:** Características demográficas y clínicas de los sujetos de cuyas muestras de sangre se obtuvieron los archivos FSC. **32**

**Tabla 5:** Coeficientes de variación de las frecuencias obtenidas a partir de las muestras individuales de voluntarios sanos y pacientes con sepsis. **38**

**Tabla 6:** Coeficientes de variación de los números absolutos obtenidos a partir de las muestras individuales de voluntarios sanos y pacientes con sepsis. **38**



## **ABREVIATURAS**

**APC:** Aloficocianina (*Allophycocyanin*).

**CD:** Cluster de diferenciación (*Cluster of Differentiation*).

**CLR:** Receptor de Lectina Tipo C (*C-Type Lectin Receptor*).

**CLP:** Ligadura y Punción Cecal (*Cecal Ligation and Puncture*).

**DAMPs:** Patrones Moleculares Asociados a Daño (*Damage Associated Molecular Patterns*).

**DC:** Célula Dendrítica (*Dendritic Cell*).

**DNA:** Ácido Desoxirribonucleico (*Desoxyribonucleic Acid*).

**ERO:** Especies Reactivas del Oxígeno (*Reactive Oxygen Species*)

**FSC:** Dispersión Frontal (*Forward Scatter*).

**G-CSF:** Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos (*Granulocyte Colony-Stimulating Factor*).

**GM-CSF:** Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos y Macrófagos (*Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor*).

**HLA-DR:** Antígeno Leucocitario Humano – Antígeno D Relacionado (*Human Leukocyte Antigen – antigen D Related*).

**HSP:** Proteína de Choque Térmico (*Heat Shock Protein*).

**HMGB:** Proteínas del grupo de alta movilidad (*High-Mobility Group Box Protein*).

**IFN:** Interferón (*Interferon*).

**IL:** Interleucina (*Interleukin*).

**LCA:** Antígeno Común Leucocitario (*Leukocyte Common Antigen*).

**LPS:** Lipopolisacárido (*Lipopolysaccharide*).

**MIF:** Factor Inhibidor de la Migración de Macrófagos (*Macrophage Migration Inhibitory Factor*).

**NET:** Trampas Extracelulares de Neutrófilos (*Neutrophil Extracellular Traps*).

**NK Cells:** Células Asesinas Naturales (*Natural Killer Cells*).

**NLR:** Receptor Tipo Nod (*Nod-Like Receptor*).

**PAMPs:** Patrones Moleculares Asociados a Patógenos (*Pathogen Associated Molecular Patterns*).

**PBS:** Buffer de Fosfatos Salino (*Phosphate-Buffered Saline*).

**PE:** Ficoeritrina (*Phycoerythrin*).

**PRR:** Receptor de Reconocimiento de Patrones (*Pattern Recognition Receptor*).

**RLR:** Receptor tipo RIG (*RIG-I Like Receptor*).

**SIRS:** Síndrome de Respuesta Inflamatoria Sistémica (*Systemic Inflammatory Response Syndrome*).

**SOFA:** Evaluación Secuencial de Falla Orgánica (*Sequential Organ Failure Assessment*).

**SSC:** Dispersión Lateral (*Side Scatter*).

**TGF:** Factor de Crecimiento Transformante (*Transforming Growth Factor*).

**TLR:** Receptor Tipo Toll (*Toll-Like Receptor*).

**TNF:** Factor de Necrosis Tumoral (*Tumor Necrosis Factor*).

**UCI:** Unidad de Cuidados Intensivos (*Intensive Care Unit*).

**VAP:** Neumonía asociada al ventilador (*Ventilator Associated Pneumonia*).

## **RESUMEN**

La sepsis es una enfermedad grave en la que se desarrolla falla orgánica en presencia de infección. Esta involucra la activación de sistemas como el inmunológico, endotelio y de coagulación. Múltiples estudios se han hecho para evidenciar la afección que las diferentes subpoblaciones de leucocitos presentan tanto en su distribución como capacidades funcionales. Una de las técnicas citómicas más utilizadas para ello es la citometría de flujo. Es frecuente que la identificación de poblaciones leucocitarias mediante esta técnica se base en los parámetros de tamaño y granularidad. Desafortunadamente, estos patrones se modifican en los pacientes con sepsis por la activación leucocitaria que involucra la degranulación de neutrófilos e incremento del tamaño de neutrófilos y monocitos, por ejemplo. El análisis también se dificulta por la presencia de eritrocitos resistentes a la lisis, que afectan los patrones de difracción frontal y lateral del láser con los que se establece el tamaño y complejidad de las células analizadas.

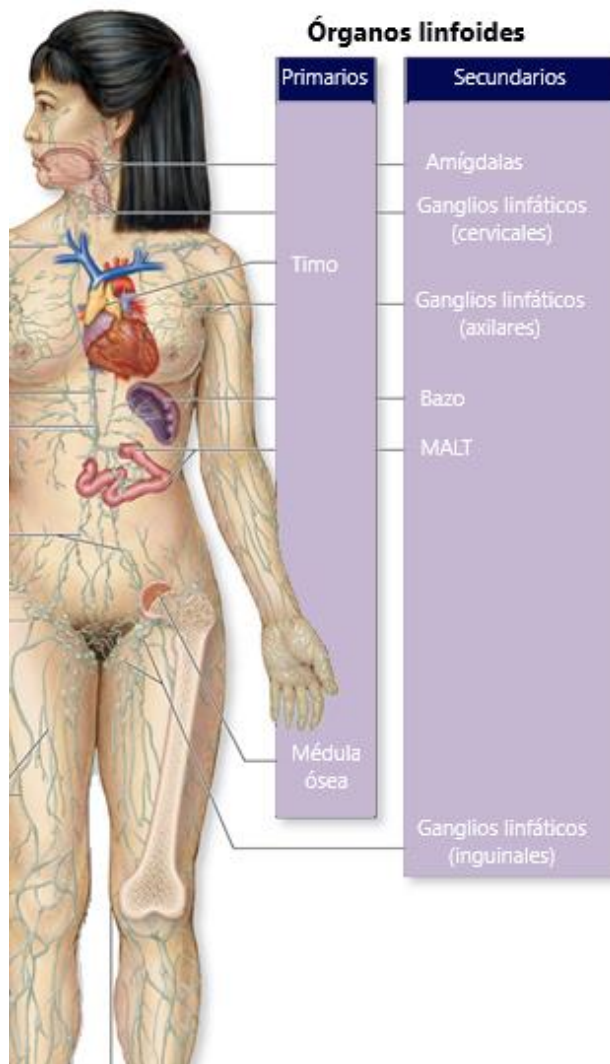
Dado que en la búsqueda de moléculas como CD16, CD64 y HLA-DR, que se han propuesto como biomarcadores en fagocitos circulantes en sepsis, es indispensable discernir correctamente entre las subpoblaciones de leucocitos circulantes. Proponemos el uso del marcador CD45, que se expresa constitutiva y diferencialmente en leucocitos, para mejorar la identificación de las subpoblaciones leucocitarias. Así, utilizando archivos FCS 3.0 obtenidos al analizar con un citómetro de flujo las muestras de pacientes adultos con sepsis (n=17) y de voluntarios sanos (n=9), se aplicaron dos diferentes algoritmos de análisis: A) en el que no se utiliza el marcador CD45 y que basa la identificación de subpoblaciones leucocitarias en los parámetros FSC y SSC; y B) que incluye al marcador CD45, además de los parámetros FSC y SSC para la identificación de subpoblaciones leucocitarias. De ambos algoritmos se determinaron, tanto en sujetos con sepsis como voluntarios sanos, las frecuencias (%) y números absolutos de linfocitos, granulocitos y monocitos, así como de los subtipos de monocitos: clásicos, no clásicos e intermedios; basados en la expresión diferencial de CD14 y CD16.

Encontramos que en el caso de muestras de sujetos sanos, la aplicación del algoritmo A y B permite casi indistintamente la visualización de linfocitos (L), monocitos (M) y granulocitos (G). Sin embargo, en el caso de las muestras de sujetos con sepsis se requiere de aplicar el algoritmo con CD45 para claramente distinguir las subpoblaciones mayoritarias. Solo al aplicar el algoritmo B (que incluye CD45) tanto la linfopenia y granulocitosis son significativas en sujetos con sepsis en comparación con sujetos sanos ( $p < 0.001$ ). Esto se asoció con mayor

dispersión (variación) de patrones de difracción frontal y lateral que tienen los leucocitos de los pacientes con sepsis (Sepsis algoritmo A vs B: Linfocitos 93.5 vs 105; monocitos: 109 vs 90 y granulocitos: 88.3 vs 78.6) a diferencia de los sujetos sanos, que no presentan diferencias entre aplicación de algoritmo A y B ( $p > 0.05$ ). Respecto a las subpoblaciones de monocitos que se basan en la expresión diferencial de CD14 y CD16, no encontramos diferencias entre la aplicación del algoritmo A o B para su identificación ni en muestras de sujetos sanos ni con sepsis. Concluimos que en el caso de pacientes con enfermedades inflamatorias sistémicas severas, como la sepsis, se debe incluir CD45 para el análisis de leucocitos circulantes para evitar la subvaloración de granulocitos y sobrevaloración de linfocitos.

## INTRODUCCIÓN

El sistema inmunológico es un complejo compuesto por células y moléculas distribuidas tanto en los llamados órganos linfoides y otros tejidos corporales (**Fig.1**). Su principal función es la de defender al organismo de infecciones, ya sea por bacterias, virus, hongos o parásitos. Adicionalmente, el sistema inmunológico puede también reconocer y reaccionar ante otros agentes potencialmente dañinos que causen, por medios físicos (como quemaduras o traumatismos) o químicos, destrucción de los tejidos<sup>1</sup>, así como se propone que también puede reaccionar frente a células transformadas (o cancerosas)<sup>2</sup>.



**Figura 1. Órganos del sistema inmunológico.** En la vida extrauterina, los leucocitos son originados en la médula ósea hematopoyéticamente activa. De allí salen y varios de ellos son transportados a través del sistema linfático a órganos linfoides para terminar su proceso de diferenciación, conocidos como órganos linfoides secundarios, que incluyen al bazo, ganglios linfáticos, y a los tejidos linfoides asociados a mucosas, o MALT (por *Mucosa-associated lymphoid tissue*), como las amígdalas. Modificado de Mescher, 2013<sup>3</sup>.

Este sistema incluye componentes celulares y no celulares. Como se resume en la **Tabla 1**, entre estos componentes celulares se encuentran los diferentes tipos de leucocitos, así como células endoteliales y fibroblastos. En aquellos componentes no celulares se encuentran diferentes biomoléculas que incluyen a los anticuerpos, componentes del complemento, citocinas y sus receptores, quimiocinas, alarminas y resolvinas, por ejemplo <sup>1,4</sup>.

**TABLA 1. Componentes celulares y solubles del sistema inmunológico.**

COMPONENTES CELULARES	COMPONENTES NO CELULARES
Leucocitos <ul style="list-style-type: none"> <li>- Linfocitos (T, B, NK, NKT, etc.)</li> <li>- Monocitos/Macrófagos</li> <li>- Granulocitos (Neutrófilos, Basófilos, Eosinófilos)</li> <li>- Células dendríticas</li> <li>- Mastocitos</li> </ul>	Citocinas <ul style="list-style-type: none"> <li>- Proinflamatorias</li> <li>- Antiinflamatorias</li> </ul>
Células endoteliales	Receptores de citocinas
Fibroblastos	Anticuerpos (IgM, IgG, IgA, IgE, IgD)
Plaquetas	Quimiocinas
Eritrocitos	Defensinas (Péptidos antimicrobianos)
Queratinocitos	Especies reactivas de Oxígeno / Nitrógeno
	Alarminas
	Resolvinas
	Complemento
	Mucinas

Abreviaturas: NK: Linfocito Asesino Natural (Natural Killer); NKT: Linfocito T Asesino Natural (Natural Killer T Cell); Ig: Inmunoglobulina .  
 Basado en Abbas, (2016); Mescher, 2013; y Sanz (2017) <sup>1,3,4</sup>.

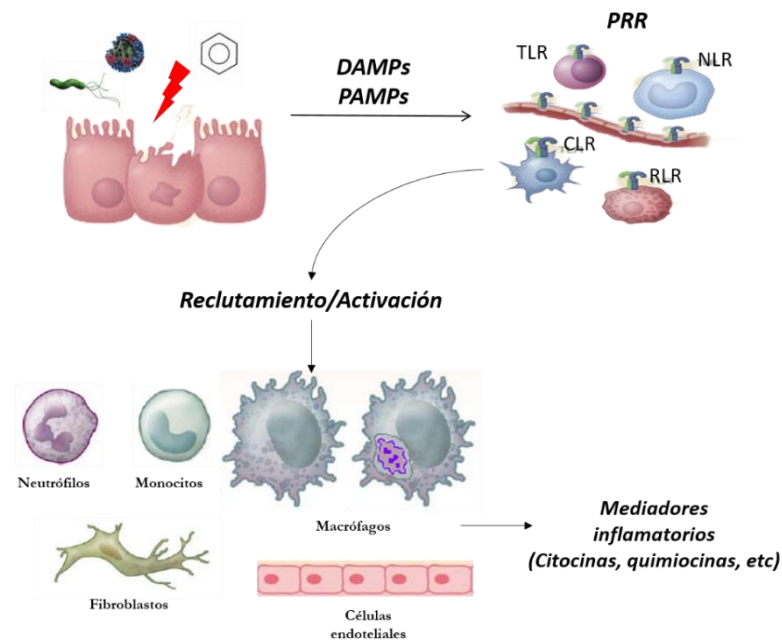
Para su estudio, el sistema inmunológico se divide en dos ramas: la innata y la adaptativa. El sistema inmune innato es la primera línea de defensa y está formado por células como monocitos, granulocitos o células polimorfonucleares, entre otras. Estas pueden resolver la infección o formar barreras físicas que no permitan el acceso de esta o su diseminación, es decir, su contención; y también lo componen barreras químicas, así como mediadores solubles, como el sistema del complemento, de la coagulación, enzimas, etc.

La respuesta inmediata que se da ante infecciones o daño tisular corresponde a la que ocurre en las primeras 4 h de generados los agentes disparadores de la respuesta; está caracterizada por citocinas y otros componentes solubles liberados y activadores de células residentes de tejido y circulantes, pertenecientes primordialmente al linaje mieloide, y que ejecutan en la siguiente fase de respuesta (>4 h) actividades para la eliminación de patógenos y/o desechos celulares, como es el caso de la fagocitosis <sup>5</sup>. Todo lo anterior corresponde a la respuesta inflamatoria que es uno de los componentes principales de la respuesta inmunológica innata.

- *Inicio del proceso inflamatorio*

Cuando el organismo entra en contacto con un agente infeccioso o bien con moléculas que indican que hay algún tejido y/o células dañadas, se activan los mecanismos de reconocimiento <sup>6</sup>. Así, el sistema inmune innato sensa o reconoce diferentes patrones moleculares del patógeno (ó PAMPs, por *Pathogen Associated Molecular Patterns*) a través de los receptores PRRs (*Pattern Recognition Receptors* por sus siglas en inglés). Además de la señalización derivada de la activación de estos PRRs, el reconocimiento de los patógenos por parte del sistema inmune innato llevará también a la activación del sistema del complemento, fagocitosis, y autofagia <sup>7</sup>. La magnitud o eficiencia de la respuesta de un organismo ante un “insulto” es del tipo multifactorial, y depende tanto de factores genéticos y fisiológicos del hospedero, como de factores del agente microorganismo o patógeno <sup>5</sup>.

Así mismo, se puede activar la respuesta inflamatoria en presencia de DAMPs (*Damage Associated Molecular Patterns* por sus siglas en inglés) provenientes de daño a algún tejido. El daño puede ser causado por un agente químico, físico o incluso microbiológico; estos DAMPs, de igual manera pueden ser reconocidos por los PRRs<sup>8</sup> y llevar a cabo la activación del sistema inmune innato.



**Figura 2. Inicio del proceso inflamatorio.** El proceso inflamatorio se inicia cuando un agente microbiológico, químico o físico entra al organismo y despierta una respuesta inmunitaria. Esta última puede ser causada porque PRRs sienten PAMPs del agente patógeno, o DAMPs generados por daño al organismo. Este reconocimiento produce que estas células se activen y favorezcan el reclutamiento de otras para combatir eficientemente al causante de la alteración de la homeostasis. Y estas células, a su vez, liberan diferentes mediadores inflamatorios. *Modificado de Medzhitov (2010)*<sup>9</sup>.

La respuesta inflamatoria además del o los inductores y sensores mencionados, también incluyen a los mediadores inflamatorios liberados y la respuesta que los otros componentes tisulares tienen ante esta cascada de activación. El tipo de señalización involucrada dependerá del tipo de receptor activado, la naturaleza del estímulo inflamatorio o el ambiente donde este se desarrolle<sup>9</sup>. Los estímulos inflamatorios son reconocidos por distintos PRRs que se encuentran en la membrana o al interior de las células e incluyen a las familias de los TLRs, NLRs, CLR, RLRs. Estos receptores al

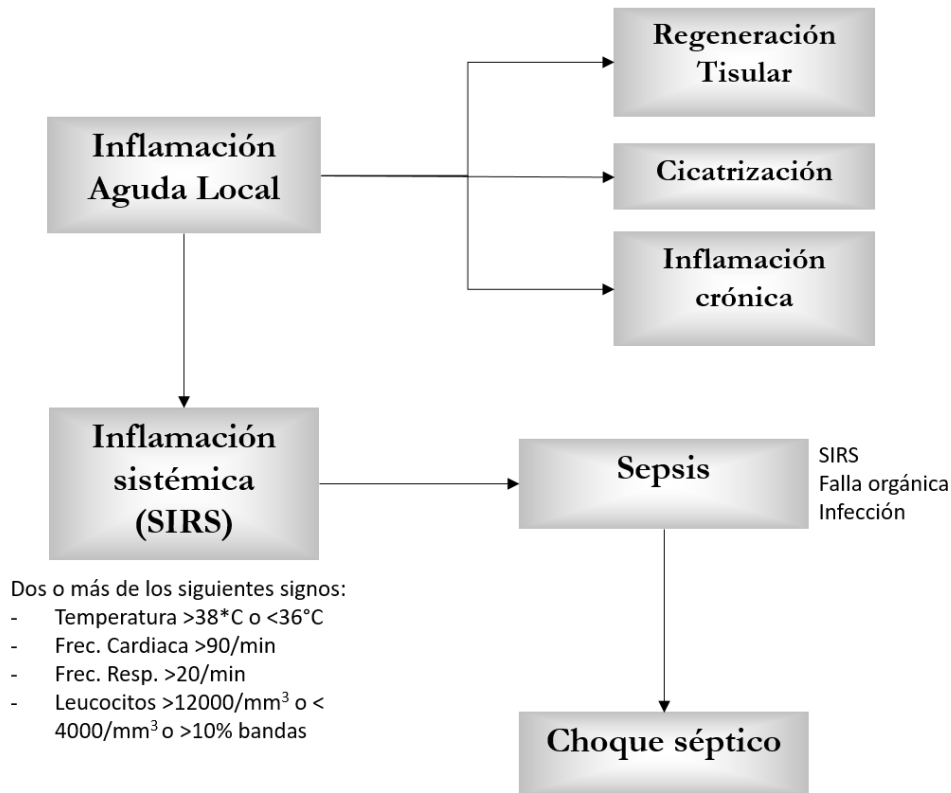


reconocer PAMPs (p. ej. LPS, flagelina, peptidoglicano, RNA de doble cadena, entre otros) o DAMPs (p. ej. HMGB1, ácidos nucleicos, ácido úrico, entre otros), señalizan y disparan respuestas inflamatorias y antimicrobianas al activar gran cantidad de vías de señalización, viéndose activadas o inhibidas distintas moléculas que forman parte de estas vías, como por ejemplo, moléculas adaptadoras, cinasas, fosfatasa, factores de transcripción, entre otras, lo cual suele resultar en la expresión de distintos genes con la síntesis de moléculas que favorecen el reclutamiento celular a los sitios de daño. Estos mediadores inflamatorios incluyen citocinas, quimiocinas, sus receptores y moléculas de adhesión <sup>7</sup> (**Fig. 2**).

Cuando la respuesta inflamatoria es normal, debe contener y eliminar al agente desencadenante. De no ser así, en el caso de patógenos microbianos, la infección persiste ocasionando una respuesta descontrolada por parte del hospedero hacia el patógeno, que se perpetúa en el tiempo (inflamación crónica) y/o en el espacio: inflamación generalizada o sistémica<sup>6,8</sup>.

- *Inflamación sistémica: SIRS y Sepsis*

La inflamación sistémica lleva a la activación tanto del sistema inmunológico, como del endotelio, y el de coagulación. Los distintos tipos celulares activados en inflamación sistémica incluyen a leucocitos circulantes, células endoteliales, y células residentes en diferentes tejidos, todos los cuales liberan mediadores inflamatorios cuyo papel es activar y reclutar a más células hacia los tejidos. De allí que a circulación se liberen masivamente citocinas, quimiocinas, formas solubles de moléculas de adhesión, factores de coagulación y proteínas de fase aguda, que en conjunto amplifican el fenómeno por mecanismos de retroalimentación positiva. Además, y aparentemente como parte de los mecanismos de contención y eliminación de los agentes infecciosos se producen enzimas, especies reactivas de oxígeno o nitrógeno, proteasas; moléculas todas las cuales generan muy fácilmente daño celular, y en consecuencia, liberación de DAMPs <sup>1</sup>.



**Figura 3. Evolución del proceso inflamatorio local hasta el desarrollo de sepsis.** Existen diferentes mecanismos que permiten que los procesos inflamatorios locales se autolimiten y controlen gracias a moléculas anti-inflamatorias o resolvinas que permitirán que se inicien los procesos de regeneración tisular, o en su defecto, cicatrización. Sin embargo, si los mecanismos de control no limitan eficientemente, esta inflamación puede evolucionar a ser sistémica, presentando signos característicos que conforman al Síndrome de Respuesta Inflamatoria Sistémica (o *SIRS*) y que también se presentan en sepsis, que puede evolucionar a choque séptico

A este fenómeno de inflamación sistémica sin presencia de infección se le conoce como Síndrome de Respuesta Inflamatoria Sistémica, o SIRS, por sus siglas en inglés. Si este proceso inflamatorio (SIRS) tiene como agente etiológico una infección, y además se acompaña de la falla de al menos un órgano que amenaza la vida del individuo, se le denomina sepsis, de acuerdo al consenso Sepsis-3 llevado a cabo en 2016 (**Fig. 3**)<sup>10</sup>. Desde el punto de vista médico es importante que se evidencie la presencia de infección como agente causal, ya que la inflamación sistémica puede ser causada por un traumatismo, quemaduras, cirugías, pancreatitis agudas, u otros padecimientos<sup>6</sup>. Para el diagnóstico de este padecimiento se utiliza una evaluación conocida como SOFA

(*Sequential Organ Failure Assessment*), donde si el puntaje obtenido es mayor a dos, se habla de falla orgánica <sup>10</sup>.

Durante el proceso de sepsis y SIRS, la respuesta inflamatoria es heterogénea entre los diferentes compartimentos del organismo, que se propone explica la afectación diferencial de tejidos que lleva a la falla orgánica, característica de estos estados <sup>5</sup>. De allí que autores como Singer y cols, declaren: “el SIRS refleja únicamente una respuesta del hospedero apropiada que es frecuentemente del tipo adaptativa. La sepsis involucra falla orgánica, indicando una patobiología más compleja que la infección que es acompañada por la respuesta inflamatoria” <sup>10</sup>.

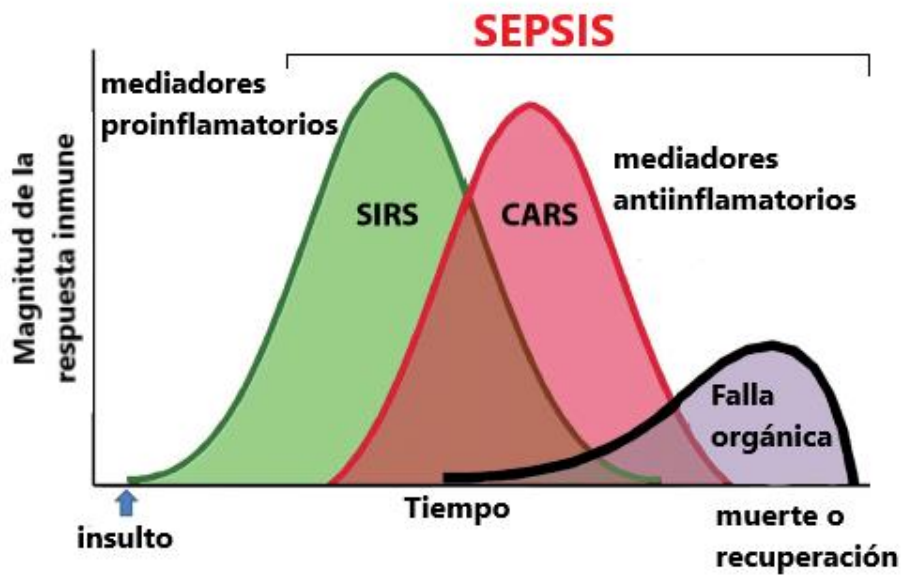
La sepsis es una enfermedad de gran importancia a nivel clínico, particularmente en las Unidades de Cuidados Intensivos (UCI), ya que su incidencia a nivel mundial es alta. Entre 2004-2009, en 20% de los hospitales de Estados Unidos se reportaron 300-1,000 casos por cada 100,000 personas, con un porcentaje de fatalidad de 14.7-29.9%; y extrapolando estos datos, se da un estimado de 31.5 millones de casos de sepsis, 19.4 millones de sepsis severa, y 5.3 millones de muertes anualmente <sup>8</sup>. Anteriormente, en el mundo los casos eran causados mayoritariamente por las Gram-negativas, sin embargo, con el transcurso del tiempo, las bacterias Gram-positivas han comenzado a aumentar el porcentaje de casos en los que estas son identificadas como el agente causal. Actualmente, las bacterias más frecuentemente aisladas en los pacientes con sepsis son *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Escherichia coli*, *Klebsiella spp.* y *Pseudomonas aeruginosa*. <sup>11,12 13</sup>.

Referente a México, hay un único estudio epidemiológico realizado por Carrillo-Esper y cols <sup>14</sup> y publicado en el año 2009, donde de 135 UCI's estudiadas (públicas y privadas), reportan que 27.3% de los ingresos fueron debidos a sepsis, mientras que de estos, 30.4% de los pacientes fallecieron. Así mismo, reportaron como la causa más frecuente la sepsis abdominal, seguida de sepsis pulmonar. A diferencia de lo reportado a nivel mundial de que las bacterias Gram-positivas predominan como agente causal de sepsis<sup>12</sup>, en México se ha observado que predominan las bacterias Gram-negativas,

(52% de los casos vs 38% de Gram-positivas y 10% de agentes fúngicos). Sin embargo también hay que considerar que en México la sepsis es una patología subreportada<sup>14</sup>.

En sepsis, el sistema del complemento se hiperactiva, lo mismo que el de coagulación, lo que conlleva a efectos perjudiciales al organismo dados por la liberación de anafilotoxinas; del sistema de la coagulación y sistemas fibrinolíticos resulta la deposición de fibrina y por lo tanto, la formación de microtrombos, así como por la actividad disminuida de mecanismos anticoagulantes. De manera importante, se observa disfunción endotelial dada por el aumento de procesos de adherencia de leucocitos y migración a la zona de infección, favoreciéndose así la pérdida de la integridad de la vasculatura. También se observa la producción de NETs (o Trampas Extracelulares de Neutrófilos) por parte de los neutrófilos, que en niveles excesivos pueden ser dañinos para el organismo, e incluso se han encontrado que la cantidad de NETs junto con los DAMPs como HSPs, ácido úrico, fibrinógeno, mDNA, HMGB, entre otros están relacionados a la severidad de la enfermedad <sup>5,8</sup>.

Ante esta respuesta inflamatoria, la producción de citocinas posterior al reconocimiento de PAMPs o DAMPs es de gran relevancia en el desarrollo de la enfermedad, ya que estas son grandes reguladoras de la respuesta inmune. Se pueden agrupar en dos tipos, aquellas que favorecen la inflamación (proinflamatorias) y aquellas que inhiben la inflamación y favorecen la recuperación (antiinflamatorias). La mayoría de las citocinas ejercen su efecto a través de su unión con receptores específicos para estas, además de que estas poseen un efecto pleiotrópico y tienen gran diversidad de efectos en diferentes tipos de células que son su blanco <sup>6,15</sup>. Entre las citocinas proinflamatorias podemos encontrar IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-12, IL-17, IL-18, IL-33, TNF- $\alpha$ , familia de la IL-20, LIF (*Leukemia Inhibitory Factor*), IFN- $\gamma$ , GM-CSF (*Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor*), G-CSF (*Granulocyte Colony-Stimulating Factor*), entre otras. Y entre las citocinas anti-inflamatorias se incluyen IL-1Ra, IL-4, IL-10, IL-11, IL-13, TGF- $\beta$ , entre otras <sup>15</sup>.



**Figura 4. Respuesta inmune inflamatoria y antiinflamatoria observada durante la sepsis.** En los pacientes con sepsis se propone que inicialmente ocurre una respuesta inflamatoria (SIRS) dada por la elevación de mediadores proinflamatorios, pero para ser contrarrestada, al poco tiempo inicia una respuesta antiinflamatoria compensatoria (CARS) incrementando la liberación de mediadores antiinflamatorios. El proceso de sepsis conlleva la falla orgánica, y si no es resuelto o tratado adecuadamente, puede llevar a la muerte. *Modificado de Faix, 2013*<sup>16</sup>.

Como se mencionó anteriormente, en sepsis, se desarrolla una etapa en la que se liberan grandes cantidades de mediadores solubles de la inflamación con progresión de la enfermedad y, de acuerdo con algunos autores, la posterior regulación negativa, es decir, posterior a la etapa proinflamatoria (o SIRS), se da el síndrome de respuesta antiinflamatoria compensatoria, o CARS (**Fig. 4**), por sus siglas en inglés, caracterizado por la producción de citocinas antiinflamatorias, disminución de la presentación de antígenos, disminución de la actividad de algunos linfocitos T, entre otras características<sup>17</sup>. Se ha hipotetizado que este perfil anti-inflamatorio, en algunos casos, el causante de un estado de inmunosupresión transitoria o inmunoparálisis, que predispondría a susceptibilidad a infecciones secundarias, lo que incrementa la tasa de mortalidad en estos pacientes<sup>18</sup>.

- *Alteraciones de leucocitos en el desarrollo de sepsis*

Ante un proceso inflamatorio, los leucocitos que inicialmente son reclutados desde el tejido sanguíneo hacia los tejidos son los neutrófilos, que además son los leucocitos más abundantes en circulación (50-70%) <sup>19,20</sup>. Para su llegada hasta el sitio de infección, se requiere de la presencia de citocinas y quimiocinas, y es necesaria se cumplan una serie de procesos como son: 1) marginación celular, desde el flujo central al periférico, que es el que está en contacto directo con las paredes internas del vaso sanguíneo; 2) rodamiento, mediado particularmente por selectinas e integrinas que favorecen la 3) adhesión a la capa de células endoteliales, así como la 4) transmigración, a través de la capa de células endoteliales <sup>21</sup>.

Una vez en el tejido, el reconocimiento del agente infeccioso por leucocitos induce la liberación de citocinas, quimiocinas, y otros mediadores solubles lo que contribuye al desarrollo de la enfermedad al amplificar y perpetuar el proceso inflamatorio <sup>19</sup>. Así, por ejemplo, los neutrófilos contribuyen al desarrollo del proceso inflamatorio en sepsis, mediante la gran liberación de gran cantidad de enzimas proteolíticas de sus gránulos, especies reactivas de oxígeno (EROs) y NETs, que contribuyen al daño de los órganos donde se encuentren. Los neutrófilos que se encuentran en circulación, al exponerse al ambiente inflamatorio característico de la sepsis, aumentan su adhesión al endotelio vascular (lo cual contribuye a que se desarrolle hipoperfusión vascular o hipoxia) y reducen su deformabilidad, es decir, sus membranas se vuelven rígidas dado por un rearrreglo del citoesqueleto <sup>22</sup>. Estos neutrófilos activados liberan gran cantidad de moléculas de sus gránulos, como lo son la mieloperoxidasa, elastasa, algunas enzimas lisosómicas, ERO's, NET's, entre otras, contribuyendo al daño al endotelio, así como su activación, generando que las células endoteliales aumenten la expresión de moléculas de adhesión, y otras moléculas que favorecen un estado trombogénico, dañando aún más tejidos y órganos, favoreciendo el desarrollo de falla orgánica <sup>23-25</sup>.

Comúnmente, el tiempo de vida media del neutrófilo en circulación es de aproximadamente 6 h antes de ser eliminados en bazo o hígado; sin embargo al estar en un sitio de infección y por el ambiente de citocinas generado, estos llegan a incrementar

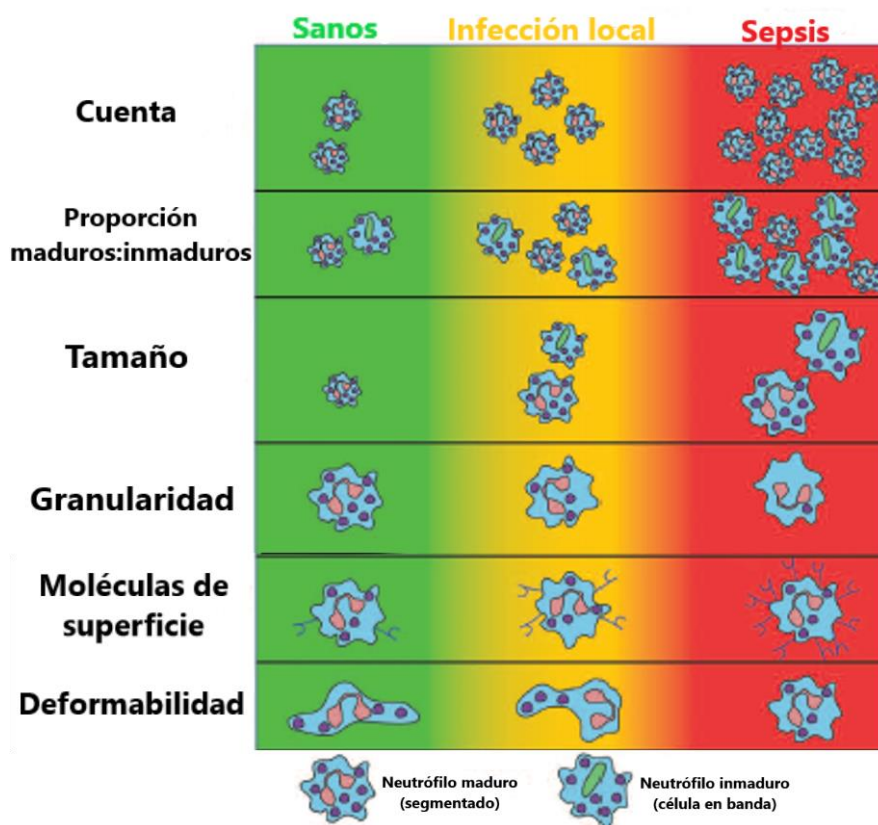
su tiempo de vida media mediante la resistencia a la apoptosis <sup>21</sup>. Jimenez y cols <sup>26</sup> reportaron un retraso en la apoptosis de alrededor de 4 veces en pacientes con SIRS a comparación de controles sanos. La neutrofilia (aumento en la cuenta de neutrófilos en circulación) es un aspecto característico de la sepsis, y se debe tanto a esta resistencia a la apoptosis, como al aumento en circulación de formas inmaduras que corresponden a las células en banda en circulación, uno de los criterios para el diagnóstico de sepsis<sup>13,27</sup>. La respuesta granulopoyética de emergencia tiende a compensar la elevada demanda de neutrófilos para combatir la infección <sup>28</sup>. Este proceso de la granulopoyesis es favorecido por la presencia de TNF $\alpha$ , IL-1 e IL-6 que contribuyen a la producción de G-CSF y GM-SCF, así como a la disminución de CXCL12 y aumento de CXCL1 <sup>29</sup>.

Si bien estas células en banda poseen un mayor tiempo de vida con resistencia a la apoptosis, su funcionalidad es menor que la forma madura de los neutrófilos<sup>17</sup>, y también se han reportado casos con neutropenia causada por la muerte celular debida a la sobre activación, por la ausencia de precursores mielocíticos y/o que el reclutamiento de estos hacia los tejidos rebasa su producción por parte de la médula ósea <sup>30</sup>. Zonneveld y cols. <sup>31</sup>, en un estudio bibliográfico, encontraron que en pacientes con sepsis, los neutrófilos sufren cambios (**Fig. 5**) como:

- Morfología: Hay incremento en formas inmaduras (células en banda) respecto a las formas maduras. Hay aumento en el tamaño el cual se relaciona con el estado de activación, así como menor granularidad por la alta tasa de degranulación que llevan a cabo, así como por la NETosis. Además, se observan otros cambios en los componentes celulares, como la presencia cuerpos de Döhle, gránulos tóxicos, entre otros.
- Movimiento: Deformabilidad disminuida, lo que no permite que atraviesen adecuadamente la vasculatura para llegar al sitio de infección o daño.
- Movilidad: Disminuye la migración de los neutrófilos.

De igual manera, Lee y cols. <sup>32</sup> encontraron que, en pacientes con sepsis, a diferencia de aquellos con infección localizada y de sujetos sanos, el tamaño de los neutrófilos y de

monocitos era mayor, atribuyéndolo a neutrófilos inmaduros y a monocitos activados, que tienden a ser más grandes y con menos granularidad. Lo mismo fue observado por Urrechaga y cols.<sup>33</sup>, reportando estos aumentos en el tamaño de neutrófilos y monocitos ocasionados por los estados de activación de estos como respuesta ante el agente patógeno, provocando estos cambios morfológicos que se propone deben tener repercusiones funcionales, como menor capacidad fagocítica e incremento en la producción de especies reactivas de oxígeno, lo que favorece la persistencia de agentes patógenos y el daño a los tejidos<sup>34</sup>.



**Figura 5. Alteraciones celulares observadas en neutrófilos durante el desarrollo del proceso inflamatorio local y el desarrollo de sepsis.** El estado inflamatorio presente durante el desarrollo de infección local o de sepsis favorece que aumente el número de neutrófilos maduros, así como la proporción de formas inmaduras en circulación. Los mediadores solubles inflamatorios que predominan, favorecen la activación de estas células, observándose aumento de tamaño y la degranulación, y disminución de la deformabilidad dada por rearrreglos del citoesqueleto. *Modificado de Zonneveld, 2016*<sup>31</sup>.



El ambiente inflamatorio de la sepsis, caracterizado por elevadas concentraciones de citocinas y mediadores inflamatorios en circulación también afecta a otros leucocitos, además de que en los neutrófilos tiene un gran efecto sobre su funcionalidad. Se ha reportado linfopenia a expensas de linfocitos T CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, y disminución de células dendríticas <sup>35</sup>; Urrechaga y cols. <sup>33</sup> observaron que además de la disminución en la frecuencia de linfocitos, también disminuye la de monocitos; mientras que Monneret y cols. <sup>34</sup> reportan disminución de células dendríticas tanto en circulación como en el bazo de ratones con sepsis.

También se ha reportado disminución en la deformabilidad de los eritrocitos, generando hipoxia. Además, estos eritrocitos tienden a la formación de agregados celulares, por la disminución del potencial zeta de estos <sup>30</sup>.

- *Subpoblaciones de Monocitos y su papel en sepsis*

Los monocitos constituyen del 5-10% de los leucocitos circulantes en sangre periférica, y en adultos se originan en la médula ósea; una vez en los tejidos pueden diferenciarse a macrófagos o a células dendríticas <sup>36</sup>. Así como los neutrófilos, son capaces de mediar la respuesta antimicrobiana, respondiendo y potenciando la liberación de quimiocinas y citocinas <sup>37</sup>. Los monocitos son una población heterogénea, y Passlick y cols. <sup>38</sup> reportaron en el año de 1989 una subpoblación de monocitos que coexpresaba el marcador CD14 y CD16, la cual tenía baja capacidad fagocítica. Debido a este hallazgo, se dividió a las poblaciones de monocitos en dos, CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup>, y CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>. A la primera se le denominó monocitos clásicos (que correspondían a la población mayoritaria en sangre periférica) mientras que la segunda se denominó como una población de monocitos con mayor potencial inflamatorio <sup>39</sup>. En el año 2010 se llegó a un acuerdo por parte de la *International Union of Immunological Societies* (IUIS, Unión Internacional de Sociedades Inmunológicas) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) para dar una nomenclatura a las subpoblaciones de monocitos, sugiriendo una subdivisión de las poblaciones como clásicos, intermedios y no clásicos <sup>40,41</sup>, a los que correspondía el fenotipo CD14<sup>+</sup> y CD16<sup>-</sup>, CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> y CD14<sup>-dim</sup>CD16<sup>+</sup>, respectivamente <sup>37,39,41</sup>.

CD14 es una proteína presente en la membrana de células mieloides como monocitos y macrófagos anclada mediante glicosilfosfatidilinositol, pero también se puede encontrar de manera soluble. Esta forma soluble está dada por el “shedding” o escisión de la membrana que se dispara por estímulos activadores y/o estresantes para las células. CD14 también es un correceptor de LPS (lipopolisacárido) presente en bacterias Gram negativas. Si se asocia con TLR4 al reconocer a LPS, favorece la señalización del TLR4, disparando la producción de citocinas proinflamatorias y quimiocinas <sup>42,43</sup>.

Mientras que CD16 es un receptor transmembranal de baja afinidad para la fracción constante de los anticuerpos de clase IgG, también conocido como FcγRIII, que posee dos isoformas, CD16A y CD16B. Al unirse este receptor con su ligando induce la fagocitosis de partículas opsonizadas por estas inmunoglobulinas, así como citotoxicidad mediada por anticuerpos (en el caso de células NK) <sup>44,45</sup>.

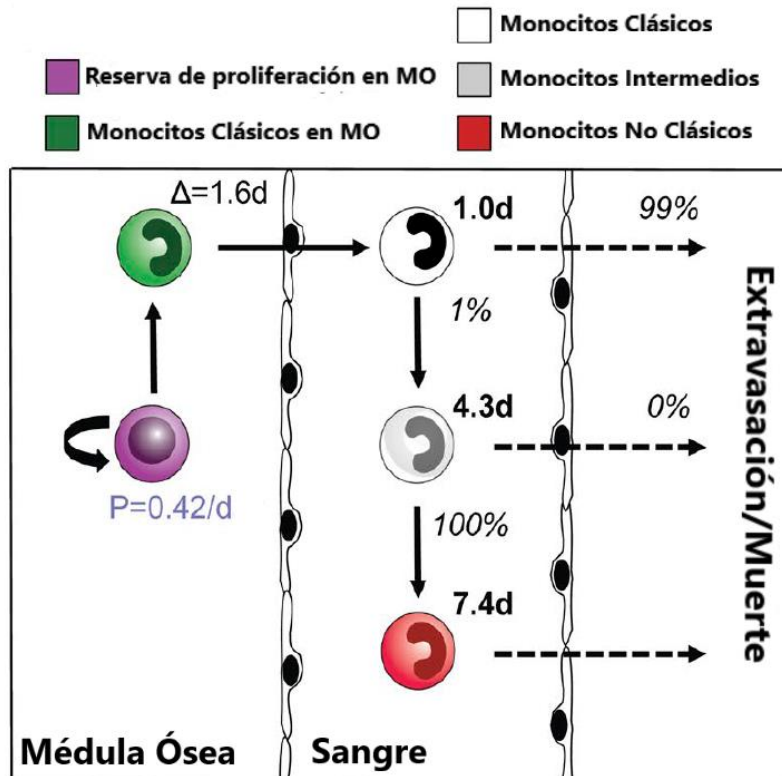
Retomando dicha clasificación, como se mencionó previamente, los *monocitos clásicos*, expresan altos niveles de CD14 y no expresan CD16 (CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup>). En condiciones basales, constituyen cerca del 85% de los monocitos circulantes en sangre periférica y expresan altamente el receptor de quimiocinas CCR2 y es la única subpoblación que además se encuentra presente en médula ósea. Su tiempo de vida media es de aproximadamente  $1.0 \pm 0.26$  días <sup>37,46</sup>. Esta subpoblación de monocitos al activarse secreta grandes cantidades de citocinas proinflamatorias tales como IL-6, IL-8, y quimiocinas como CCL2 y CCL3 <sup>36,40,47</sup>, llevan a cabo fagocitosis y producen EROs, así como también expresan gran cantidad de genes relacionados con PRRs <sup>48</sup>. Los *monocitos intermedios* coexpresan CD14 y CD16 (CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>). Constituyen cerca del 15% de la población de monocitos circulantes en sangre periférica, y su tiempo de vida media es de aproximadamente  $4.3 \pm 0.36$  días <sup>46</sup>.

Finalmente, los *monocitos no clásicos* no expresan CD14 o expresan muy bajos niveles de este, y expresan CD16, (CD14<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup> o CD14<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>). Tienen un tiempo de vida media aproximado de  $7.4 \pm 0.3$  días <sup>46</sup>. Se propone que cumplen una función de

“patrullaje” como la que se ha comprobado para la subpoblación monocitos múridos Ly6C<sup>dim</sup>Gr1<sup>+</sup> <sup>37</sup>, ya que Cros y cols. <sup>47</sup> observaron que, al transferir vía intravenosa a estos monocitos humanos en ratones irradiados, los monocitos no clásicos se adhirieron de inmediato al endotelio, mientras que los monocitos clásicos no. Esta población de monocitos CD16<sup>+</sup> tiene poca capacidad fagocítica, así como bajos niveles de producción de EROs, pero expresa altos niveles de HLA-DR (Moléculas del MHC de clase II). En cuanto a la producción de citocinas, existen resultados contradictorios ya que en algunos reportes afirmar que son capaces de secretar TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  y muy bajos niveles de IL-10 al estimularlos vía TLR, <sup>36,39,41,49</sup>. mientras que otros reportan que al estimularlos con LPS la producción de citocinas proinflamatorias es baja en comparación con la población doble positiva (CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>) <sup>47</sup>. Una de las razones de esta discrepancia puede estar relacionada con que existen algunos grupos de investigación que proponen que monocitos intermedios y no clásicos son similares y los agrupan en una sola población de monocitos que expresa CD16 <sup>41</sup>.

Se sugiere que los monocitos clásicos pueden desarrollar el fenotipo de monocitos no clásicos a través del tiempo, siendo los monocitos intermedios solo un estado transicional entre la población de monocitos clásicos y no clásicos <sup>48</sup>. Patel y cols. <sup>46</sup> describieron la cinética de las subpoblaciones de monocitos humanos en circulación, comprobando que los monocitos no clásicos son un estadio avanzado de maduración de los monocitos intermedios, y estos de los monocitos clásicos. Los monocitos clásicos son los de mayor frecuencia ( $\approx$ 99%) y son los que salen de médula ósea a circulación; la mayoría abandonan la circulación infiltrando tejidos o mueren, y solo alrededor del 1% se convierten en monocitos intermedios; el 100% de estos monocitos intermedios llevan a cabo la transición a monocitos no clásicos, y con ello incrementan su vida media en circulación hasta 7 días (la de monocitos clásicos es de 1 día y de 4 días la de intermedios) (**Fig. 6**).

En pacientes con sepsis varios autores han reportado la expansión de las poblaciones de monocitos CD16<sup>+</sup> <sup>49</sup>, como ocurre en otros estados inflamatorios <sup>36,39,47,48</sup> como en asma <sup>50</sup>.



**Figura 6. Desarrollo de las subpoblaciones de monocitos.** Los monocitos tienen un origen hematopoyético en médula ósea, donde las células progenitoras proliferan a una tasa ( $P$ ) de 0.42 por día, mientras que las células diferenciadas a monocitos permanecen 1.6 días en médula ósea antes de salir a sangre con un fenotipo clásico. La transición o maduración desde monocito clásico-intermedio-no clásico en circulación, además de modificar la expresión de CD16, modifica el tiempo de vida media de los monocitos.

Modificado de Patel, 2017<sup>46</sup>.

- *Identificación y caracterización de leucocitos en SIRS/Sepsis.*

Además de las modificaciones en las subpoblaciones de monocitos ya mencionadas, así como de la presencia de formas inmaduras de estas (células en banda) en sepsis, también se han identificado diferencias en la expresión de moléculas asociadas con activación. Nuestro grupo de trabajo ha reportado incrementos en la expresión de TREM-1 así como disminución de MHC-II en monocitos de pacientes sépticos<sup>51</sup>. Jämsä y cols. reportan que en monocitos hay un incremento de CD40 y CD80 en sepsis, así como disminución de CD14 y HLA-DR. Mientras que para linfocitos CD4+ y células NK se ha reportado un incremento de CD69 en sepsis<sup>52</sup>. Y muchos autores más reportan aumento

de diferentes moléculas dado por el estado inflamatorio desarrollado durante la sepsis, la cuál puede ser monitoreada por la presencia de estas moléculas en la superficie de las células o en el interior de estas, en fluidos o en plasma. Van Engelen y cols.<sup>53</sup> definen a un biomarcador como “moléculas, genes u otras características que se encuentran naturalmente presentes por las cuales alguna condición fisiológica o patológica puede ser identificada”.

La expresión diferencial de varias moléculas de diferenciación celular (o CDs, por sus siglas en inglés), pueden ser evidenciadas e incluso cuantificadas mediante el uso de citometría de flujo<sup>53</sup>. Esta es una técnica citómica que permite el análisis individual de células en suspensión. Con el citómetro de flujo se analizan las células mediante la incidencia de un láser (habitualmente de 488 nm), generando patrones de difracción/refracción de esta, que corresponderán a las características de tamaño (detector frontal o FSC) y complejidad (detector lateral o SSC) y excitando fluorescencias, que pueden ser intrínsecas a las células o adicionadas mediante anticuerpos. De esta manera, es posible identificar a las poblaciones de leucocitos circulantes en sangre, dado por sus patrones de tamaño y complejidad, así como por el marcaje con anticuerpos anti-CD acoplados a fluorocromos<sup>54</sup>.

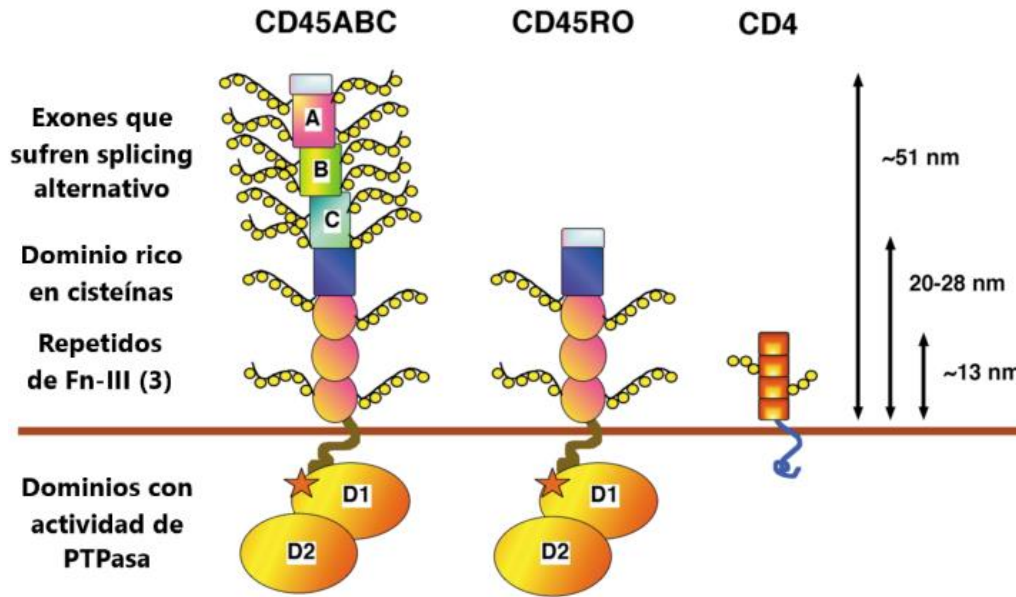
Normalmente los parámetros FSC vs SSC son suficientes para poder diferenciar a las subpoblaciones mayoritarias de leucocitos circulantes de humanos (linfocitos, monocitos y neutrófilos). En sepsis, sin embargo, así como varía la expresión de moléculas tanto de superficie como intracelulares, se presentan cambios morfológicos o alteraciones que modifican los patrones de tamaño y complejidad<sup>31,34</sup>, que dificultan la identificación de linfocitos, monocitos y neutrófilos basada en tamaño y complejidad. De allí que al analizar estas muestras por citometría de flujo se requiera de un marcador para identificarlos, primero como leucocitos y luego como miembro de estas subpoblaciones leucocitarias.

- CD45

CD45, también conocido como antígeno común leucocitario (LCA, por sus siglas en inglés *Leukocyte Common Antigen*), es una proteína con dominio de tirosín fosfatasa, que se expresa constitutivamente en todas células nucleadas con origen hematopoyético, tanto mieloides como linfoideas, así como en sus precursores<sup>55,56</sup>. Se trata de una proteína con un dominio transmembranal, una porción citoplasmática y una extracelular (**Fig. 7**). La porción citoplasmática consta de un tándem de dominios (D1 y D2) con actividad enzimática de tirosín fosfatasa (PTPasa) y extremo C-terminal. De los dos dominios con actividad de tirosín fosfatasa, solo uno de ellos es activo enzimáticamente (D1), y D2 se cree sirve para estabilizar el tándem de D1 y D2<sup>56</sup>.

En su porción extramembranal CD45 consta de 5 porciones estructurales: un dominio rico en cisteínas que contiene N-glicosilaciones, seguido por 3 dominios de tipo fibronectina III, la región N-terminal que contiene O-glicosilaciones que es la región que provee las isoformas de esta proteína. Estas isoformas están dadas por el splicing alternativo generado de los exones 4, 5 y 6, o también conocidos como A, B y C, lo que puede dar lugar a 8 isoformas, sin embargo, solo se han encontrado cinco de ellas: RABC, RAB, RBC, RB y RO, y dependiendo de la isoforma, y las altas tasas de glicosilación que se dan sobre esta región, la masa molecular de la proteína se encuentra entre 180-240 kDa<sup>55,57</sup>.

Esta proteína es de gran importancia en los linfocitos T y B, comprendiendo cerca del 10% de su superficie<sup>55,58</sup>, además de que es necesaria para la correcta transducción de señales del TCR o BCR, respectivamente. CD45 permite la correcta transducción de señales que conlleva a la producción de citocinas, a diferenciación de estas células, así como a su proliferación<sup>55,58,59</sup>.



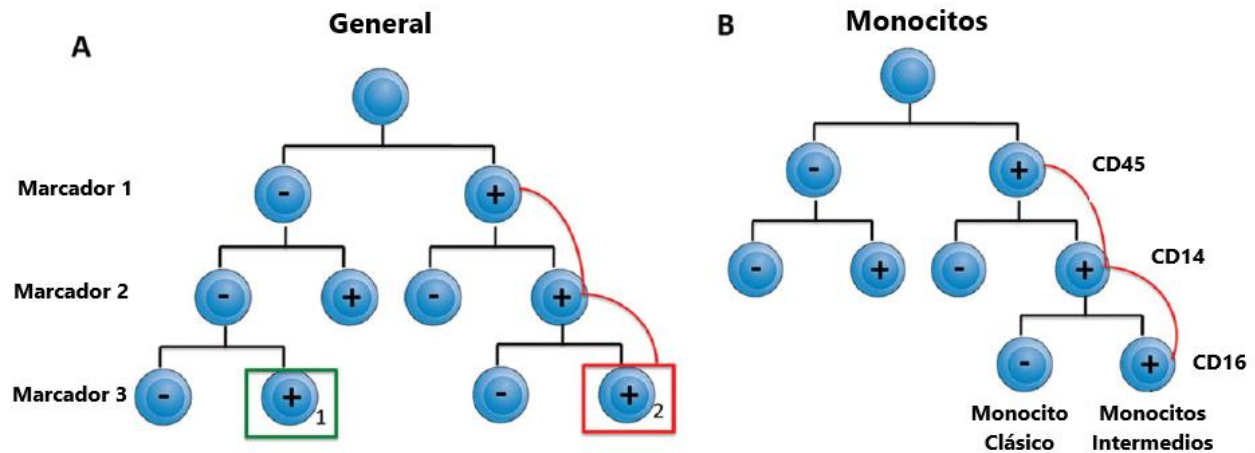
**Figura 7. Estructura de CD45.** Hay diferentes isoformas de CD45 dadas por el splicing alternativo de los exones 4/A, 5/B y 6/C, variando el extremo N-terminal de la proteína, que contiene gran número de O-glicosilaciones. Además del dominio N-terminal, hay un dominio rico en cisteínas (rico en N-glicosilaciones) seguido por tres repetidos tipo Fibronectina-III antes del dominio transmembranal. En el citoplasma se encuentra una cola con dos dominios repetidos: el dominio proximal (D1) y el D2. D1 tiene actividad enzimática de PTPasa que se propone estabiliza D2. En la imagen se contrasta el tamaño de esta proteína CD45 a comparación del tamaño de la molécula CD4. *Modificado de Penninger, 2001.*

En linfocito B la cinasa principal que se encuentra relacionadas con la actividad de CD45 como Lck, es Lyn, que de igual manera, tiene sitios de regulación positiva y negativa para la señalización por BCR<sup>59</sup>. De igual manera, CD45 es capaz de regular la producción de citocinas e interferones, así como de defosforilar a las cinasas de la familia Jak<sup>57-59</sup>. La ausencia de CD45 da lugar a inmunodeficiencia severa combinada (SCID, por sus siglas en inglés *Severe Combined Immunodeficiency*)<sup>57-59</sup>, ya que los sitios de regulación negativa se encuentran altamente fosforilados, impidiendo la correcta actividad de las cinasas. Sin embargo, otros estudios han demostrado que se encuentra hiperfosforilado el sitio con la actividad enzimática, observándose la gran actividad de la proteína, por lo que hacen falta más estudios referentes a cómo afecta la deficiencia de CD45 en dichas señalizaciones<sup>59</sup>.

De igual manera, la actividad de CD45 se ha encontrado en células de la línea mieloide, aunque poco estudiado, se sabe que regula muchos procesos, como en los neutrófilos la producción de quimiocinas <sup>59</sup>, en los macrófagos la adhesión mediada por integrinas <sup>60</sup>, en los mastocitos la degranulación <sup>61</sup>, y en varios de estas células, regula el estallido respiratorio <sup>62</sup>.

Conocida es la expresión diferencial del marcador CD45 entre las poblaciones leucocitarias en sangre periférica, siendo mayor su expresión en linfocitos (CD45<sup>+++</sup>), seguido por monocitos (CD45<sup>++</sup>), y finalmente por granulocitos (CD45<sup>+</sup>) <sup>63-66</sup>. Esta expresión diferencial se utiliza habitualmente en el área de hematología para diferenciar a las poblaciones leucocitarias mayoritarias, así como también para distinguir en muestras de médula ósea a la línea eritroide de los leucocitos. En el área de inmunología, la mayoría de los ensayos en los que se analizan leucocitos humanos no utilizan CD45 como parte de los marcadores del panel. Una de las razones es porque cuando las fluorescencias son limitadas a 4 o 6 y con ello solo este número de marcadores a analizar por células en las que a veces se requiere de varios otros marcadores diferentes a CD45 para subtipificar a las diferentes poblaciones de leucocitos (por ejemplo, el caso de células Treg, o subpoblaciones de monocitos como se puede observar en la **Figura 8**). Otra, y derivada en parte de la anterior, es que los protocolos de procesamiento de muestras incluyen soluciones para lisar eritrocitos <sup>67</sup>. Desafortunadamente en el caso de inflamación sistémica, los eritrocitos se vuelven resistentes a la lisis, debido a la modificación en la composición de su membrana plasmática <sup>30,68</sup>.





**Figura 8. Inmunofenotipificación de poblaciones leucocitarias con múltiples marcadores.**

Es posible identificar a una población celular en particular al utilizar una combinación de marcadores celulares, ya sean de superficie, o inclusive intracelulares. A partir del uso de uno u otro, y de si la población de interés se caracteriza por su presencia o por su ausencia, es posible inmunofenotipificar con base en la expresión o no del marcador. De esta manera, en **a)** podemos ver un algoritmo general para caracterizar una población; mientras que en **b)** observamos un ejemplo para caracterización de la población de monocitos clásicos (CD45<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup>) y de monocitos intermedios (CD45<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>). Modificado de Maciorowski (2017) <sup>69</sup>.

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Durante el proceso inflamatorio que se presenta en sepsis, se libera gran cantidad de citocinas, quimiocinas, mediadores inflamatorios. También se incrementa el reclutamiento y activación celular. Lo anterior involucra varios cambios en la distribución y morfología de los leucocitos circulantes. Este último aspecto dificulta la correcta identificación de los leucocitos circulantes en sangre periférica, ya que los patrones clásicos de tamaño y granularidad se modifican, particularmente de los granulocitos y monocitos. Aunado a lo anterior, en los pacientes con inflamación sistémica, particularmente en sepsis, los patrones de difracción y refracción en citómetros cuyo LÁSER principal es el de 488 nm, se ven comprometidos por la presencia de eritrocitos que son resistentes a la lisis y que en ocasiones persisten aún después de hacer separación basada en gradientes de densidad. De allí la necesidad de contar con un marcador de identificación que permita la fácil identificación y subclasificación de leucocitos dentro del panel para inmunofenotipificación mediante la técnica de citometría de flujo. CD45 es un marcador ideal ya que se expresa constitutiva y diferencialmente en los leucocitos y su expresión varía de acuerdo al estadio de maduración, pero no de activación. Además ayudará a la exclusión de aquellas poblaciones que no lo expresen como los eritrocitos, así como contaminantes o detritus celulares.

## **JUSTIFICACIÓN**

Diversos autores sugieren la utilización de biomarcadores para evaluar el estado de los pacientes en sepsis y su monitoreo, estos se basan en la expresión de diferentes moléculas en la superficie de los leucocitos circulantes en sangre. Frecuentemente, en laboratorios asistenciales, la identificación de los leucocitos se basa únicamente en los parámetros de tamaño y granularidad de estos, pero estos se ven completamente alterados durante el desarrollo de esta enfermedad. Además, los eritrocitos de los pacientes con inflamación sistémica son resistentes a la lisis. Dada el alto nivel de refracción ante longitudes de onda como 488 nm (principal láser en el 99% de los citómetros), la permanencia de estos hematíes en la muestra que se adquiere en el citómetro de flujo, dificulta la visualización de leucocitos.

A pesar de que el uso del marcador CD45 podría encarecer el panel a utilizar, se propone que ante la expresión diferencial del biomarcador CD45 en las poblaciones leucocitarias, siendo los linfocitos los que lo expresan en mayor cantidad, seguido por los monocitos, y finalmente por los granulocitos, que su uso permitiría una mejor identificación de estas poblaciones leucocitarias de pacientes con sepsis.

## **HIPÓTESIS**

Mediante la inclusión del marcador CD45 al panel de análisis por citometría de flujo, será posible mejorar la identificación de las poblaciones de leucocitos y subpoblaciones de monocitos en muestras de pacientes con sepsis.

## **OBJETIVOS**

### **- General**

- Establecer la utilidad del marcador CD45 para la identificación de las poblaciones leucocitarias en sangre periférica de pacientes con sepsis.

### **- Particulares**

- Desarrollar dos algoritmos de análisis, uno sin la inclusión del marcador CD45 y otro que lo incluya para identificar las tres poblaciones principales de leucocitos así como las subpoblaciones de monocitos.
- Analizar los porcentajes y números absolutos de cada población leucocitaria con el uso de uno u otro algoritmo de análisis.
- Analizar los resultados obtenidos y determinar si la inclusión de CD45 al panel de análisis mejora la identificación de las subpoblaciones leucocitarias y de monocitos.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Universo de Trabajo**

Archivos de citometría de flujo (formato FSC 3.0) obtenidos de analizar muestras de pacientes con y sin diagnóstico de sepsis que fueron tratados en el Hospital de Especialidades “Bernardo Sepúlveda” del Centro Médico Nacional Siglo XXI del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS).

### **Criterios de selección**

#### **- Criterios de inclusión**

##### **Generales:**

- Género indistinto.
- Aceptación a participar en el estudio y firma del consentimiento informado.

- Mayores de 18 años y menores de 60 años.  
Pacientes con Sepsis:
  - Pacientes con diagnóstico de sepsis que fueron hospitalizados en los Servicios de Gastrocirugía o Unidad de Cuidados Intensivos de la UMAE Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI.
- Criterios de no inclusión
- Tener diagnóstico previo de hepatopatías.
  - Tener diagnóstico de enfermedades autoinmunes o crónico-degenerativas.
  - Pacientes que estén en tratamiento con inmunomoduladores o inmunosupresores.
  - Embarazo.
  - No contar con expediente clínico para revisión.
  - No aceptar participar en el estudio.
  - Pacientes con complicaciones micro y macro-vasculares secundarias a la enfermedad crónica.
- Criterios de eliminación
- Pacientes cuya muestra no pueda ser procesada.
  - Pacientes que decidan retirarse voluntariamente del estudio.

### **Aspectos éticos**

Para la realización del presente protocolo se contó con la aprobación por del Comité Local de Investigación Científica del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), No. de Aprobación: R-2013-3601-229 (**Anexo 1**, Carta de consentimiento informado).

## **Obtención de Muestras de Sangre Periférica**

Las muestras de las que se utilizaron los archivos para el presente proyecto fueron procesadas de acuerdo al siguiente esquema: previo consentimiento informado firmado por el paciente o por un familiar de este, se obtuvo por punción humeral, previa asepsia de la zona, 5mL de sangre periférica, colectados en un tubo BD Vacutainer® con heparina de litio como anticoagulante (55 USP). Para pacientes con sepsis, la muestra se recolectó dentro de las primeras 72 horas después del diagnóstico. Se consideraron 9 muestras de sangre de sujetos sanos y 17 muestras de pacientes con sepsis. Una vez obtenida la muestra se realizó lisis de eritrocitos con cloruro de amonio ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) para lo que se tomaron 150  $\mu\text{L}$  de sangre total, se les adicionaron 1000  $\mu\text{L}$  de solución de lisis de eritrocitos (Cloruro de Amonio al 0.15 M). Se incubó por 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se adicionó 1 mL de solución amortiguadora a base de fosfatos (PBS 1x) y se centrifugó durante 5 minutos a 1500 rpm. El botón celular obtenido se resuspendió en 150  $\mu\text{L}$  de PBS 1x y se realizó la verificación de viabilidad celular mediante tinción con Azul de Tripano (*Invitrogen Molecular Probes* Lote 705113) y una posterior observación al microscopio, se contabilizaron de células vivas y muertas con cámara de Neubauer. Se ajustó la suspensión celular a  $1\text{-}2 \times 10^6$  células por mL. De esta suspensión celular, se colocaron  $1 \times 10^5$  células en un tubo de “autofluorescencia” (AF) y otras  $1 \times 10^5$  células en el tubo para inmunofenotipificación (o de “tinción”, Tubo “T”), que contenía la mezcla de anticuerpos monoclonales que se muestra en la Tabla 2. Se incubaron por 15 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad, y se agregaron 300  $\mu\text{L}$  de una dilución 1:10 de solución de lisis y fijado (BD FACS™ Lysing Solution Cat. 349202); se incubó por 10 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Finalmente, las células se “lavaron” por centrifugación agregando 1 mL de PBS y posteriormente se resuspendieron en 50  $\mu\text{L}$  de solución isotónica. Se adquirieron al menos 10,000 eventos correspondientes a leucocitos totales utilizando un citómetro FACS Canto II (BD™ Biosciences, San José, CA, USA) equipado con tres láser y el juego de filtros adecuados para la detección de los fluorocromos planteados en el panel (configuración B5/R2/V2).

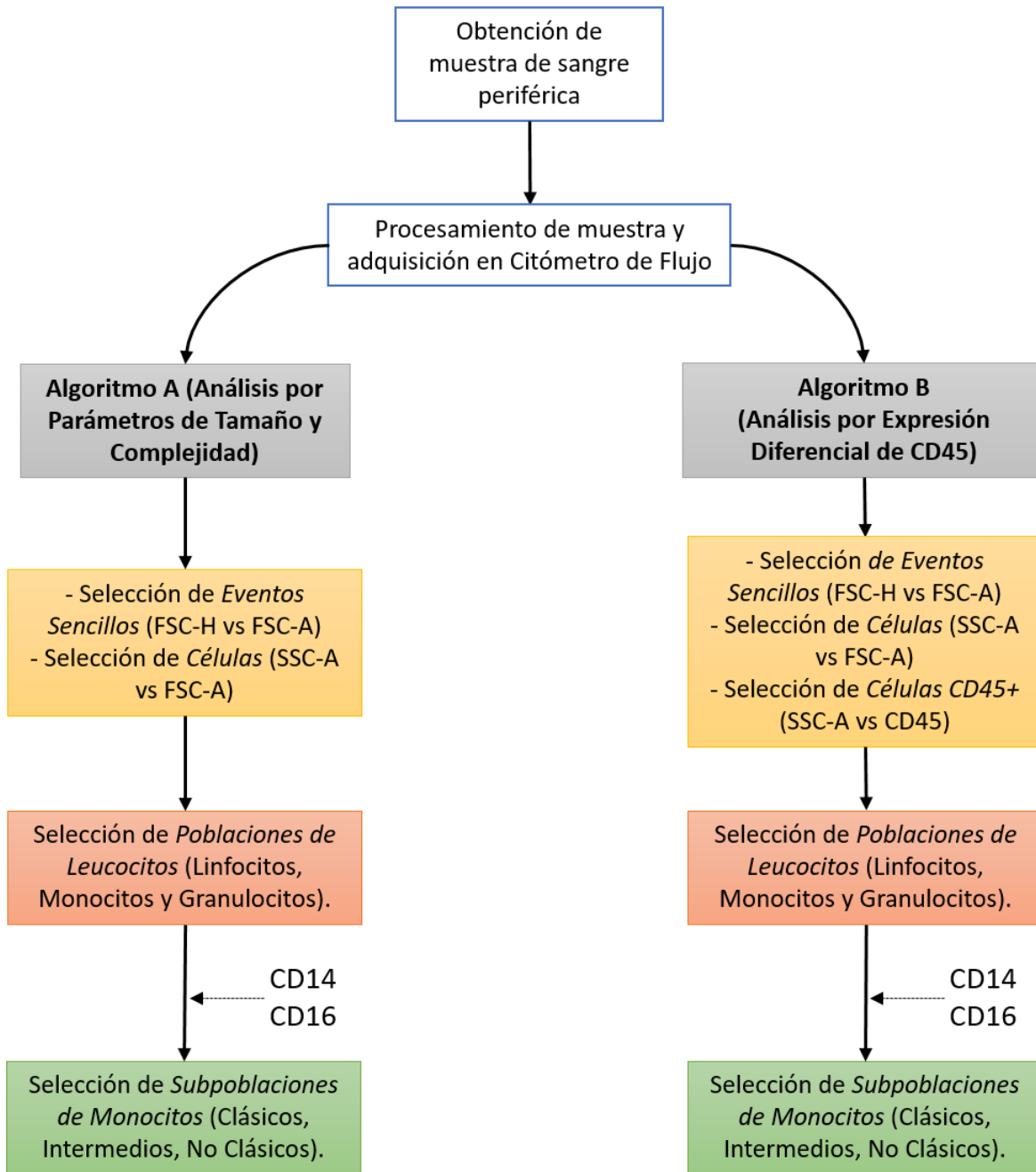
**TABLA 2: Anticuerpos Monoclonales utilizados en el panel de análisis y el volumen utilizado de cada uno.**

<b>Mezcla de anticuerpos</b>					
<i>Anticuerpo</i>	<i>Fluorocromo</i>	<i>Marca</i>	<i>Volumen</i> <i>(<math>\mu</math>L)/10<sup>5</sup>células</i>	<i>Catálogo</i>	<i>Clona</i>
CD45	Krome Orange	Beckman-Coulter	2.0	A96416	J33
CD14	PE Cy7	BD	1.0	326518	M5E2
CD16	APC Cy7	BD	1.0	302018	3G8

### **Algoritmos de Análisis**

Los inmunofenotipos se analizaron utilizando el programa especializado de análisis citométrico *Infinicyt v1.8* (*Cytognos* y *EuroFlow™*, Universidad de Salamanca, Salamanca, España).

Se diseñaron dos algoritmos de análisis distintos para comparar la utilidad de la expresión diferencial del marcador CD45 (Antígeno Común Leucocitario) para la identificación de las distintas poblaciones leucocitarias, así como de las subpoblaciones de monocitos; estos algoritmos a utilizar se muestran en la **Fig. 9**.



**Figura 9: Algoritmos de análisis utilizados con y sin la inclusión de CD45 para la identificación de poblaciones y subpoblaciones leucocitarias.** A partir de eventos sencillo (FSC-H vs FSC-A). Se aplicaron dos algoritmos de análisis: *Algoritmo A* donde los parámetros de FSC y SSC sirvieron para la identificación de poblaciones leucocitarias (linfocitos, monocitos y granulocitos), mientras que en el *Algoritmo B* se utilizaron los parámetros de FSC, SSC y CD45 para la identificación de estas mismas poblaciones. Una vez identificados los monocitos por algoritmo A o B, se clasificaron los monocitos en clásicos, intermedios y no clásicos basados en la expresión de CD14 y CD16.



**TABLA 3: Inmunofenotipo de las subpoblaciones de monocitos.**

<b>Población</b>	<b>Inmunofenotipo</b>
Monocitos Clásicos	CD45 <sup>med</sup> CD14 <sup>high</sup> CD16 <sup>-</sup>
Monocitos Intermedios	CD45 <sup>med</sup> CD14 <sup>high</sup> CD16 <sup>+</sup>
Monocitos No Clásicos	CD45 <sup>med</sup> CD14 <sup>dim</sup> CD16 <sup>+</sup>

### **Análisis Estadístico**

El análisis estadístico de los resultados se llevó a cabo utilizando el programa *Prism GraphPad 5.0*. Resultados reportados como *Promedio +/- Desviación estándar*. Para establecer las diferencias entre grupos se utilizaron las pruebas estadísticas de Mann-Whitney considerando un valor de  $p < 0.05$  como significativo; y Kruskal-Wallis considerando un valor de  $p < 0.05$  como significativo.

## RESULTADOS

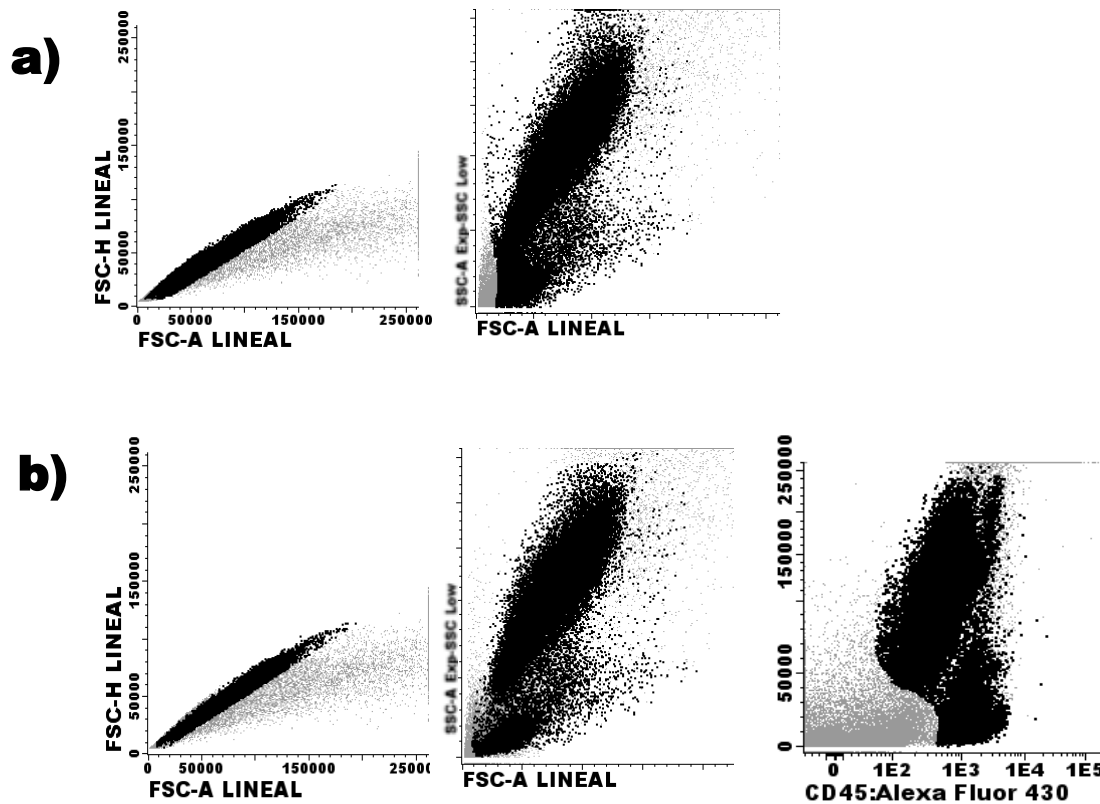
Se analizaron los archivos FSC (3.0) de las muestras de sangre periférica de 17 sujetos con sepsis y 9 sujetos sanos, cuyas características demográficas aparecen en la **Tabla 4** y entre los que hay diferencias significativas en cuanto a edad, pero no a distribución de género. Tomando en cuenta los datos de la Biometría Hemática de ambos grupos, se observó que los pacientes con sepsis presentan leucocitosis ( $p < 0.01$ ) y en cuanto a las subpoblaciones de leucocitos se encontró granulocitosis ( $p < 0.001$ ) y linfopenia ( $p < 0.01$ ) en comparación al grupo de voluntarios sanos, lo cual se muestra en la TABLA 4.

**TABLA 4: Características demográficas y clínicas de los sujetos de cuyas muestras de sangre periférica se obtuvieron los archivos FSC.**

	<b>Voluntarios sanos (n=9)</b>	<b>Pacientes con sepsis (n=17)</b>	<b>Significancia P&lt;0.05</b>
<b>Edad</b>	30.11 ± 15.81	53.29 ± 16.43	0.0064
<b>Género (F:M)</b>	3:6	8:9	-----
<b>Temperatura (°C)</b>	36.62 ± 0.33	37.15 ± 0.90	No
<b>FC (latidos/min)</b>	76.67 ± 10.16	88.06 ± 16.08	No
<b>FR (respiraciones/min)</b>	18.22 ± 1.86	19.18 ± 3.72	No
<b>Leucocitos (<math>\times 10^3/\text{mm}^3</math>)</b>	7.05 ± 1.22	12.96 ± 8.19	0.0132
<b>Linfocitos (<math>\times 10^3/\text{mm}^3</math>)</b>	2.35 ± 0.39	1.26 ± 0.90	0.0051
<b>Monocitos (<math>\times 10^3/\text{mm}^3</math>)</b>	0.47 ± 0.08	0.69 ± 0.35	No
<b>Neutrófilos (<math>\times 10^3/\text{mm}^3</math>)</b>	3.90 ± 1.16	10.28 ± 8.37	0.0009
<b>SOFA</b>	-----	7.30 ± 3.52	-----

Significancia; Mann Whitney  $p < 0.05$

A las muestras de sujetos sanos y pacientes con sepsis, se les aplicó el algoritmo de análisis A o B (**Fig 10**). Para ambos algoritmos se utilizaron las gráficas de FSC-H vs FSC-A para la selección de eventos sencillos (no agregados), así como las gráficas de SSC-A vs FSC-A para la selección de “células” con base en tamaño y complejidad. Para el algoritmo A, con esto se identificaron los leucocitos basados en los parámetros de tamaño y complejidad (**Fig. 10a**). Para el Algoritmo B (**Fig. 10b**), además de la gráfica de FSC vs SSC se utilizó el marcador CD45 (gráfica de SSC vs CD45).



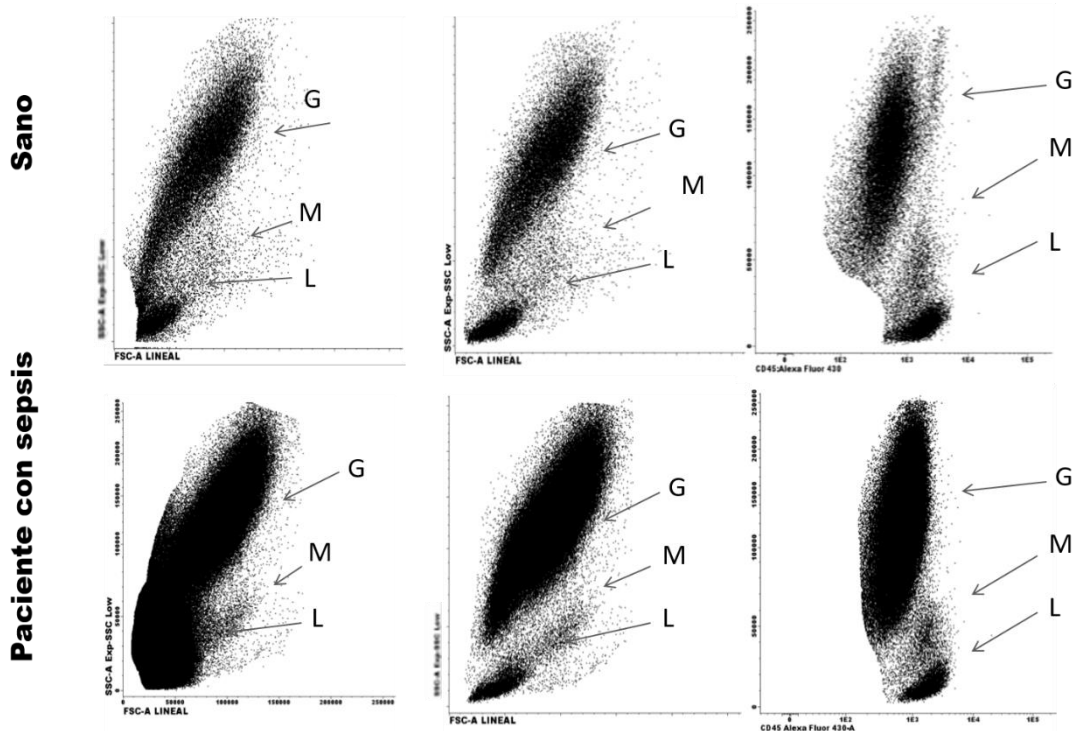
**Figura 10: Aplicación de algoritmos de análisis.** Se muestra la aplicación del algoritmo en la misma muestra de un sujeto sano. Para ambos algoritmos de análisis se utilizaron las gráficas FSC-H vs FSC-A para la selección de eventos sencillos. En el caso del **a)** algoritmo A se utilizó la gráfica de FSC-A vs SSC-A para la identificación por tamaño y granularidad, de leucocitos; en el **b)** algoritmo B se añadió el gráfico de SSC-A vs CD45, para la identificación de leucocitos.

Se aplicaron el algoritmo A y B para la identificación de las subpoblaciones leucocitarias. Como se observa en la **Figura 11**, en el caso de muestras de sujetos sanos, la aplicación del algoritmo A y B permite casi indistintamente la visualización de linfocitos (L), monocitos (M) y granulocitos (G). Sin embargo, claramente en el caso de las muestras de sujetos con sepsis, es difícil la identificación clara de las tres subpoblaciones y es evidente que es más clara la identificación de poblaciones basada en la expresión diferencial de CD45 además del tamaño y la complejidad (resultando en linfocitos  $CD45^{high}FSC^{low}SSC^{low}$ , monocitos  $CD45^{med}FSC^{med}SSC^{med}$  y granulocitos  $CD45^{low}FSC^{het}SSC^{high}$ ), correspondiente al algoritmo B, que cuando solo se toman los patrones de tamaño y complejidad del algoritmo A (resultando en linfocitos  $FSC^{low}SSC^{low}$ , monocitos  $FSC^{med}SSC^{med}$ , y granulocitos  $FSC^{het}SSC^{high}$ ).

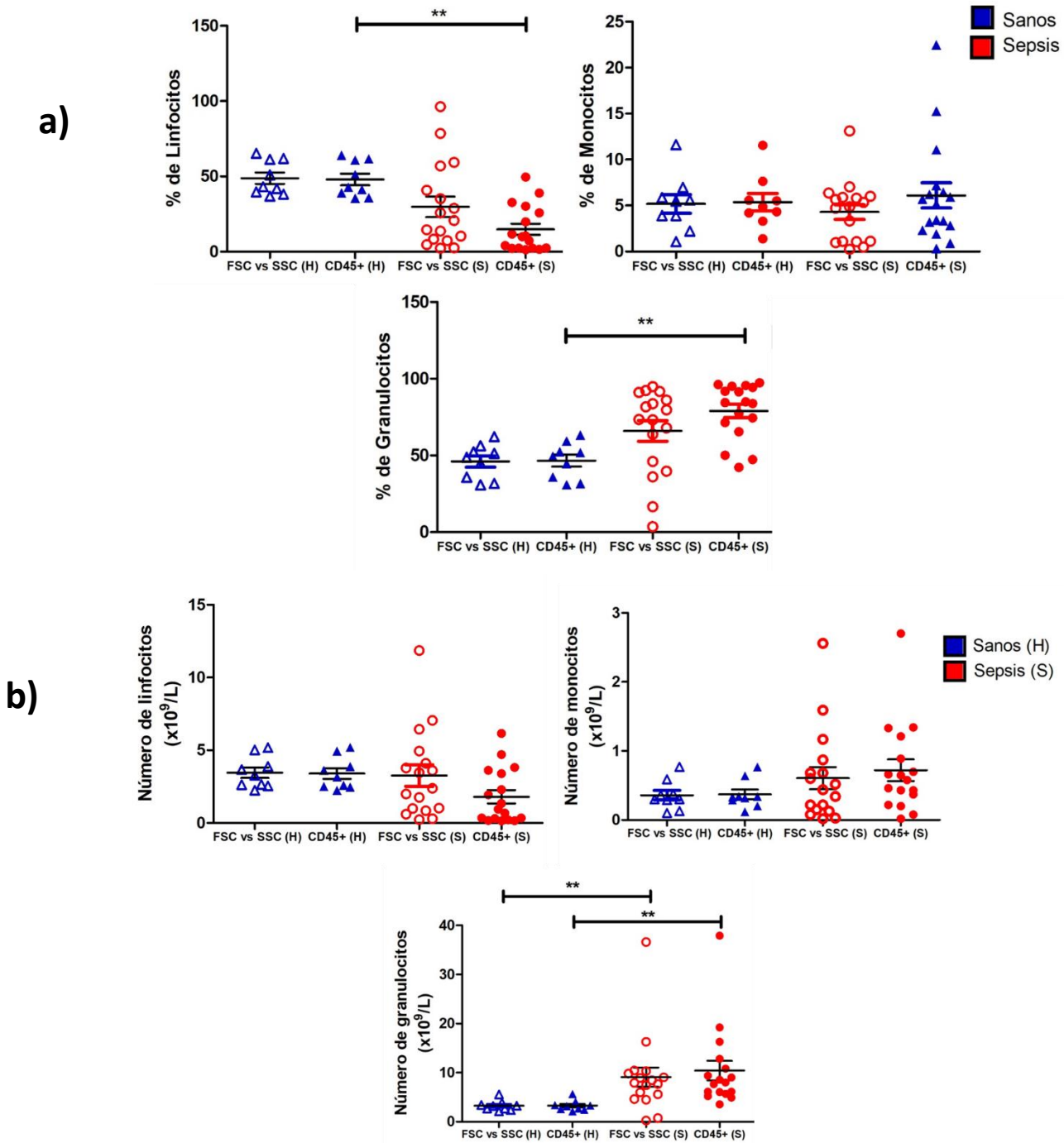
Cuando realizamos el análisis cuantitativo de los 9 sujetos sanos y 17 pacientes con sepsis analizados comprobamos que, aunque con el algoritmo B hay una tendencia a observarse que disminuye la frecuencia de linfocitos y aumenta la de granulocitos, solo al aplicar el algoritmo B, en el que se incluye CD45, fue que se observó que en pacientes con sepsis estas diferencias en las frecuencias de linfocitos y granulocitos son significativas ( $p < 0.001$ ) (**Fig 12a**). En el caso de números absolutos la granulocitosis es significativa tanto con el algoritmo A como B ( $p < 0.001$ ) (**Fig 12b**).

**Algoritmo A  
(FSC vs SSC)**

**Algoritmo B  
(CD45 vs SSC & FSC vs SSC)**

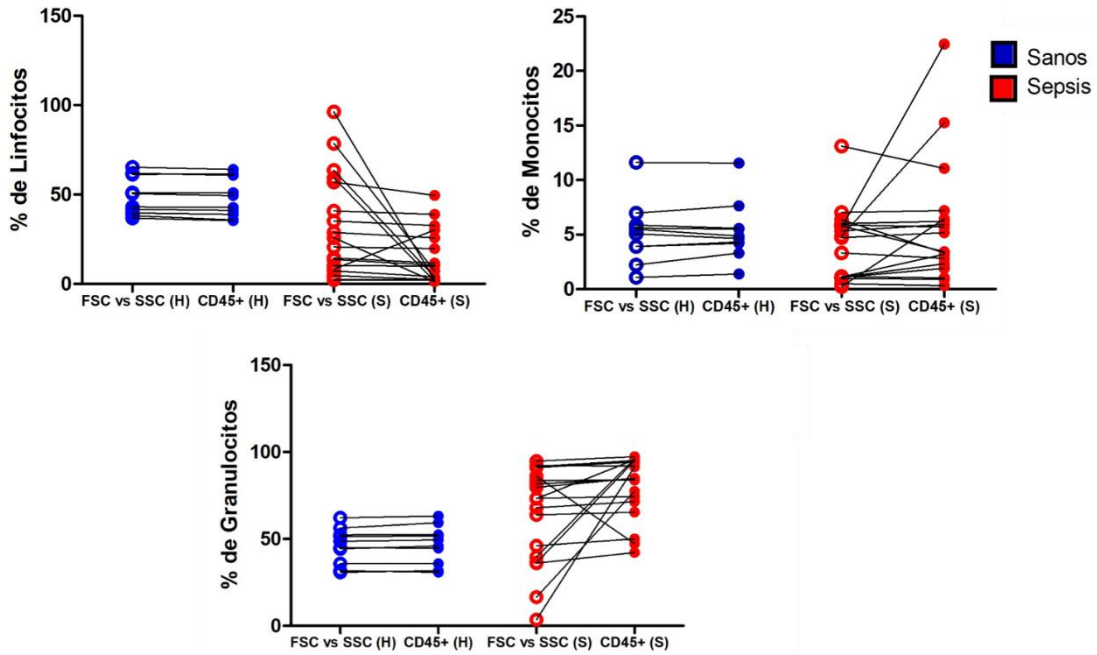


**Figura 11: Identificación de leucocitos en sangre periférica.** Se identificaron las principales poblaciones de leucocitos circulantes: Linfocitos (L), Monocitos (M) y Granulocitos (G) en muestras de sujetos sanos o de pacientes con sepsis, aplicando el algoritmo A o B. En el algoritmo A, la selección de subpoblaciones se basó en patrones de tamaño (FSC) y complejidad (SSC); mientras que para el B, primeramente se utilizó la expresión de CD45 y se completó la selección de acuerdo a tamaño y complejidad. En ambos algoritmos se partió inicialmente de la gráfica de eliminación de agregados (FSC-A vs FSC-H). Imágenes representativas de una muestra de sujeto sano y paciente con sepsis.

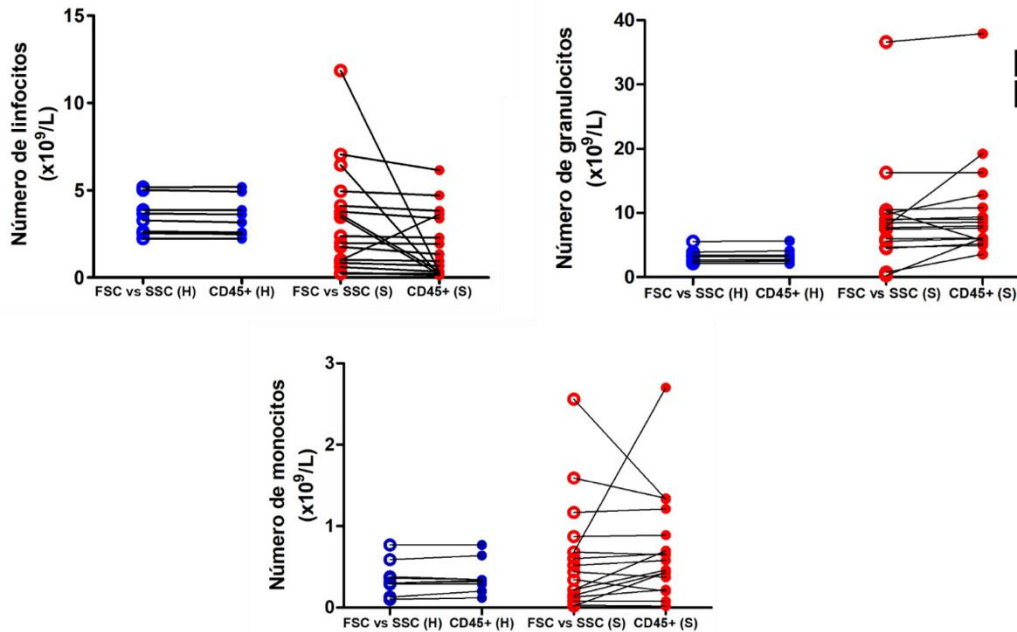


**Figura 12: CD45 favorece la identificación de linfopenia y granulocitosis en pacientes con sepsis.** Una vez identificados los leucocitos con el algoritmo correspondiente que incluya o no CD45 (A o B, respectivamente), se procedió a identificar las subpoblaciones de leucocitos. Se muestra el análisis cuantitativo **a)** de frecuencias (%) y **b)** de números absolutos de linfocitos, monocitos y granulocitos obtenidos con el algoritmo A ( $\triangle$  ó  $\circ$ ) o B ( $\blacktriangle$  ó  $\bullet$ ) en sujetos sanos (H,  $\triangle$  ó  $\blacktriangle$ ; n=10) o con sepsis (S,  $\circ$  ó  $\bullet$ ; n=18). Prueba de Dunn \*\*  $p < 0.001$ .

a)



b)



**Figura 13. En pacientes con sepsis la variación entre la aplicación del algoritmo A y B es mayor.** Se muestran **a)** las proporciones (%) y **b)** números absolutos de las poblaciones de linfocitos, monocitos y granulocitos de cada voluntario sano ( $\triangle$  ó  $\blacktriangle$ ) o paciente con sepsis ( $\circ$  ó  $\bullet$ ) al aplicar el algoritmo A (FSC vs SSC sin CD45) o B (CD45 & FSC vs SSC). Las líneas conectan el valor obtenido al analizar la misma muestra con el algoritmo A (figuras abiertas) o algoritmo B (figuras cerradas).

Estas diferencias entre los algoritmos A y B que se observa dependiendo si se analizan muestras de sujetos sanos o pacientes con sepsis puede estar relacionada con la mayor dispersión en los datos individuales para las 3 poblaciones leucocitarias en pacientes con sepsis, que se hace evidente en la **Figura 13** y que se corrobora con los coeficientes de variación mayores que se muestran en las **Tabla 5-6**, tanto para frecuencias como números absolutos.

**TABLA 5. Coeficientes de variación de las frecuencias obtenidas a partir de las muestras individuales de voluntarios sanos y pacientes con sepsis.**

	<b>COEFICIENTES DE VARIACIÓN (%)</b>			
<b>Población Leucocitaria</b>	<b>Voluntarios sanos</b>		<b>Pacientes con sepsis</b>	
	<b>Algoritmo A</b> (FSC vs SSC)	<b>Algoritmo B</b> (CD45 & FSC vs SSC)	<b>Algoritmo A</b> (FSC vs SSC)	<b>Algoritmo B</b> (CD45 & FSC vs SSC)
<b>Linfocitos</b>	23.27	24.23	94.40	102.42
<b>Monocitos</b>	58.82	53.57	76.80	92.17
<b>Neutrófilos</b>	24.12	25.14	42.24	22.97

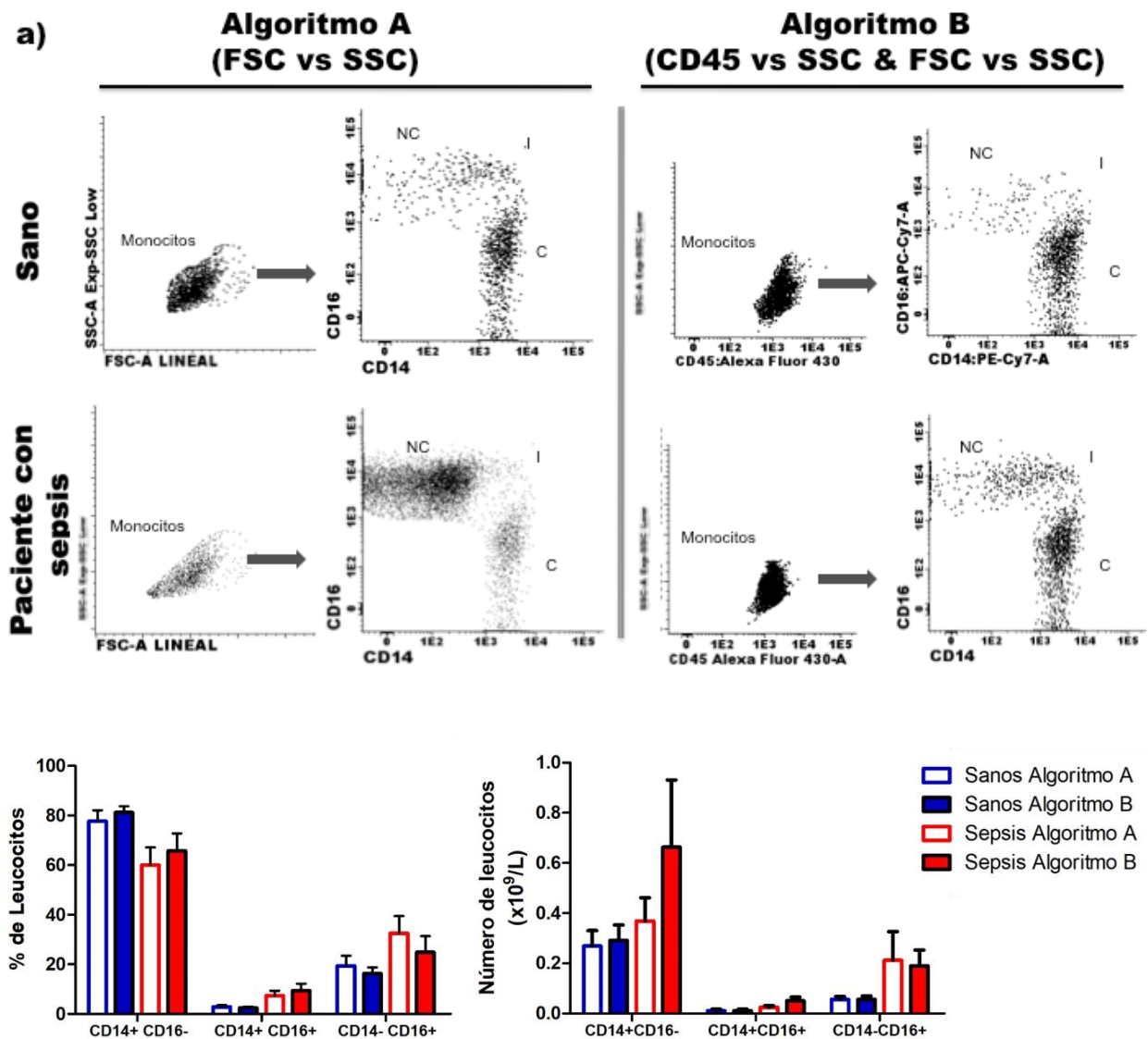
**TABLA 6. Coeficientes de variación de los números absolutos obtenidos a partir de las muestras individuales de voluntarios sanos y pacientes con sepsis.**

	<b>COEFICIENTES DE VARIACIÓN (%)</b>			
<b>Población Leucocitaria</b>	<b>Voluntarios sanos</b>		<b>Pacientes con sepsis</b>	
	<b>Algoritmo A</b> (FSC vs SSC)	<b>Algoritmo B</b> (CD45 & FSC vs SSC)	<b>Algoritmo A</b> (FSC vs SSC)	<b>Algoritmo B</b> (CD45 & FSC vs SSC)
<b>Linfocitos</b>	31.25	32.18	93.47	104.97
<b>Monocitos</b>	58.79	55.10	108.98	90.01
<b>Granulocitos</b>	31.79	32.56	88.29	78.67



Podemos observar que para las frecuencias obtenidas, en pacientes con sepsis, la utilización del algoritmo B (con CD45) respecto al uso del algoritmo A (sin CD45) aumenta el CV en linfocitos y monocitos, pero este disminuye al momento de seleccionar la población de granulocitos. Mientras que para el caso de los coeficientes de variación de los valores de números absolutos de las poblaciones leucocitarias, el algoritmo B (con CD45) se ve aumentado al identificar a la población de linfocitos, mientras que este disminuye para la población de monocitos y granulocitos, respecto a la utilización del algoritmo A (sin CD45).

Finalmente, al analizar las subpoblaciones de monocitos, claramente es más fácil identificar a los monocitos totales con el algoritmo B que incluye CD45 (**Fig. 14a**), sin embargo, la distribución general de monocitos clásicos, intermedios y no clásicos no. Aunque si se observa una tendencia a mayor diferencia en el número absoluto de monocitos clásicos entre sujetos sanos y pacientes con sepsis al utilizar el algoritmo B (**Fig. 14b**).



**Figura 14. Subpoblaciones de monocitos identificadas con el algoritmo A y B.** a) Se muestran gráficos representativos de un sujeto sano y un paciente con sepsis en los que se aplicó el algoritmo A (basado en FSC vs SSC) o B (basado en CD45 y FSC vs SSC) para la identificación de monocitos totales y de allí la subclasificación en monocitos clásicos (C, CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup>), intermedios (I, CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>) y No Clásicos (NC, CD14<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup>). b) Análisis cuantitativo incluyendo las muestras de sujetos sanos (n=9) y pacientes con sepsis (n=17). Se muestra el valor promedio +/- desviación estándar. Prueba de Dunn.

## **DISCUSIÓN DE RESULTADOS**

La accesibilidad de las células del sistema inmunológico en el tejido sanguíneo junto con su capacidad de respuesta dinámica durante los procesos de inflamación sistémica, favorece que los leucocitos se utilicen como referencia para evaluar los estados de SIRS/Sepsis <sup>70</sup>. Las cuentas de leucocitos totales, así como de las diferentes subpoblaciones mayoritarias forman parte de los criterios de diagnóstico de estos procesos de inflamación sistémica <sup>8,10</sup>.

En este trabajo se utilizaron muestras de sangre periférica tanto de sujetos sanos como de pacientes con sepsis para la identificación de estas poblaciones leucocitarias. Tal como ha sido reportado por varios autores, entre ellos Venet y cols. <sup>71</sup> observamos aumento del número total de leucocitos en los pacientes con sepsis. Concordante con las observaciones de estos autores (que lo reportaron para choque séptico) observamos que la leucocitosis es a expensas del aumento de neutrófilos, que existe disminución de linfocitos, sin encontrarse un cambio significativo en el número de monocitos.

Estos resultados concuerdan parcialmente con lo observado por Urrechaga y cols. <sup>33</sup>, que en un estudio donde de muestras de pacientes con sepsis (n=133) y controles sanos (n=586), encontraron un incremento en el número absoluto y porcentajes de neutrófilos, disminución en el número absoluto y porcentaje de linfocitos, y disminución del porcentaje de monocitos. Sin embargo, en el presente trabajo no se encontró ninguna diferencia en el aumento o disminución de la población de monocitos, ni en ninguna de sus subpoblaciones identificadas. Es importante señalar que las diferencias resultaron significativas al aplicar el algoritmo en el que se incluía CD45 además de los parámetros de tamaño (FSC) y complejidad (SSC) celular. Dado que el mismo grupo de trabajo de Urrechaga reporta aumento en el tamaño de neutrófilos y monocitos, coincidiendo con lo observado, ya que en las muestras analizadas de pacientes con sepsis, se encontró una mayor señal en el detector frontal del citómetro de flujo (FSC-A), indicando un aumento del tamaño. De igual manera, observamos a la población de granulocitos con disminución en el patrón de difracción lateral de la luz, que corresponde a menor granularidad. Esto

sugiere que estos neutrófilos se degranularon o que son formas inmaduras, como se ha reportado que ocurre frecuentemente en estados de inflamación sistémica como la sepsis. Una forma de diferenciar entre las formas maduras e inmaduras de neutrófilos es con la expresión de CD16 que si es alta, corresponde a neutrófilos maduros, por lo que su menor dispersión lateral (SSC) correspondería a degranulación <sup>27,72</sup>.

El uso de la técnica de citometría de flujo ayuda a evidenciar estas alteraciones morfológicas de los leucocitos sufridas durante el desarrollo del proceso inflamatorio sistémico, pero estas mismas alteraciones pueden dificultar la identificación de las poblaciones leucocitarias. Por ello para las subpoblaciones de monocitos utilizamos marcadores para CD14 y CD16, tal como se ha descrito para las poblaciones de monocitos clásicos, no clásicos e intermedios <sup>36,38,41,46</sup>.

Una de las alteraciones que sufren los neutrófilos al estar activados es la alta tasa de degranulación o producción de NETs, donde uno de los mayores componentes de estos gránulos o componente de estas NETs es la elastasa de neutrófilos. Esta proteasa es capaz de romper diversas proteínas y receptores, tales como IL2R, IL6R, así como el CD14 presente primordialmente monocitos, afectando el reconocimiento del monocito hacia la bacteria <sup>19</sup>. Esto puede ser de gran importancia, ya que en pacientes con sepsis, se ha observado el aumento de activación y degranulación de neutrófilos, lo cual contribuye al daño propio, pero de particular importancia, a la degradación o escisión de CD14, pudiéndose observar a monocitos intermedios (CD14<sup>+</sup> CD16<sup>+</sup>) como monocitos no clásicos (CD14<sup>-</sup> CD16<sup>+</sup>), afectándose así los números de estos, ya que observamos la tendencia al incremento de esta población de monocitos no clásicos en los pacientes con sepsis. Sin embargo, no se encontraron cambios significativos en la proporción de estas subpoblaciones entre los pacientes con sepsis y los sujetos sanos.

El no encontrar diferencias significativas en las subpoblaciones de pacientes con sepsis respecto a sujetos sanos puede deberse a la cinética en la que se da la “maduración” del eje monocito clásico-intermedio-no clásico reportada por Patel y cols. <sup>46</sup>, donde se observa que la transición de un monocito clásico a monocito intermedio se lleva a cabo

en aproximadamente 4.3 días, mientras que la de monocito intermedio a monocito no clásico es de aproximadamente 7.4 días. Esta cinética junto con el tiempo de muestreo que es máximo 72 horas posteriores al diagnóstico de sepsis puede ser una causa por la cual no se hayan encontrado diferencias significativas respecto a estas subpoblaciones de monocitos, observándose proporciones similares a aquellos provenientes de los sujetos sanos. Esto, de igual manera puede deberse a que la gran mayoría de monocitos clásicos, cerca del 99% pasa a tejidos, es decir, salen de circulación, siendo pocos aquellos que alcanzan a pasar a ser monocitos intermedios y finalmente a ser monocitos no clásicos.

En un protocolo para la identificación de linfocitos T CD4+, Janossy y cols.<sup>65</sup> incluyeron en su panel el marcador CD45, reportando la mejora de la eficiencia para la identificación de estas células, reduciendo tiempos y esfuerzos, logrando así que un técnico del citómetro de flujo pueda leer mayor número de tubos por día. También hay un estudio realizado por Collino y cols.<sup>73</sup> donde reportan que la utilización del marcador CD45 en su panel de análisis de células blásticas mediante citometría de flujo mejora notablemente la identificación fenotípica de estas células provenientes tanto de médula ósea como de sangre periférica. Es por esto que proponemos la aplicación o inclusión de este biomarcador en los laboratorios de rutina para el análisis de leucocitos.

En los resultados obtenidos en el presente trabajo se encontró un papel importante del uso del algoritmo con la inclusión de CD45 (Algoritmo B). Ya que, como se observa en la **Figura 13**, referente a las frecuencias de cada población leucocitaria, podemos observar que el uso de este algoritmo de análisis evidencía linfopenia y granulocitosis en pacientes con sepsis. Esto, a diferencia del algoritmo A que solo utiliza los parámetros de tamaño (FSC) contra complejidad (SSC) para la identificación de estas poblaciones. Por lo cual, al no incluir el marcador CD45 se puede pasar por alto esta condición de disminución de frecuencias de linfocitos a expensas del incremento de los granulocitos. Esto puede tener una repercusión a nivel clínico, que puede conllevar a un mal diagnóstico de alguna enfermedad. Este resultado muestra que la inclusión de CD45 al panel de inmunofenotipificación de sujetos con sepsis, puede ser útil cualitativamente, facilitando

la identificación de poblaciones, y corrigiendo cuantitativamente el reporte de frecuencias y números absolutos.

Esta identificación incorrecta de la población de linfocitos puede deberse a que se toman eventos contaminantes, detritus o incluso eritrocitos resistentes a la lisis asociados a procesos de inflamación o infección sistémica <sup>30,68</sup>, dado que al ser los linfocitos células de bajo tamaño y de baja complejidad y que estas se encuentran en una gráfica de FSC vs SSC (tamaño contra complejidad) muy cerca de los eventos contaminantes, detritus o eritrocitos, puedan confundirse, tomándose mayor número de eventos y clasificarlos erróneamente como linfocitos. Por ello la adición del marcador CD45 contribuirá a evitar esta mala identificación ya que no se encuentra expresado en eritrocitos y mucho menos en detritus celular. Por lo tanto, la combinación de la expresión del marcador CD45 sobre los parámetros físicos de tamaño y complejidad de las células permite la correcta identificación de las diferentes poblaciones leucocitarias a pesar de las alteraciones morfológicas que estas puedan sufrir.

Por todos los cambios mencionados anteriormente que ocurren durante la sepsis, dificultan en gran medida la identificación visual al momento de utilizar el software de análisis, aunado a eventos contaminantes como eritrocitos resistentes a la lisis, por lo que la identificación se vuelve complicada, así como que esta requiera mayor tiempo de análisis invertido, incluso a una persona que se encuentre familiarizada con los patrones de las poblaciones a identificar.

Por lo que la inclusión del marcador CD45 al panel de análisis de muestras de pacientes con sepsis facilita mucho el análisis, y puede reflejarse en variaciones cuantitativas significativa en el número o proporción de las poblaciones leucocitarias respecto a la no inclusión de este, sobre todo en el caso de muestras de pacientes con sepsis cuyo estado hiperactivación leucocitaria modifica dramáticamente los patrones de tamaño y complejidad celular. Se justifica su adición ya que es una molécula que se encuentra expresada constitutiva y diferencialmente por los leucocitos <sup>74</sup>, y no sufren cambios dados por el estado inflamatorio presentado durante la sepsis; puede sufrir cambios de isoforma

dependiendo del estado de activación celular, como por ejemplo, de linfocitos, sin embargo, estos cambios de isoformas no alteran la expresión de este y es identificado de igual manera una isoforma y otra por el anticuerpo anti-CD45 utilizado en el panel de análisis del presente trabajo.

## **CONCLUSIÓN**

La expresión constitutiva y diferencial de CD45 en los leucocitos facilita la identificación de las diferentes subpoblaciones mayoritarias así como de las subpoblaciones de monocitos. Así mismo, el uso de un algoritmo con la inclusión del marcador CD45 permite la identificación de linfopenia y granulocitosis en las muestras provenientes de pacientes con sepsis, a diferencia del algoritmo que solo utiliza los parámetros de tamaño y complejidad que no logran eficientemente identificar estas modificaciones en la distribución celular.

## **REFERENCIAS**

1. Abbas, A. K., Litchman, A. H. & Pillai, S. *Inmunología Celular y Molecular*. (Elsevier, 2015).
2. Mittal, D., Gubin, M. M., Schreiber, R. D. & Smyth, M. J. New insights into cancer immunoediting and its three component phases — elimination, equilibrium and escape. *Curr. Opin. Immunol.* **27**, 16–25 (2014).
3. Mescher, A. in *Junqueira's Basic Histology: Text and Atlas* 480 (McGraw Hill Professional, 2013).
4. Sanz, J. M., Gómez-Lahoz, A. M., Sosa-Reina, M. D. & Prieto, A. Introducción al sistema inmune. Componentes celulares del sistema inmune innato. *Medicine (Baltimore)*. **12**, 1369–1378 (2017).
5. Conway-Morris, A., Wilson, J. & Shankar-Hari, M. Immune Activation in Sepsis. *Critical Care Clinics* **34**, 29–42 (2018).
6. Matsuda, N. & Hattori, Y. Systemic inflammatory response syndrome (SIRS): molecular pathophysiology and gene therapy. *J. Pharmacol. Sci.* **101**, 189–98 (2006).
7. Mogensen, T. H. Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. *Clinical Microbiology Reviews* **22**, 240–273 (2009).
8. Van Der Poll, T., Van De Veerdonk, F. L., Scicluna, B. P. & Netea, M. G. The immunopathology of sepsis and potential therapeutic targets. *Nature Reviews Immunology* **17**, 407–420 (2017).
9. Medzhitov, R. Inflammation 2010: New Adventures of an Old Flame. *Cell* **140**, 771–776 (2010).
10. Singer, M. *et al.* The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (sepsis-3). *JAMA - J. Am. Med. Assoc.* **315**, 801–810 (2016).
11. Chen, P., Stanojic, M. & Jeschke, M. G. Differences between murine and human sepsis. *Surgical Clinics of North America* **94**, 1135–1149 (2014).



12. Ramachandran, G. Gram-positive and gram-negative bacterial toxins in sepsis: a brief review. *Virulence* **5**, 213–218 (2014).
13. Kim, J. W. *et al.* The delta neutrophil index is a prognostic factor for postoperative mortality in patients with sepsis caused by peritonitis. *PLoS One* **12**, 1–11 (2017).
14. Carrillo-Esper, R., Carrillo-Córdova, J. R. & Carrillo-Córdova, L. D. Estudio epidemiológico de la sepsis en unidades de terapia intensiva mexicanas. *Cir. Cir.* **77**, 301–308 (2009).
15. Chaudhry, H. *et al.* Role of cytokines as a double-edged sword in sepsis. *In Vivo* **27**, 669–684 (2013).
16. Faix, J. D. Biomarkers of sepsis. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* **8363**, 23–36 (2013).
17. Yao, Y.-M., Luan, Y.-Y., Zhang, Q.-H. & Sheng, Z.-Y. in *Sepsis - Diagnostic Methods and Protocols*. 5–16 (Methods in Molecular Biology, 2015).
18. Danikas, D. D., Karakantza, M., Theodorou, G. L., Sakellaropoulos, G. C. & Gogos, C. A. Prognostic value of phagocytic activity of neutrophils and monocytes in sepsis. Correlation to CD64 and CD14 antigen expression. *Clin. Exp. Immunol.* **154**, 87–97 (2008).
19. Leliefeld, P. H. C., Wessels, C. M., Leenen, L. P. H., Koenderman, L. & Pillay, J. The role of neutrophils in immune dysfunction during severe inflammation. *Crit. Care* **20**, 1–9 (2016).
20. Ma, A. C. & Kubes, P. Platelets, neutrophils, and neutrophil extracellular traps (NETs) in sepsis. *J. Thromb. Haemost.* **6**, 415–420 (2008).
21. Kovach, M. A. & Standiford, T. J. The function of neutrophils in sepsis. *Current Opinion in Infectious Diseases* **25**, 321–327 (2012).
22. Lewis, S. M., Khan, N., Beale, R., Treacher, D. F. & Brown, K. A. Depletion of blood neutrophils from patients with sepsis: Treatment for the future? *Int. Immunopharmacol.* **17**, 1226–1232 (2013).
23. Gando, S. *et al.* Serial changes in neutrophil-endothelial activation markers during

- the course of sepsis associated with disseminated intravascular coagulation. *Thromb. Res.* **116**, 91–100 (2005).
24. Sônego, F., Alves-Filho, J. C. & Cunha, F. Q. Targeting neutrophils in sepsis. *Expert Rev. Clin. Immunol.* **10**, 1019–1028 (2014).
  25. McDonald, B. & Kubes, P. Neutrophils and Intravascular Immunity in the Liver during Infection and Sterile Inflammation. *Toxicol. Pathol.* **40**, 157–165 (2012).
  26. Jimenez, M. F. *et al.* Dysregulated Expression of Neutrophil Apoptosis in the Systemic Inflammatory Response Syndrome. *Arch Surg* **132**, 1263–1270 (1997).
  27. Kipnis, E. Neutrophils in sepsis: Battle of the bands. *Crit. Care Med.* **41**, 925–926 (2013).
  28. Lipinska-Gediga, M. Neutrophils, NETs, NETosis — old or new factors in sepsis and septic shock? *Anaesthesiol. Intensive Ther.* **49**, 235–240 (2017).
  29. McDonald, B. Neutrophils in critical illness. *Cell Tissue Res.* (2017).
  30. Goyette RE, Key NS, W. E. Hematologic changes in sepsis and their therapeutic implications. *Semin. Respir. Crit. Care Med.* **25**, 645–659 (2004).
  31. Zonneveld, R., Molema, G. & Plötz, F. B. Analyzing neutrophil morphology, mechanics, and motility in sepsis: Options and challenges for novel bedside technologies. *Crit. Care Med.* **44**, 218–228 (2016).
  32. Lee, A. J. & Kim, S. G. Mean cell volumes of neutrophils and monocytes are promising markers of sepsis in elderly patients. *Blood Res.* **48**, 193–197 (2013).
  33. Urrechaga, E., Bóveda, O. & Aguirre, U. Role of leucocytes cell population data in the early detection of sepsis. *J. Clin. Pathol.* **0**, 1–8 (2017).
  34. Monneret, G. & Venet, F. Sepsis-induced immune alterations monitoring by flow cytometry as a promising tool for individualized therapy. *Cytometry Part B - Clinical Cytometry* **93B**, 376–386 (2016).
  35. Fan, X., Liu, Z., Jin, H., Yan, J. & Liang, H. P. Alterations of dendritic cells in sepsis: Featured role in immunoparalysis. *BioMed Research International* **2015**, (2015).

36. 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 CD14hi/CD16neg Monocytes: Expansion of CD14hi/CD16pos and Contraction of CD14lo/CD16pos Monocytes in Acute Liver Fail. *Cytom. Part A J. Int. Soc. Adv. Cytom.* **81 A**, 823–834 (2012).
37. Shi, C. & Pamer, E. G. Monocyte Recruitment during Infection and Inflammation. *Nature Reviews Immunology* **11**, 762–774 (2011).
38. Passlick, B., Flieger, D. & Ziegler-Hertbrock, H. W. L. Identification and Characterization of a Novel Monocyte Subpopulation in Human Peripheral Blood. *Blood* **74**, 2527–2534 (1989).
39. Smeekens, S. P. *et al.* The classical CD14++CD16- monocytes, but not the patrolling CD14+CD16+ monocytes, promote Th17 responses to *Candida albicans*. *Eur. J. Immunol.* **41**, 2915–2924 (2011).
40. Grage-Griebenow, E., Flad, H. D. & Ernst, M. Heterogeneity of human peripheral blood monocyte subsets. *J. Leukoc. Biol.* **69**, 11–20 (2001).
41. Ziegler-heitbrock, L. *et al.* Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. **116**, 5–7 (2014).
42. Shive, C. L., Jiang, W., Anthony, D. D., Lederman, M. M. & Carolina, S. Soluble CD14 is a nonspecific marker of monocyte activation. *AIDS* **29**, 1263–1265 (2015).
43. Zamani, F., Shahneh, F. Z., Aghebati-Maleki, L. & Baradaran, B. Induction of CD14 expression and differentiation to monocytes or mature macrophages in promyelocytic cell lines: New approach. *Adv. Pharm. Bull.* **3**, 329–332 (2013).
44. Mandelboim, O. *et al.* Human CD16 as a lysis receptor mediating direct natural killer cell cytotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 5640–4 (1999).
45. Romee, R. *et al.* NK cell CD16 surface expression and function is regulated by a disintegrin and metalloprotease-17 (ADAM17). *Blood* **121**, 3599–3608 (2013).
46. Patel, A. A. *et al.* The fate and lifespan of human monocyte subsets in steady state

- and systemic inflammation. *J. Exp. Med.* **214**, 1913–1923 (2017).
47. Cros, J. *et al.* Human CD14<sup>dim</sup> Monocytes Patrol and Sense Nucleic Acids and Viruses via TLR7 and TLR8 Receptors. *Immunity* **33**, 375–386 (2010).
  48. Wong, K. L. *et al.* Gene Expression profiling reveals the defining Features of the Classical, Intermediate, and Nonclassical Human Monocyte Subsets. *Blood* **118**, e16–e31 (2011).
  49. Ziegler-Heitbrock, L. The CD14<sup>+</sup> CD16<sup>+</sup> blood monocytes: their role in infection and inflammation. *J. Leukoc. Biol.* **81**, 584–592 (2007).
  50. Moniuszko, M., Bodzenta-Lukaszyk, A., Kowal, K., Lenczewska, D. & Dabrowska, M. Enhanced frequencies of CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup>, but not CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>, peripheral blood monocytes in severe asthmatic patients. *Clin. Immunol.* **130**, 338–346 (2009).
  51. Ferat-Osorio, E. *et al.* The Increased Expression of TREM-1 on Monocytes Is Associated With Infectious and Noninfectious Inflammatory Processes. *J. Surg. Res.* **150**, 110–117 (2008).
  52. Jämsä, J., Syrjälä, H., Huotari, V., Savolainen, E. R. & Ala-Kokko, T. Monocyte and Lymphocyte surface molecules in Severe Sepsis and Non-septic critically ill Patients. *APMIS* **125**, 536–543 (2017).
  53. van Engelen, T. S. R., Wiersinga, W. J., Scicluna, B. P. & van der Poll, T. Biomarkers in Sepsis. *Critical Care Clinics* **34**, 139–152 (2018).
  54. Hawley, T. S. & Hawley, R. G. *Flow Cytometry Protocols*. **263**, (Humana Press, 2011).
  55. Thiel, N., Zischke, J., Elbasani, E., Kay-Fedorov, P. & Messerle, M. Viral interference with functions of the cellular receptor tyrosine phosphatase CD45. *Viruses* **7**, 1540–1557 (2015).
  56. Puck, A. *et al.* The soluble cytoplasmic tail of CD45 (ct-CD45) in human plasma contributes to keep T cells in a quiescent state. *Eur. J. Immunol.* **47**, 193–205 (2017).

57. Tchilian, E. Z. & Beverley, P. C. L. Altered CD45 expression and disease. *Trends Immunol.* **27**, 146–153 (2006).
58. Penninger, J. M., Irie-Sasaki, J., Sasaki, T. & Oliveira-dos-Santos, a J. CD45: new jobs for an old acquaintance. *Nat. Immunol.* **2**, 389–396 (2001).
59. Hermiston, M. L., Xu, Z. & Weiss, A. CD45: A Critical Regulator of Signaling Thresholds in Immune Cells. *Annu. Rev. Immunol.* **21**, 107–137 (2003).
60. Roach, T. *et al.* CD45 regulates Src family member kinase activity associated with macrophage integrin-mediated adhesion. *Curr. Biol.* **7**, 408–417 (1997).
61. Berger, S. A., Mak, T. W. & Paige, C. J. Leukocyte Common Antigen (CD45) Is Required for Immunoglobulin E-mediated Degranulation of Mast Cells By Stuart A. Berger,\* Tak W. Mak,~ and Christopher J. Paige\*. *J. Exp. Med.* **180**, 471–476 (1994).
62. Liles, W. C., Ledbetter, J. A., Waltersdorff, A. W. & Klebanoff, S. J. Cross-linking of cd45 enhances activation of the respiratory burst in response to specific stimuli in human phagocytes. *J. Immunol.* **155**, 2175–2184 (1995).
63. Tay, S. P., Cheong, S. K., Hamidah, N. H. & Ainoon, O. Flow cytometric analysis of intracellular myeloperoxidase distinguishes lymphocytes, monocytes and granulocytes. *Malays. J. Pathol.* **20**, 91–94 (1998).
64. Glencross, D., Scott, L. E., Jani, I. V., Barnett, D. & Janossy, G. CD45-assisted PanLeucogating for accurate, cost-effective dual-platform CD4+ T-cell enumeration. *Clin. Cytom.* **50**, 69–77 (2002).
65. Janossy, G. *et al.* Affordable CD4(+)-T-cell counting by flow cytometry: CD45 gating for volumetric analysis. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **9**, 1085–94 (2002).
66. Ayar, S. P., Ravula, S. & Polski, J. M. Granulocyte, monocyte and blast immunophenotype abnormalities in acute myeloid leukemia with myelodysplasia-related changes. *Ann. Clin. Lab. Sci.* **44**, 3–9 (2014).
67. Dagur, P. K. & McCoy Jr, J. P. Collection, Storage, and Preparation of Human Blood

Cells. *Curr Protoc Cytom* **73**, 1–20 (2015).

68. Piagnerelli, M., Boudjeltia, K. Z., Vanhaeverbeek, M. & Vincent, J. Red blood cell rheology in sepsis. *Intensive Care Med* **29**, 1052–1061 (2003).
69. Maciorowski, Z., Chattopadhyay, P. K. & Jain, P. Basic Multicolor Flow Cytometry. *Curr. Protoc. Immunol.* **117**, 5.4.1-5.4.38 (2017).
70. Rimmele, T. *et al.* IMMUNE CELL PHENOTYPE AND FUNCTION IN SEPSIS. *Shock* **45**, 282–291 (2016).
71. Venet, F. *et al.* Early assessment of leukocyte alterations at diagnosis of septic shock. *Shock* **34**, 358–363 (2010).
72. Bae, M. H. *et al.* Flow cytometric measurement of respiratory burst activity and surface expression of neutrophils for septic patient prognosis. *Cytom. Part B - Clin. Cytom.* **90**, 368–375 (2016).
73. Juan Gerardo Collino, C. *et al.* Utilización estratégica de CD45 en la identificación de células blásticas por citometría de flujo. *Acta Bioquím Clín Latinoam* **40**, 173–80 (2006).
74. Im, M. *et al.* Comparative quantitative analysis of cluster of differentiation 45 antigen expression on lymphocyte subsets. *Korean J. Lab. Med.* **31**, 148–153 (2011).

## Anexo 1. Carta de consentimiento informado



### INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL UNIDAD DE EDUCACIÓN, INVESTIGACIÓN Y POLITICAS DE SALUD

#### COORDINACIÓN DE INVESTIGACIÓN EN SALUD

#### CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO (ADULTOS)

##### CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPACIÓN EN PROTOCOLOS DE INVESTIGACIÓN

Nombre del estudio: Asociación de la activación leucocitaria, endotelial y complemento en pacientes con SIRS/sepsis

---

Lugar: Servicio de Unidad de Cuidados Intensivos y Unidad de Investigación Médica en Inmunoquímica del Hospital de Especialidades CMN Siglo XXI, IMSS Ciudad de México D.F. -

---

Fecha:

---

Número de registro:

---

Objetivo del estudio: El objetivo del estudio es conocer el estado de activación de sus glóbulos blancos (o leucocitos circulantes), así como de sus células endoteliales y cascadas de complemento en su padecimiento.

---

Procedimientos: Su participación en este estudio consiste en permitirnos tomarle una muestra de sangre de la vena de su brazo de una cantidad equivalente a dos cucharadas (10 mL) en tres diferentes tubos. El tiempo que ocuparemos para realizar la toma de muestra de sangre es de aproximadamente 10 minutos o menos. En el laboratorio, donde ya no se requiere de su presencia, a una parte de su sangre la ocuparemos para marcar sus glóbulos blancos y observar los cambios que nos hablen de su capacidad de activarse y por otra parte ocuparemos la parte de su sangre que se llama suero y plasma (en caso del tubo con anticoagulante), para realizar la cuantificación de moléculas solubles liberadas por la activación de sus células endoteliales, cascadas de complemento y de aquellas que participan en inflamación como las citocinas. Además le pedimos nos permita recabar de su expediente información relacionada con la evolución de su enfermedad.

---

Posibles riesgos y molestias: La toma de muestra de sangre será del catéter central, como lo hacen en el laboratorio central y se realizará por personas expertas. En algunas ocasiones el procedimiento para tomarle una muestra de sangre puede causar una discreta molestia

---

Información sobre resultados y alternativas de tratamiento: El investigador responsable se ha comprometido a darme información oportuna sobre cualquier procedimiento alternativo adecuado que pudiera ser ventajoso para mí, así como a responder cualquier pregunta y aclarar cualquier duda que le plantee acerca de los procedimientos que se llevarán a cabo, los riesgos, beneficios o cualquier otro asunto relacionado con la investigación. También se ha comprometido a proporcionarme la información actualizada que se obtenga durante el estudio, aunque esta pudiera cambiar mi parecer respecto a mi permanencia en el mismo. Así mismo es de mi conocimiento que no recibiré ningún estímulo económico por mi participación en esta investigación y que todo el material y recursos necesarios para el mismo correrán a cargo del investigador. Declaro que se me ha informado ampliamente sobre los posibles riesgos, inconvenientes y molestias. Así como de los beneficios derivados de mi participación en este estudio y que son los siguientes: Con el estudio de mi sangre los investigadores conocerán más en relación a mi enfermedad.

---

Participación o retiro: Entiendo que conservo el derecho de retirarme del estudio en cualquier momento en que lo considere conveniente, sin que ello afecte la atención médica que recibo en el Instituto.

---

Privacidad y confidencialidad: El Investigador Responsable me ha dado seguridades de que no se me identificará en las presentaciones y/o publicaciones que deriven de este estudio y de que los datos relacionados con mi privacidad serán tratados en forma confidencial.

---

Disponibilidad de tratamiento médico en derechohabientes (si aplica): El Instituto cuenta con el tratamiento que se requiere.

---

Beneficios al término del estudio: De forma inmediata este estudio no le beneficia directamente ni modificará su tratamiento de forma alguna. Sin embargo, la información que obtengamos de este estudio beneficiará en el futuro a pacientes ya que pensamos que contribuirán a clarificar al Síndrome de Respuesta Inflamatoria Sistémica y a Sepsis, así como por que en algunos casos pueden funcionar o no las terapias que se proponen actualmente.

---

En caso de dudas o aclaraciones relacionadas con el estudio podrá dirigirse a:

Investigador Responsable: Dra. Lourdes Andrea Arriaga Pizano. Investigadora de la Unidad de Investigación Médica en Inmunoquímica.

---

Colaboradores: Dr. Marco Antonio León Gutiérrez, Jefe de la Unidad de Cuidados Intensivos,  
Dra Leonor Serrano Cuevas, médico adscrito de la Unidad de Cuidados Intensivos,  
Dr. Armando Isibasi Araujo, Jefe de la unidad de Investigación Médica en Inmunoquímica,  
Dr. Eduardo Ferat Osorio, médico adscrito al Servicio de Gastrocirugía.

---

En caso de dudas o aclaraciones sobre sus derechos como participante podrá dirigirse a: Comisión de Ética de Investigación de la CNIC del IMSS: Avenida Cuauhtémoc 330 4° piso Bloque "B" de la Unidad de Congresos, Colonia Doctores. México, D.F., CP 06720. Teléfono (55) 56 27 69 00 extensión 21230, Correo electrónico: [comision.etica@imss.gob.mx](mailto:comision.etica@imss.gob.mx)

---

Nombre y firma del paciente.

---

Nombre, firma y matricula del investigador.

Testigo 1

Testigo 2

---

Nombre, dirección, relación y firma

---

Nombre, dirección, relación y firma.