



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO

**FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
DELEGACIÓN SUR DEL DISTRITO FEDERAL
UMAE HOSPITAL DE ESPECIALIDADES CMN SIGLO XXI**

TITULO

**EXPRESIÓN DEL RECEPTOR A IL-6 EN MONOCITOS Y SU
ASOCIACIÓN CON MARCADORES DE INFLAMACIÓN
SISTÉMICA**

TESIS QUE PRESENTA:

**PEDRO AXEL BAUTISTA CASTELLANOS
PARA OBTENER EL TÍTULO DE ESPECIALISTA EN:
MEDICINA INTERNA**

TUTOR DE TESIS

DRA. EN C. LOURDES ANDREA ARRIAGA PIZANO

CO-TUTOR

DR. JUAN CARLOS ANDA GARAY



CIUDAD DE MEXICO

FEBRERO 2022



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.

**EXPRESIÓN DEL RECEPTOR A IL-6 EN MONOCITOS Y SU
ASOCIACIÓN CON MARCADORES DE INFLAMACIÓN
SISTÉMICA**



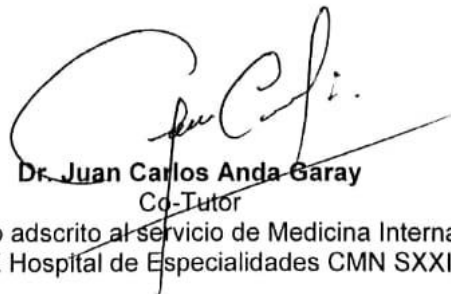
Dra. Victoria Mendoza Zubieta
Jefe de la División de Educación en Salud
UMAE Hospital de Especialidades CMN SXXI



Dr. Juan Carlos Anda Garay
Profesor titular del curso
Médico adscrito al servicio de Medicina Interna
UMAE Hospital de Especialidades CMN SXXI



Dra. en Ciencias Lourdes Andrea Arriaga Pizano
Tutor principal
Investigador asociado D
Unidad de Investigación Médica en Inmunoquímica
UMAE Hospital de Especialidades CMN SXXI



Dr. Juan Carlos Anda Garay
Co-Tutor
Médico adscrito al servicio de Medicina Interna
UMAE Hospital de Especialidades CMN SXXI



INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
DIRECCIÓN DE PRESTACIONES MÉDICAS



Dictamen de Aprobado

Comité Local de Investigación en Salud **3601**.
HOSPITAL DE ESPECIALIDADES Dr. BERNARDO SEPULVEDA GUTIERREZ, CENTRO MEDICO NACIONAL SIGLO XXI

Registro COFEPRIS **17 CI 09 015 034**
Registro CONBIOÉTICA **CONBIOETICA 09 CEI 023 2017082**

FECHA **Jueves, 05 de agosto de 2021**

Dra. Lourdes Andrea Arriaga Pizano

PRESENTE

Tengo el agrado de notificarle, que el protocolo de investigación con título **Expresión del receptor a IL-6 en monocitos y su asociación con marcadores de inflamación sistémica** que sometió a consideración para evaluación de este Comité, de acuerdo con las recomendaciones de sus integrantes y de los revisores, cumple con la calidad metodológica y los requerimientos de ética y de investigación, por lo que el dictamen es **A P R O B A D O**:

Número de Registro Institucional
R-2021-3601-144

De acuerdo a la normativa vigente, deberá presentar en junio de cada año un informe de seguimiento técnico acerca del desarrollo del protocolo a su cargo. Este dictamen tiene vigencia de un año, por lo que en caso de ser necesario, requerirá solicitar la reaprobación del Comité de Ética en Investigación, al término de la vigencia del mismo.

ATENTAMENTE

Dr. Carlos Fredy Cuevas García
Presidente del Comité Local de Investigación en Salud No. 3601

Imprimir

IMSS
SEGURIDAD Y SOLIDARIDAD SOCIAL

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Agradezco sinceramente:

A la FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO por darme las bases que me permitirán desarrollarme como un profesional de la salud.

AI INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL por el apoyo brindado durante este periodo.

AI HOSPITAL DE ESPECIALIDADES “DR. BERNARDO SEPULVEDA” DEL CENTRO MÉDICO NACIONAL SIGLO XXI por darme las bases, conocimientos y los recursos necesarios para formarme como médico especialista en Medicina Interna

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento:

A mi familia, que siempre me ha apoyado en los proyectos que he tomado en la vida. A mi padre que siempre me motivo a continuar. a mi madre que fue mi fiel compañera durante la carrera.

En forma muy especial al Dr. Juan Carlos Anda Garay quien con el ejemplo nos enseña a ser médicos especialistas altamente competentes con sentido humano.

A mi tutora de tesis la Dra. En C. Lourdes Andrea Arriaga Pizano por su tiempo, enseñanzas y sugerencias a lo largo de todo este proceso.

A mis queridos maestros por sus valiosas aportaciones y enseñanzas:

Dra. Maura Estela Noyola

Dr. Paolo Alberto Minuti

Dr. Carlos Eduardo Contreras

Dra. Alejandra Albarran Sanchez

Dr. Guillermo Flores Padilla

Dr. Jose Malagon Rangel

A todos los participantes del proyecto por formar parte de este trabajo y contribuir al mejor conocimiento de la inmunopatogénesis de la COVID-19.

Datos de Alumno:	
Apellido paterno:	Bautista
Apellido Materno:	Castellanos
Nombre:	Pedro Axel
Teléfono:	9512197426
Universidad:	Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad:	Medicina
Carrera:	Medicina Interna
Número de cuenta:	518229913
Datos de Tutor:	
Apellido paterno:	Arriaga
Apellido materno:	Pizano
Nombre(s):	Lourdes Andrea
Teléfono:	Tel. 56-27-69-00 ext. 21476.
Correo:	landapi@hotmail.com
Adscripción:	UMAE, Unidad de Investigación Médica en Inmunoquímica.
Tesis:	
Título:	Expresión del receptor a IL-6 en monocitos y su asociación con marcadores de inflamación sistémica
Número de páginas:	55
Año:	2021

Resumen

Se propone que la severidad de COVID19 está directamente relacionada con una respuesta inflamatoria exacerbada y descontrolada. La Interleucina 6 (IL-6) es uno de los principales mediadores involucrados en la respuesta inflamatoria sistémica e incluso, se ha propuesto su bloqueo para tratar de limitar este proceso inflamatorio en pacientes con enfermedad grave. Ahora bien, desde el punto de vista biológico, la IL-6 ejercerá sus efectos al ser reconocida por su receptor (IL-6R) que se expresa en múltiples células, que incluyen leucocitos, hepatocitos y células endoteliales o epiteliales. La expresión de este receptor suele incrementarse en condiciones de inflamación sistémica como sepsis o cáncer, que conllevan, en sangre, el incremento de proteínas de fase aguda, citocinas y en los índices inflamatorios como el de neutrófilo/linfocito (NLR) o monocito/linfocito (MLR). Los monocitos son de las principales células involucradas en potenciar las respuestas inflamatorias, sobre todo si se trata del subtipo conocido como monocitos no clásicos (CD14^{-/+}16⁺). Se ha reportado que en COVID19 se incrementa el número de monocitos, así como el de neutrófilos, lo que junto con la linfopenia parece se relaciona directamente con el grado de severidad; sin embargo, se desconoce si en COVID19 hay expresión diferencial del IL-6R en estos fagocitos y/o esto se relaciona con la severidad. Nuestro estudio tuvo el objetivo de determinar si existe asociación entre la cantidad de monocitos circulantes que expresen el IL-6R con valores elevados de los índices inflamatorios. Para ello, a partir de archivos de citometría para el inmunofenotipo, establecimos la cantidad de monocitos en sangre periférica de pacientes con COVID19, y la proporción de estos que expresan IL-6R; calculamos los índices NLR Y MLR y establecimos si existe alguna asociación entre la expresión de estos receptores, índices NLR y MLR y las concentraciones de los marcadores de inflamación tales como el dímero D y la ferritina. El universo de trabajo incluyó a pacientes que ingresaron con la sintomatología asociada a COVID 19, a la Unidad Médica de Alta Especialidad del Hospital de Especialidades, Centro Médico Nacional Siglo XXI, del IMSS, y que contaron con prueba positiva mediante RT-PCR positivo para SARS-CoV-2. Se incluyeron a 18 pacientes de ambos sexos, mayores de 16 años y que no presentaran enfermedades inmunosupresoras tales como VIH, virus de hepatitis C, u alguna inmunodeficiencia primaria o que se encuentren bajo tratamiento inmunosupresor como el consumo de esteroides por más de dos semanas previas a la toma de la muestra. La gravedad de la enfermedad se determinó por la escala de SOFA y la severidad por BULUT, agrupándose en moderados(n=4) y severos (n=14). Del número absoluto de monocitos circulantes encontramos que en los pacientes con COVID-19 moderado fue de 0.48×10^3 monocitos/ μL y en pacientes de severo de 0.94×10^3 monocitos/ μL . Si bien hay una tendencia a monocitosis en pacientes severos vs moderados, no observamos diferencias significativas, como tampoco las encontramos entre el porcentaje de monocitos que expresan al receptor a IL-6 (moderado: 53.43% vs severo: 54.12, $p=0.879$) y el nivel de expresión del receptor en estas células (MFI moderados: 1200 ± 870 vs severos: 1350 ± 580 , $p>0.05$). Los análisis de asociación no mostraron asociación significativa entre la expresión del receptor y los marcadores de inflamación celulares (NLR, MLR) ni solubles (ferritina, dímero D. Podemos concluir que con el número limitado de observaciones que realizamos, no observamos una asociación clara entre la gravedad del cuadro y por ende, no podría determinarse un pronóstico en base a la cantidad de receptores obtenidos.

Índice

Abreviaturas.....	7
Antecedentes.....	8
Planteamiento del problema	12
Pregunta de Investigación	12
Hipótesis	13
Objetivos.....	13
Metodología.....	14
Diseño del Estudio.....	14
Universo de trabajo	14
Criterios de inclusión.....	14
Criterios de no inclusión.....	14
Criterios de Exclusión.....	15
Tamaño de muestra	15
Variables	15
Variables dependientes.....	15
Variables Independientes	15
Definición operacional de las variables.....	16
Procedimiento General.....	22
Resultados.....	29
Discusión.....	37
Conclusión	39
Referencias	39
Anexo	42

Abreviaturas

APB	Periferal blood Adult (Sangre Periférica de Adulto)
CCL	Chemokine (C-C motif) (Quimiocina con dos residuos de cisteína adyacentes)
CCR	Chemokine (C-C motif) receptor (Receptor de quimiocina con dos residuos de cisteína adyacentes)
CD	Cluster of Differentiation (Marcador de diferenciación)
CXCL	Chemokine (C-X-C motif) ligand (Quimiocina con dos residuos de cisteína separados por un aminoácido diferente)
CXCR	Chemokine (C-X-C motif) receptor (Receptor de quimiocina con dos residuos de cisteína separados por un aminoácido diferente)
dsRNA	(Double-strandes RNA, RNA de doble cadena)
DNA	Deoxyribonucleic acid (Ácido desoxirribonucleico)
FC	Frecuencia cardíaca
GM-CSF	Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor (Factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos)
HLA	Human Leucocyte Antigen (Antígeno leucocitario humano)
ID2	DNA-binding Protein Inhibidor 2 (Factor de transcripción, inhibidor de proteína de unión a ADN 2)
IL	Interleucina
IRF3	INF regulatory factor 3
ISGs	IFN-stimulated genes
MDA5	Melanoma differentiation antigen 5
NF- κB	Nuclear Factor Kappa-Light-Chain-Enhancer of activated B cells (Factor nuclear potenciador de las cadenas kappa de las células B activadas)
NK	Natural Killer (Asesinas naturales)
PAMP	Pathogen Associated Molecular Pattern (Patrón Molecular Asociado a Patógenos)
PCT	Procalcitonina
PRR	Pattern Recognition Receptor (Receptor de Reconocimiento de Patrón)
PBS	Phosphate Buffer Solution (Solución amortiguadora de fosfatos)
PCR	Polymerase Chain Reaction (Reacción en cadena de la polimerasa)
PerCp	Peridinin Chlorophyll Protein (Fluorocromo Proteína Clorofila Peridinin)

rpm	Revoluciones por minuto
SARS	Severe Acute Respiratory Syndrome (Síndrome Agudo Respiratorio Severo)
STAT1	Signal transducers and transcription factors 1
TGFβ	Transforming Growth Factor beta (Factor de crecimiento transformante tipo beta)
TNFα	Tumor Necrosis Factor alpha (Factor de necrosis tumoral alpha)

Antecedentes

Los coronavirus (CoVs) son virus que se subdividen en los grupos alfa, beta, gamma y son los responsables, en humanos de infecciones respiratorias y otras especies, de infecciones respiratorias, también conocidas como resfriado común¹. Se conocen seis tipos de CoVs que infectan a humanos (HCoVs): dentro de los alfa-CoVs se encuentran el HCoVs-NL63 y el HCoVs-229E; y de los beta-CoVs están los HCoVs-OC43, HCoVs-HKU, SARS-CoV y MERS-CoV². Los coronavirus que tienen baja patogenicidad se identifican principalmente en vías respiratorias altas; sin embargo, dos brotes por CoVs que afectan vías respiratorias bajas se originaron por el SARS-CoV (*Severe Acute Respiratory Syndrome*) en 2002, que llegó a tener un 9.6% de mortalidad, y en el 2011 el MERS-CoV (*Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus*) con un 36% de mortalidad. En diciembre del 2019 fue detectada en Wuhan, provincia de Hubei, China, un conjunto de neumonías de etiología desconocida, y en enero del 2020 se identificó el agente causal, que se denominó como un nuevo coronavirus (2019-nCoV), actualmente denominado como SARS-CoV-2, que produce la enfermedad COVID-19³.

La mayoría de los pacientes infectados por el SARS-CoV-2 desarrollan síntomas leves y se resuelven de forma espontánea, situación que aplica especialmente a los individuos jóvenes. Recientemente el número de infectados pueden duplicarse cada 7 días y cada paciente tiene la posibilidad de diseminar la infección a otras 2.2 personas⁴. Con el avance de la pandemia se ha observado que COVID-19 puede ser desarrollado a cualquier edad, aunque las personas de edad avanzada son los que están en mayor riesgo de presentar las formas más severas de la enfermedad que incluyen, neumonías graves que se caracterizan por hipoxemia; linfopenia y elevación de mediadores inflamatorios como la proteína C reactiva (PCR), dímero D, que ha mostrado ser un marcador de mal pronóstico en pacientes con COVID-19⁵. Además se reconocen alteraciones radiológicas (en radiografías y tomografías); edema pulmonar; sepsis, Síndrome de Insuficiencia Respiratoria Aguda (ARDS, por sus siglas en inglés, *Acute Respiratory Distress Syndrome*) y choque séptico¹.

El SARS-CoV-2 es un virus de RNA, de una sola cadena y con alta homología con otros coronavirus, 79% con SARS-CoV y 51% con MERS-CoV. Posee 14 residuos de unión que se unen al receptor ACE2 (*Angiotensin-converting enzyme 2*), enzima convertidora de angiotensina 2), que se expresa en diferentes células, principalmente en las epiteliales alveolares tipo I y II. La similitud genómica con SARS-CoV podría ayudar a conocer y explicar la fisiopatología de la enfermedad⁶. En modelos experimentales animales se observó que los ratones carentes de *ace2* están protegidos de la infección por SARS. La infección por SARS-CoV y la proteína S (*Spike protein*) regulan negativamente la expresión de ACE2. Aparentemente, en forma paradójica, ACE2 reduce la posibilidad de desarrollar daño pulmonar al reducir la activación de Angiotensina II y la unión de ésta a su receptor AT1R a nivel pulmonar; esta evidencia podría explicar por que el SARS-CoV puede llegar a tener la letalidad antes mencionada por daño pulmonar^{7,8}.

Respuesta inflamatoria inducida por Coronavirus

Ya que este virus tiene rápida y robusta replicación se han observado antígenos virales en células epiteliales, endoteliales y macrófagos de vías respiratorias. Como consecuencia existe incremento en el reclutamiento de células de la respuesta inmune, neutrófilos y macrófagos en el intersticio pulmonar y alveolos, principalmente macrófagos. También existe aumento de la cantidad de neutrófilos y monocitos circulantes. Además, se ha reportado la alteración de la respuesta inmunológica dependiente de linfocitos T, además de la disminución de este grupo celular en sangre periférica. La presencia de células inmunes en mayor cantidad en el tejido afectado favorece la producción y liberación de mediadores inflamatorios del tipo de las citocinas y quimiocinas. De forma interesante existe un retraso en la expresión de interferones de tipo I (IFN Tipo I). Estos cambios descritos son parte de los mecanismos de evasión del virus y que seguramente son más complejos de lo ya descrito^{3,9,10}.

Es importante apuntar que el inicio de la respuesta del huésped comienza por el reconocimiento del virus. Tal reconocimiento empieza en el interior de la célula, a través de PAMPs (*pathogen-associated molecular patterns*) virales, como es el RNA de una y de doble cadena de SARS-CoV2. A su vez, los receptores de reconocimiento de patrones (PRRs, *Patterns Recognition Receptors*) en la célula huésped se unen a los PAMPs virales comenzando la activación celular de mecanismos para su defensa. Los PRR activados por SARS-CoV2 pueden ser los receptores TLRs (*Toll-like receptors*) de tipo 3 y 7, estos receptores se localizan en endosomas y endolisosomas. Adicionalmente, los receptores RLRs (*RIG-like receptors*) como RIG-I y MDA5, localizados en el citoplasma se unen también al SARS-CoV2. Estos receptores detectan RNA viral y activan vías de señalización antivirales que finalmente producen IFN de tipo I y citocinas pro-inflamatorias, entre las que destacan IL-1beta, TNF e IL-6^{11,12}.

La secuencia básica de eventos comienza con el reconocimiento del PAMP viral que activa cascadas de señalización intracelular que involucran la activación de factores de transcripción como IRF3 (*Interferon regulatory factor 3*), IRF 7 (*Interferon regulatory factor 7*), y NF-κB, estos factores son translocados al núcleo y posteriormente se unen a promotores específicos para genes de mediadores inflamatorios como los interferones de tipo I, citocinas y quimiocinas. Los interferones Tipo I liberados son reconocidos por el receptor de interferón (IFNR), y a su vez activan moléculas intracelulares que en forma consecutiva llevan a la traslocación nuclear de otros factores de transcripción, especialmente STAT1/STAT2/IRF9, que finalmente activan ISGs (genes estimulados por interferones, por sus siglas en inglés *IFN-stimulated genes*)¹³.

Como se comentaba previamente, en la infección por el SARS-CoV pueden observarse el desarrollo de mecanismos de evasión que podrían ser similares al SARS-CoV-2. Los coronavirus interfieren en diferentes procesos, desde el reconocimiento por TLRs y RLRs, la producción de Interferones Tipo I y la propia vía de señalización que se activa luego del reconocimiento por el receptor de Interferón en la vía de STAT1/2¹⁴. En el

caso de SARS-CoV no existe evidencia directa del papel de los mediadores inflamatorios como responsables de la patología pulmonar, sin embargo, se ha observado una asociación de la gravedad de la enfermedad con el incremento en la respuesta inflamatoria con citocinas como IL-1 β , IL-12, IL-6, quimiocinas como IL-8, MCP-1, e IP-10; y de Interferones de tipo II como IFN- γ ¹⁵.

A pesar de que mediadores inflamatorios, como las citocinas y las quimiocinas se incrementan en suero no se reconoce un patrón específico. En pacientes con SARS-CoV también hay incremento diferencial de mediadores inflamatorios (IL-2 e IP-10) durante la progresión de la enfermedad y en los momentos de mayor gravedad. Se observó en este grupo de pacientes incremento tardío de IL-6 y falta de producción de IL-10, lo que probablemente contribuya al daño inmuno-patológico¹⁶. Estas variaciones también podrían estar involucradas con la modificación en la expresión de los receptores a estas citocinas, lo que directamente impactaría sobre la respuesta de las células, por ejemplo, en la capacidad de producción de citocinas ante mediadores proinflamatorios.

Receptor de IL-6

En el caso de la IL-6 se ha descrito la existencia de dos formas en las que se puede encontrar su receptor, una es anclado a la membrana, denominado mL-6R el cual se acopla a la proteína gp130.¹⁷ Una vez que se une IL-6 al receptor de membrana o mL-6R expresado principalmente en monocitos y neutrófilos, tiene que interactuar con dos moléculas del gp130 la cual tiene la capacidad de iniciar la activación de la vía de señalización JAK-STAT que conduce a la activación de factores de transcripción tales como STAT-3, ERK y vías que involucran a PI3K. Entre las células que expresan este receptor de membrana se encuentran los macrófagos, monocitos, neutrófilos, células T y los hepatocitos. A este tipo de activación se le conoce como vías de señalización canónica o clásica ¹⁷.

Así, diferentes citocinas pueden mediar funciones similares en diversos tejidos, o un efecto específico del tejido puede ser realizado por diferentes citocinas. Sin embargo, hay excepciones ya que hay citocinas que al interactuar con su receptor no utilizan las vías clásicas de activación por ejemplo IL-8 / IL-8-R, M-CSF/ M-CSF-R, y TGF β /TGF- β -R. Por lo que las funciones de las citocinas dependerán de la interacción con sus receptores y de las vías de señalización que estas puedan activar ¹⁸.

En el caso de la IL-6 se ha descrito la existencia de dos formas en las que se puede encontrar su receptor, una es anclada a la membrana, denominado mL-6R el cual se acopla a la proteína gp130 ¹⁹.

Una vez que se une IL-6 al receptor de membrana o mL-6R expresado principalmente en monocitos y

neutrófilos, tiene que interactuar con dos moléculas del gp130 la cual tiene la capacidad de iniciar la activación de la vía de señalización JAK-STAT que conduce a la activación de factores de transcripción tales como STAT-3, ERK y vías que involucran a PI3K. Entre las células que expresan este receptor de membrana se encuentran los macrófagos, monocitos, neutrófilos, células T y los hepatocitos. A este tipo de activación se le conoce como vías de señalización canónica o clásica.¹⁷

Una de las formas de regulación de esta vía de señalización es mediante las proteínas de la familia SOCS, las cuales forman una parte de la retroalimentación negativa que regula principalmente las vías de señalización asociadas a las citocinas. SOCS-3 es el inhibidor de la vía JAK-STAT-3 que desencadena la IL-6, esta molécula tiene la capacidad de unirse a los receptores tirosina cinasa inhibiendo la fosforilación de estos y la subsecuente activación de las cinasas JAK y por lo tanto impidiendo la activación los factores de transcripción STAT-3. Se ha reportado en modelos de sepsis en ratón, hay un incremento en la expresión de SOCS3, principalmente en neutrófilos y macrófagos, lo que sugiere que la señalización por citocinas se encuentra suprimida, dando lugar al redireccionamiento de vías de señalización o a la disfunción de estas células del sistema inmune²⁰.

Respuesta Inflamatoria Sistémica en COVID19

El síndrome de respuesta inflamatoria se refiere a una respuesta exacerbada y desmedida del sistema inmunológico ante un insulto. En el caso de la sepsis, esta respuesta lleva a falla orgánica y es la infección la que desencadenaría esta desregulación inmunológica y en el caso de COVID19 en particular, sería la infección por SARS-CoV2 el agente desencadenante²¹.

Para evaluar la severidad del proceso existen escalas como el APACHE-II y SOFA, que no son exclusivos ni de sepsis ni de COVID19, pero que se han utilizado para evaluar a los pacientes durante su hospitalización²¹. Además, se han utilizado marcadores séricos de inflamación sistémica para la monitorización del estado inflamatorio. Se han reportado, analitos en suero como dímero D, la proteína C reactiva, procalcitonina y ferritina útiles en el seguimiento de estos pacientes²².

Otras escalas que se han utilizado para clasificar a los pacientes de acuerdo a la severidad incluyen a la escala BULUT, la cual es útil para clasificar a los pacientes con infección por SARS-CoV-2 ya que pueden experimentar una variedad de manifestaciones clínicas, desde la ausencia de síntomas hasta la enfermedad crítica. En esta sección de las Directrices se analiza la presentación clínica de las personas infectadas con el SARS-CoV-2 según la gravedad de la enfermedad. En general, los adultos con infección por SARS-CoV-2 se pueden agrupar en las siguientes categorías de gravedad de la enfermedad. Sin embargo, los criterios para cada categoría pueden superponerse o variar entre las pautas clínicas y los ensayos clínicos, y el estado clínico de un paciente puede cambiar con el tiempo.

También se ha propuesto la utilización de los llamados índices inflamatorios como el NLR(neutrophil/lymphocyte

ratio), el MLR (monocyte/lymphocyte ratio) o el SIRI (Systemic inflammation response index), los cuales tomando en cuenta los resultados del hemograma con diferencial, calculan la relación entre estos componentes formes. En COVID19 ya se ha reportado el incremento de estos índices, que corresponde claramente con la neutrofilia acompañada de linfopenia reportada en estos pacientes. La linfopenia se sabe que es sobre todo a expensas de linfocitos T que mueren por apoptosis ²².

Planteamiento del problema

El receptor de IL-6 en la membrana de células es indispensable para que las células puedan responder a IL-6, que en monocitos induce la producción de otros mediadores inflamatorios.

Existen diferentes indicadores de la respuesta inflamatoria sistémica, como dímero D, ferritina y proteína C reactiva, que si bien, junto con los índices como el NLR se ha visto su relación con el pronóstico de pacientes con COVID19, se ignora si esto tiene alguna relación la expresión del IL-6R en células como los monocitos.

Pregunta de Investigación

¿La expresión de receptores de IL-6 en la membrana de monocitos tendrá alguna relación con indicadores de inflamación sistémica y/o severidad de la COVID19?

Hipótesis

Ho: No existe relación con la cantidad de receptores de IL-6 en la membrana de los monocitos, con estados inflamatorios más severos en pacientes con COVID 19.

Hi: Con estados inflamatorios más severos se asociará con mayor cantidad de receptores de IL-6 en la membrana de monocitos de los pacientes con COVID19, por lo que se relacionan con peor pronóstico.

Objetivos

General.

Determinar si existe asociación entre la cantidad de monocitos circulantes que expresen el receptor a IL-6 y valores elevados de los índices y mediadores inflamatorios.

Específicos.

1. Establecer el número absoluto de monocitos circulantes en pacientes con COVID19
2. Cuantificar los números absolutos de monocitos (CD14+) que expresan al receptor a IL-6R (IL-6R+).
3. Calcular los índices NLR, MLR y SIRI.
4. Establecer si existe asociación entre la expresión de IL-6R y las concentraciones de dímero D, ferritina, NLR y MLR.
5. Establecer si existe asociación entre la expresión de IL-6R y la severidad de la COVID19.

Metodología

Diseño del Estudio

Retrospectivo: dado que se utilizaron archivos FCS 3.0 de citometría, previamente obtenidos y datos del expediente clínico de pacientes previamente atendidos. Los archivos FCS 3.0 fueron capturados en el citómetro de flujo ante la aplicación de un panel de inmunofenotipificación previamente obtenido de pacientes COVID19 de acuerdo a lo establecido en el protocolo aprobado R-2021-3601-008, así como información del expediente.

Observacional dado que no se realizó ninguna inducción de mediadores inflamatorios o el IL-6R en los monocitos.

Descriptivo. Ya que solo se reportaron los valores directamente obtenidos de las cuentas de leucocitos y su inmunofenotipificación.

Transversal Ya que se utilizó la información correspondiente a una sola medición de los pacientes.

Universo de trabajo

Pacientes adultos que ingresaron entre Febrero y Mayo de 2021 con la sintomatología asociada a COVID-19 (fiebre ≥ 38 C, tos, fatiga, cefalea, disnea) a la UMAE Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS, y que cuenten con prueba de RT-PCR positivo para SARS-CoV-2.

El protocolo R-2021-3601-008 el cual fue aprobado y en cuya carta de consentimiento se lee en la declaración de consentimiento: -Si acepto participar y que se tome la muestra para este estudios y estudios futuros, conservando su sangre hasta por __seis__ meses tras lo cual se destruirá la misma- es del que se utilizaron los archivos de citometría para hacer el análisis de inmunofenotipo aquí planteado.

Criterios de inclusión

1. Pacientes adultos de ambos sexos, mayores de 18 años que ingresaron a la UMAE Hospital de especialidades del CMN SXXI con diagnóstico de COVID-19 y que se corrobora mediante la prueba de RT-PCR.

Criterios de no inclusión

1. Pacientes portadores de enfermedades inmunosupresoras: VIH+, Virus de Hepatitis C, inmunodeficiencias primarias, artritis reumatoide, lupus eritematoso y bajo tratamiento con inmunosupresores
2. Pacientes o representantes legales que no acepten participar en el estudio

Criterios de Eliminación

1. Pacientes que rechazaron continuar participando en el estudio.
2. Pacientes con expediente incompleto.
3. Pacientes en los que no se logró efectuar la evaluación completa de la respuesta inflamatoria, serológica y celular.

Tamaño de muestra

1. Considerando las condiciones de la pandemia y el número de pacientes que recientemente se diagnostican, se consideró una muestra por conveniencia y se incluyeron a todos los pacientes que cumplieron los criterios de inclusión de Febrero a Mayo de 2021 (reclutados para el protocolo R-2021-3601-008).

Variables

Variables dependientes

1. Expresión de IL6R en monocitos.
2. Alta médica por mejoría o desenlace fatal.
3. NLR, MLR o SIRI.

Variables Independientes

1. Prueba positiva de RT-PCR para COVID-19.
2. Gravedad de la enfermedad evaluada por las siguientes escalas: SOFA, qSOFA, y SIRA (Síndrome de insuficiencia respiratoria del adulto).
3. Variables sociodemográficas, laborales y personales.
4. Edad.
5. Género.
6. Presencia de comorbilidades: diabetes mellitus, hipertensión arterial, cardiopatías, sobrepeso/obesidad.
7. Toxicomanías.

8. Actividad laboral actual (exposición a polvos y químicos), pensionado, número de trabajos.
9. Fiebre ≥ 38 C, tos, fatiga, cefalea, disnea, congestión nasal, secreción nasal, estornudos, dolor articular y muscular, dolor de garganta, diarrea.
10. Número de días con los síntomas.
11. Datos de la biometría hemática y la química sanguínea (glucosa, creatinina, perfil lipídico y hepático, índice aterogénico).
12. Dímero D, proteína C reactiva ultrasensible y fibrinógeno.
13. Características sociodemográficas (condiciones económico-sociales).

Definición operacional de las variables

Variable	Tipo	Definición conceptual	Definición operacional	Escala medición	Fuente de información
Edad	Cuantitativa continua	Tiempo en años a partir del nacimiento	Tiempo en años a partir del nacimiento	Años	Expediente clínico
Género	Cualitativa Nominal Dicotómica	Característica biológica que permite clasificar a los seres humanos en hombres o mujeres	masculino o femenino	0=hombre 1= mujer	Expediente clínico
Caso confirmado	Cualitativa Dicotómica	Persona que cumpla con la definición operacional de caso sospechoso y que cuente con diagnóstico confirmado por la Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública reconocidos por el InDRE	Positivo o negativo	Positivo o negativo a SARS CoV2	Expediente clínico/ o resultado del laboratorio reconocido a solicitud

SOFA (Sequential Organ Failure Assessment Score)	Cuantitativa Discreta	Escala utilizada para la valoración de la severidad de disfunción orgánica, la cual involucra parámetros clínicos (Frecuencia arterial media y escala de Glasgow) y de laboratorio (Plaquetas, $\times 10^3$ / μ L, Bilirrubina A, mg/dL, Creatinina, mg/Dl, etc.)	puntuación SOFA más alta está asociada con una mayor probabilidad de mortalidad	valores del 0 al 4	Expediente clínico
Índice de Masa Corporal (IMC)		Indicador que marca la relación entre el peso y la talla de un individuo utilizado en la detección del sobrepeso y obesidad en adultos.	Se calcula utilizando el peso en kilogramos dividido por el cuadrado de la talla en metros (kg/m^2)	IMC normal es de 18.5 a 24.9 sobrepes o como un IMC igual o superior a 25 y la obesidad como un	Expediente clínico

				IMC igual o superior a 30	
Cantidad de Monocitos	Cuantitativa continua	Se refiere al número de células de leucocitos CD14+ , CD16+ o CD16- en sangre periférica	Se obtiene al identificar a células no agregadas, CD45 ^{med} , que además expresen CD14 y/o CD16	Células /mL	Inmunofenotipo por citometría de flujo
IL-6R	Cualitativa continua	Expresión relativa del receptor en la superficie de las células de interés	Se obtiene al establecer el porcentaje de células que expresan el receptor y la media de la intensidad de fluorescencia del fluorocromo conjugado al anticuerpo anti -IL-6 R	Porcentaje de células y Media de la intensidad de fluorescencia (MIF)	Inmunofenotipo por citometría de flujo
SIRI	Cuantitativa continua	Systemic inflammation response index	Se calcula con la fórmula: No. Neutrófilos × No. Monocitos/ No. Linfocitos en	Puntaje	Valores de la Biometría Hemática con diferencial

			sangre periférica		
NLR	Cuantitativa continua	Índice Neutrófilo Linfocito	Se calcula al dividir el número absoluto de neutrófilos / el número de linfocitos, ambos reportados en sangre periférica	Puntaje	Valores de Biometría hemática con diferencial
MLR	Cuantitativa Continua	Índice Monocito/Linfocito	Se calcula al dividir el número absoluto de monocitos / el número de linfocitos, ambos reportados en sangre periférica	Puntaje	Valores de Biometría hemática con diferencial

DEFINICIONES

Caso sospechoso: Paciente adulto que en los últimos 7 días presento al menos dos de los siguientes signos y síntomas: tos, fiebre o cefalea. Acompañadas de al menos uno de los siguientes signos o síntomas:

- Disnea, artralgias, mialgias, odinofagia/dolor faríngeo, rinorrea, conjuntivitis, dolor torácico.

Caso confirmado: Paciente que cumplió con la definición de caso sospechoso y que cuente con diagnóstico confirmado por la Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública reconocidos por el InDRE.

Caso grave: Paciente que con neumonía, Síndrome Respiratorio Agudo Severo o insuficiencia renal.

SOFA (*Sequential Organ Failure Assessment Score*): Escala utilizada para la valoración de la severidad de disfunción orgánica, la cual involucra parámetros clínicos (Frecuencia arterial media y escala de Glasgow) y de laboratorio (Plaquetas, 1×10^3 / μ L. Bilirrubina, mg/dL. Creatinina, mg/dL. etc). Tiene valores del 0 al 4, donde una puntuación SOFA más alta está asociada con una mayor probabilidad de mortalidad. El puntaje califica la anomalía por sistema de órganos y explica las intervenciones clínicas.²³

qSOFA (*quick SOFA*): Escala simplificada denominada "SOFA rápido" para facilitar la identificación de pacientes potencialmente en riesgo de morir. Consta de tres parámetros clínicos (Frecuencia respiratoria ≥ 22 /min, cambio en el estado mental y presión arterial sistólica ≤ 100 mmHg) a los que se les asigna un punto (Valores de la escala de 0-3). La puntuación qSOFA de ≥ 2 puntos indica disfunción orgánica.²⁴

SIRA (Síndrome de Insuficiencia Respiratoria del Adulto): Síndrome agudo caracterizado por falla respiratoria de origen no cardiogénico que conlleva a disfunción en la oxigenación.²⁴

Índice de Masa Corporal (IMC): Indicador que marca la relación entre el peso y la talla de un individuo utilizado en la detección del sobrepeso y obesidad en adultos. Se calcula utilizando el peso en kilogramos dividido por el cuadrado de la talla en metros (kg/m^2). Donde un IMC normal es de 18.5 a 24.9, sobrepeso como un IMC igual o superior a 25 y la obesidad como un IMC igual o superior a 30.

Dímero D: El dímero D (DD) es un producto de degradación de la fibrina, su presencia indica un proceso de fibrinólisis posterior a una trombosis. Se expresa en FEU (Unidades Equivalentes de Fibrinógeno).

Proteína C Reactiva ultrasensible: La PCR es producida por el hígado. La concentración en suero se eleva cuando hay inflamación en todo el cuerpo. Esta es una de un grupo de proteínas llamadas "reaccionantes de fase aguda" que aumentan en respuesta a la inflamación. La prueba ultrasensible (proteína C reactiva ultrasensible) permite medir la PCR cuando la proteína se encuentra en cantidades muy pequeñas. Se expresa en mg/L.

Fibrinógeno: El fibrinógeno, última proteína de la cascada de la coagulación, puede medirse por métodos químicos o inmunitarios, se encuentra en concentraciones que van de 200 a 400 mg/dL. En condiciones de estrés actúa como un reactante de fase aguda y puede elevarse hasta 800 mg/dL. Se expresa en mg/dL.

Obesidad: El sobrepeso y la obesidad se definen como una acumulación anormal y excesiva de grasa que puede ser perjudicial para la salud.

Diabetes Mellitus: La diabetes de tipo 2 es un trastorno crónico que afecta la manera en la cual el cuerpo metaboliza el azúcar (glucosa), una fuente importante de combustible para el cuerpo.

Hipertensión arterial: La hipertensión arterial es una enfermedad crónica en la que aumenta la presión con la que el corazón bombea sangre a las arterias, para que circule por todo el cuerpo.

Cardiopatía: Es una condición patológica que involucra diferentes alteraciones del corazón como la enfermedad isquémica (alteración en el aporte de oxígeno al corazón), la insuficiencia cardiaca, entre otras.

Hepatopatía: Condición patológica que se caracteriza por alteración en la función hepática y cuya etiología puede ser de origen diverso.

Neumopatía: Condición patológica que se caracteriza por alteración en la función respiratoria y cuya etiología puede ser de diferente origen.

SIRI (systemic inflammation response index)

Procedimiento General

En nuestro modelo de muestreo no probabilístico de casos consecutivos de pacientes que cumplieron con los criterios de selección y que aceptaron participar en el estudio (o los representantes legales) mediante consentimiento informado (con firma en la carta de consentimiento informado, ver Anexos), se realizó el siguiente proyecto. Los pacientes con sintomatología de COVID-19 y que acudieron a la UMAE fueron evaluados por los médicos encargados de Admisión Continua de Urgencias de pacientes con potencial infección por SARS-CoV2. El área de *Triage* respiratorio se diseñó como un circuito *lean health* con la finalidad de ser más eficiente el proceso de valoración clínica de los pacientes.²⁵

Diagnóstico molecular y seguimiento de la carga viral

Una vez hecho el diagnóstico clínico de presunción se tomó una muestra para diagnóstico molecular (RT-PCR). Por disposición oficial, las muestras de los pacientes sospechosos son enviadas a los laboratorios de vigilancia epidemiológica del IMSS quienes son los encargados y certificados institucionalmente para realizar el diagnóstico y reportar los casos. Fueron incluidos en el estudio aquellos pacientes que ingresaron a hospitalización en esta unidad (UMAE HE CMN SXXI, IMSS). Las muestras iniciales se tomaron en pacientes sin resultado de RT-PCR, ya que la entrega del resultado lleva 48 horas. Por lo que existió la posibilidad de tomar muestras en pacientes con resultados negativos (Ver Anexo de Flujograma de muestras COVID-19).

Detección del virus SARS-CoV-2

El diagnóstico molecular se basa en la realización de una prueba de qRT-PCR de tamizaje y otra confirmatoria empleando los iniciadores y sondas diseñados por V. Corman y col. del Charité, Berlín (Anexos). El grupo de V. Corman diseñó tres juegos de iniciadores y sondas que permiten la amplificación específica de fragmentos de los genes del virus SARS-CoV-2: gen RdRp (RNA Polimerasa dependiente de RNA), gen N (proteína de la nucleocápside) y gen E (proteína de la envoltura). La prueba de tamizaje se realiza empleando la región del gen E y la prueba confirmatoria se hace utilizando los iniciadores para un gen alternativo como RdRp.

Toma de la muestra periférica

La toma de muestra de sangre se realizó por venopunción (o a través del catéter central en caso de contar con él); aproximadamente 2 tubos Vacutainer para extracción de sangre, con EDTA y sin EDTA, para obtención de suero y células para el inmunofenotipo, siguiendo los protocolos de protección para el paciente y para el personal médico (Anexo). La toma de muestra se realizó al ingreso del paciente al estudio correspondiente al

protocolo R-2021-3601-008.

Inmunofenotipificación para la determinación del Receptor mL-6R en monocitos

Utilizando inmunofenotipificación por citometría de flujo multiparamétrica, se determinó la frecuencias y números absolutos de monocitos (células FSCmedSSCmedCD45medCD14+) que expresen o no al receptor de membrana de IL-6 (mIL-6R+ o mIL-6R-, respectivamente). Es importante señalar que los archivos FCS 3.0 que se utilizaron para aplicar el algoritmo de análisis se obtuvieron al capturar en el citómetro de flujo las muestras incubadas con el panel de anticuerpos que se aplicó a las muestras en pacientes que fueron reclutados de acuerdo a lo aprobado en el proyecto R-2021-3601-008.

Panel aplicado: anti-CD45/PB; anti CD14/PECy7; anti-CD16-FITC y anti-mIL-6R/PE

Algoritmo de análisis: Para la identificación y caracterización de leucocitos circulantes se utilizaron los siguientes criterios:

Células (FSC vs SSC), no agregadas (FSC-A vs FSC-H) y CD45+

A partir de leucocitos totales, se utilizó, para la identificación de las subpoblaciones:

- Monocitos: FSCmedSSCmedCD45medCD14-/+/+CD16-/+/+ y mL-6R+ mL-6R-

Además, se estableció por los valores de la media de intensidad de fluorescencia (MFI) para establecer las diferencias en la expresión del receptor mencionado.

Análisis estadístico

Se realizó un análisis estadístico de los datos demográficos, así como de los hallazgos de laboratorio para comparar la severidad de los pacientes que tuvieron COVID-19 moderado y severo. Para este análisis se realizó una prueba estadística no paramétrica (U de Mann-Whitney) para variables cuantitativas, donde una $p < 0.05$ representa una diferencia estadística significativa. Para las variables ordinales (BULUT, Diabetes, obesidad, HAS, sexo) se realizó una prueba de Chi cuadrada donde una $p < 0.05$ representa una diferencia estadística significativa. Para expresar los resultados se muestra la media aritmética seguido del percentil 25 y 75 para expresar los rangos de distribución de los datos. *En la expresión de los rangos de Ferritina y PCR se utilizó el valor mínimo y máximo ya que solo se contaba con las determinaciones de 2 pacientes.

Se utilizó estadística descriptiva con base a las variables de interés. Así para las variables categóricas se reportaron proporciones. Para variables cuantitativas discretas o continuas, se determinó la media, mediana, moda y desviación estándar. De acuerdo con su distribución y varianza, se determinó el uso de estadísticos

paramétricos o no-paramétricos. Así el análisis comparativo entre las características sociodemográficas (hombre vs mujer), edad (categorías de edad), comorbilidades (enfermo vs no enfermo), gravedad; con la concentración de los monocitos y su expresión de IL6R, ya sea frecuencias, medias o distribuciones de poblaciones, se realizaron pruebas de hipótesis mediante t de Student ó U-Mann Whitney o ANOVA de 2 vías y post-prueba Bonferroni o Dunn cuando así corresponda. Se elaboraron los mejores modelos de regresión logística, para estimar el riesgo de ser positivo para SARS-CoV2, así como de su gravedad y de presentar mayor o menor incremento en la respuesta inflamatoria calculada por los índices inflamatorios referidos anteriormente. Los resultados se procesaron utilizando Excel, GraphPad Prisma y el programa STATA v.14.

Aspectos éticos

Para la realización del presente protocolo se solicitó la aprobación por el Comité de local de ética del HE del CMN “Siglo XXI” del IMSS (3601). Se considera que los sujetos incluidos en este estudio tienen un riesgo mínimo, por lo que se solicitó la firma de una carta de consentimiento informado antes de iniciar el estudio.

Marco Legal: Este protocolo respeta las disposiciones enunciadas en la declaración de Helsinki de 1975 y sus enmiendas, así como los códigos y normas internacionales vigentes para las buenas prácticas en la investigación clínica. Aunado a lo anterior, se respetó cabalmente los principios contenidos en el Código de Núremberg, el Informe Belmont, el Código de Reglamentos Federales de Estados Unidos, y en el reglamento de la ley general de salud, tanto en materia de investigación para la salud (Título Quinto). El protocolo no califica para subordinarse a otras normas oficiales mexicanas específicas, ya que no utilizo compuestos radioactivos, compuestos químicos marcados, animales de laboratorio, partículas o materiales susceptibles de transmitir enfermedades infecciosas, ingeniería genética, terapia celular, ni sustancias químicas reactivas o tóxicas.

Se considera que los sujetos sometidos a este estudio se solicitó la firma de una carta de consentimiento informado antes de iniciar el mismo (Anexo Carta de consentimiento). La persona que solicitó dicho consentimiento fue el investigador principal y/o alguno de los colaboradores que fueron considerados como sub-investigadores.

Riesgo de la Investigación: Dado que este protocolo incluye la toma de muestras sanguíneas, esta se clasificó con un riesgo tipo I, Mínimo, pero sólo se realizó en pacientes adultos.

Balance Riesgo/Beneficio: Dado que las determinaciones biológicas se realizaron en el laboratorio, donde la UIMIQ cuenta con las medidas de bioseguridad necesarias para ello, así como el manejo confidencial de los datos, y de que el procedimiento en los pacientes es parte del manejo indicado por su padecimiento. El único riesgo fue relacionado con la toma de sangre, la cual se realizó por un profesional con experiencia, los cuales se ven altamente superados por el beneficio académico y social de la información a obtener.

Confidencialidad: Todos los pacientes que ingresaron al estudio fueron tratados con apego estricto de confidencialidad, quedando prohibida la divulgación de sus datos personales y médicos. Las hojas de recolección de datos (Anexo Recolección de datos) fueron mantenidas en resguardo en la UIMIQ de la UMAE Hospital de Especialidades del CMN SXXI y únicamente se utilizaron por los investigadores con los propósitos de la investigación en curso. En el expediente clínico del paciente se anotaron los datos clínicos relevantes para el seguimiento de su padecimiento y los resultados de laboratorio. Los reportes de la investigación, como los artículos publicados o presentaciones en congresos y foros académicos, no llevará ningún dato personal de los participantes.

Selección de Participantes: Antes de invitar a cada paciente a participar en el proyecto, se le explico ampliamente su patología y las estrategias terapéuticas que le corresponden al momento, así como la posibilidad de participación en la investigación y los riesgos y potenciales beneficios que pueden derivarse de ello. Si el paciente decidió no ser seleccionado para el protocolo se continuo su tratamiento tal y como está indicado de acuerdo con el protocolo de tratamiento de pacientes con COVID-19 en la UMAE Hospital de Especialidades de CMN "Siglo XXI", acordes a la norma oficial mexicana vigente y la normativa del IMSS. Se invitará a participar a los pacientes que cumplan con los criterios de inclusión y que exenten los criterios de exclusión o eliminación.

Aspectos de Bioseguridad

1. La investigación se consideró de riesgo mínimo en aspectos de bioseguridad ya que se colectarán datos del expediente clínico, a través de un cuestionario, así como de la toma de muestra sanguínea por personal calificado y con material estéril. Se anexo la carta de bioseguridad que informa acerca del manejo de muestras de sangre. Los RPBI generados durante el estudio fueron manejados bajo la norma NOM-087-ECOL-SSA1-2002.
2. Las muestras de sangre fueron recolectadas en el área asignada para manejo de los pacientes con COVID-19. Una vez colectadas estas se colocaron en hieleras etiquetadas adecuadamente para su transporte exclusivo a la Unidad de Investigación Médica en Inmunoquímica de la UMAE del Hospital de Especialidades, Centro Médico Nacional Siglo XXI, por los investigadores responsables del proyecto.
3. Las muestras de sangre se obtuvieron de pacientes que cumplieron los criterios de selección. Todo el material punzocortante que fue empleado para la toma de muestras, así como el desecho de estas en el laboratorio fueron depositados en recipientes especiales, manejados por expertos para el desecho de estos. La UIMIQ cuenta con campanas y áreas para el trabajo con nivel de bioseguridad 2, necesarias para el manejo de las muestras de estos pacientes.
4. Las muestras de plasma o suero fueron almacenadas en ultracongeladores del biobanco de la Unidad de Investigación Médica en Inmunoquímica de la UMAE del Hospital de Especialidades, Centro Médico Nacional Siglo XXI a -80°C hasta su procesamiento.
5. Este protocolo no contempla el uso de fármacos o de procedimientos quirúrgicos más allá de los indicados por las normas vigentes para el tratamiento de infección por SARS-CoV2, por lo cual los riesgos y efectos colaterales para el participante son mínimos, restringiéndose a la posible formación de un hematoma debido a la punción de la vena para la toma de la muestra. Esto se explica con detenimiento en la carta de consentimiento y asentimiento.

Resultados

Se incluyó a un total de 18 pacientes para este estudio, que de acuerdo a los criterios de severidad basados en la indicación para intubación instrumentada correspondían a pacientes Graves. Estos pacientes fueron subclasificados de acuerdo a la escala de BULUT en pacientes con enfermedad: Moderada (n=4; 22% del total) o Severa (n=14; 77.8% del total).

Como se observa en la Tabla 1, donde se resumen sus características demográficas y clínicas, no encontramos diferencias significativas entre los grupos de moderado y severo en cuanto a edad, peso, IMC, distribución por género, comorbilidades, ni tampoco en lo referente al hemograma ni en las variables evaluadas por la química sanguínea. Por lo que nuestros grupos son comparables de acuerdo a estas variables.

Tabla 1: Datos demográficos y hallazgos de laboratorio de los pacientes en este estudio

VARIABLE	TOTAL (n=18)	MODERADOS (n=4)	SEVEROS (n=14)	Valor de P
Edad	51.4 (\pm 12.99)	50.75 (\pm 10.47)	51.64 (\pm 13.97)	0.8954
Sexo (%)	Hombres: 11 (61.1) Mujeres: 7 (38.9)	Hombres: 3 (75) Mujeres: 1 (25)	Hombres: 8 (57.1) Mujeres: 6 (42.9)	0.5182
Peso (Kg)	87.07 (\pm 17.33)	93.75 (\pm 10.87)	85.16 (\pm 18.65)	0.3408
IMC	31.39 (\pm 6.68)	32.11 (\pm 4.57)	31.18 (\pm 7.3)	
COMORBILIDADES				
Diabetes (%)	2 (11.1)	0 (0)	2 (14.3)	0.4227
HAS (%)	4 (22.2)	0 (0)	4 (28.6)	0.2254
Obesidad (%)	10 (55.6)	3 (75)	7 (50)	0.3749
HALLAZGOS DE LABORATORIO				
CITOMETRÍA HEMÁTICA				
Leucocitos (10³/μL)	8.88 (6.69-10.64)	8.88 (6.59-11.46)	8.89 (6.69-10.64)	0.9588
Plaquetas (10⁹/μL)	306.78 (211.5-359.5)	410.75 (185.5-638.25)	277.07 (211.5-291)	0.3817
Neutrófilos %	73.67 (75.32-88)	78.52 (73.37-82.8)	72.28 (74.72-88.57)	0.5739

Linfocitos %	10.31 (5.8-13.65)	12.05 (5.62-18.72)	9.81 (5.7-11.8)	0.5605
Monocitos %	4.62 (3.4-5.57)	5.55 (3.47-7.52)	4.36 (3.4-4.97)	0.2886
Eosinófilos %	0.02 (0.0-0.0)	0.0 (0.0-0.0)	0.03 (0.0-0.02)	0.5539
Basófilos %	0.27 (0.1-0.37)	0.45 (0.15-0.75)	0.21 (0.1-0.3)	0.1399
Neutrófilos (10 ³ /μL)	7.34 (5.23-9.59)	7.06 (4.96-9.47)	7.42 (5.69-9.66)	0.7065
Linfocitos (10 ³ /μL)	1.51 (0.6-1.38)	0.94 (0.61-1.3)	1.67 (0.59-1.47)	0.8784
Monocitos (10 ³ /μL)	0.83 (0.28-0.55)	0.46 (0.34-0.57)	0.94 (0.27-0.51)	0.2598
Eosinófilos (10 ³ /μL)	0.0 (0.0-0.0)	0.0 (0.0-0.0)	0.0 (0.0-0.00)	0.5539
Basófilos (10 ³ /μL)	0.02 (0.01-0.04)	0.05 (0.01-0.09)	0.02 (0.0-0.02)	0.1451
QUÍMICA SANGUÍNEA				
Dímero D (mg/mL)	86.77 (0.59-2.06)	257.09 (0.55-706.75)	38.11 (0.58-1.59)	0.5052
Ferritina (ng/mL)	1009.8 (323.35- 1056.75)	3092 (2011-4173) *	593.37 (273-990)	0.0303
PCR (mg/dL)	12.07 (2.1-22.41)	11.12 (0.79-31.58) *	12.36 (3.54- 21.05)	0.5734
Fibrinógeno (mg/dL)	524.3 (103.75-788.75)	268.91 (1.81-747)	597.21 (402- 788.75)	0.2771
PCT (ng/mL)	0.44 (0.1-0.23)	1.32 (0.05-3.49)	0.14 (0.1-0.19)	0.7533
Glucosa (mg/dL)	108.89 (89.25-124)	111 (91.5-131.5)	108.28 (87-120)	0.5552
Urea (mg/dL)	44.18 (28.9-52.45)	38.52 (30.52-47.6)	45.92 (27.8-53.5)	0.6798
Creatinina (mg/dL)	0.80 (0.69-0.93)	0.74 (0.7-0.8)	0.82 (0.68-0.95)	0.5908

Es de destacar que entre las variables bioquímicas, sólo se encontró diferencia significativa para ferritina sérica entre los pacientes con COVID-19 BULUT moderado o severo (p=0.0303) mostrando un valor mayor en pacientes que presentaron la enfermedad moderada.

Número absoluto de monocitos circulantes en pacientes con COVID-19 BULUT moderado y severo

Se determinó el número absoluto de monocitos circulantes resultando una media de 4.62×10^3 monocitos/ μL en el número total de pacientes, en los pacientes con COVID-19 moderado fue de 0.48×10^3 monocitos/ μL y de 0.94×10^3 monocitos/ μL en pacientes que cursaron con la enfermedad severa cuya distribución se puede observar en la figura 1. No se encontraron diferencias significativas en la distribución de monocitos de pacientes moderados y severos con COVID-19.

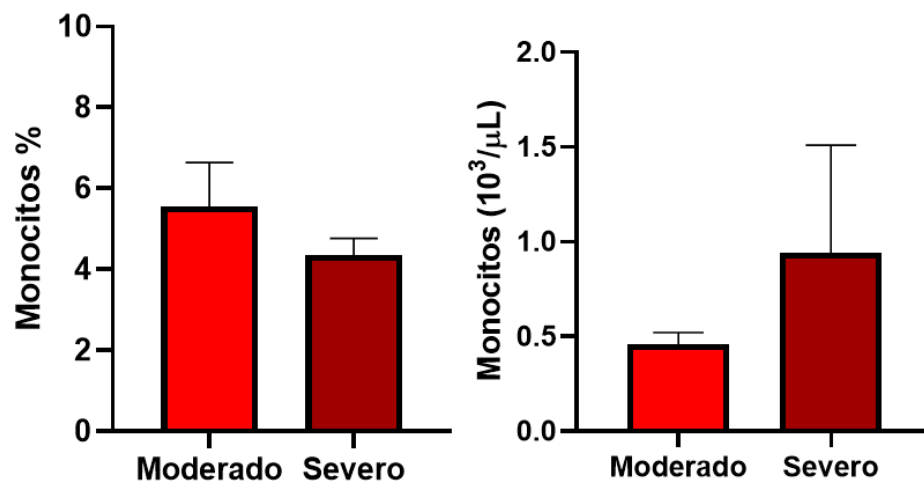


Figura 1: Distribución de monocitos circulantes en pacientes con COVID-19 BULUT severo y moderado. En la gráfica se muestra el porcentaje (%) y número absoluto de monocitos (cel/mL) en el grupo de pacientes con enfermedad grave con BULUT moderado ($n=4$) o severo ($n=14$) con las barras de error estándar. Prueba estadística: U de Mann-Whitney.

Número absoluto de monocitos que expresan IL-6R

Se determinó mediante citometría de flujo multiparamétrica el porcentaje de monocitos CD14+ que expresan el receptor de IL-6 (IL-6R+) y se calculó (basados en los datos de biometría hemática con diferencial) el número absoluto de monocitos que expresan este receptor (Tabla 2).}

Tabla 2: Monocitos IL-6R+ en pacientes con COVID-19 moderados y severos

Monocitos	Total (n=18)	Moderado (n=4)	Severo (n=14)	Valor de p
Monocitos IL-6R+ (%)	53.97 (45.29-60.95)	53.43 (45.31-60.27)	54.12 (45.29-62.69)	0.8784
Monocitos absolutos IL-6R+ ($10^3/\mu\text{L}$)	0.384 (0.1597-0.2919)	0.2461 (0.1703-0.3323)	0.4234 (0.1493-0.264)	0.6451
IMF Monocitos IL-6R+	1415.33 (1134-1453.25)	1291.75 (1038.5-1444.75)	1450.64 (1134-1510.25)	>0.9999

Posteriormente se realizó un análisis estadístico con una prueba U de Mann-Whitney en donde no se encontraron diferencias estadísticas significativas entre el número absoluto de monocitos que expresan IL-6R en pacientes con COVID-19 moderados o severos. La distribución de estos monocitos comparando la severidad se muestra en la figura 2.

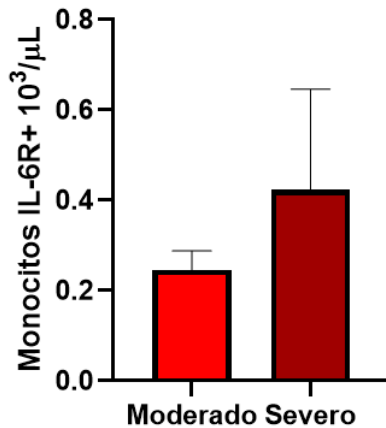


Figura 2: Distribución de monocitos IL-6R+ en pacientes con COVID-19 severo o moderado. En la gráfica se muestra el porcentaje y número absoluto de monocitos con sus barras de error estándar de la prueba estadística U de Mann-Whitney.

También se comparó la distribución porcentual de monocitos IL-6R+ y de la intensidad de fluorescencias (MFI) para comparar la variación en la expresión de este receptor en las células monocíticas, se realizó el análisis estadístico correspondiente a datos no paramétricos (U de Mann-Whitney) donde una $p < 0.05$ corresponde a una diferencia significativa estadísticamente pero no se encontraron diferencias entre COVID-19 severo y moderado como se observa en la tabla 2. Para observar la distribución de estas células en la severidad de la enfermedad se graficaron las medias aritméticas con el error estándar como se muestra en la figura 3.

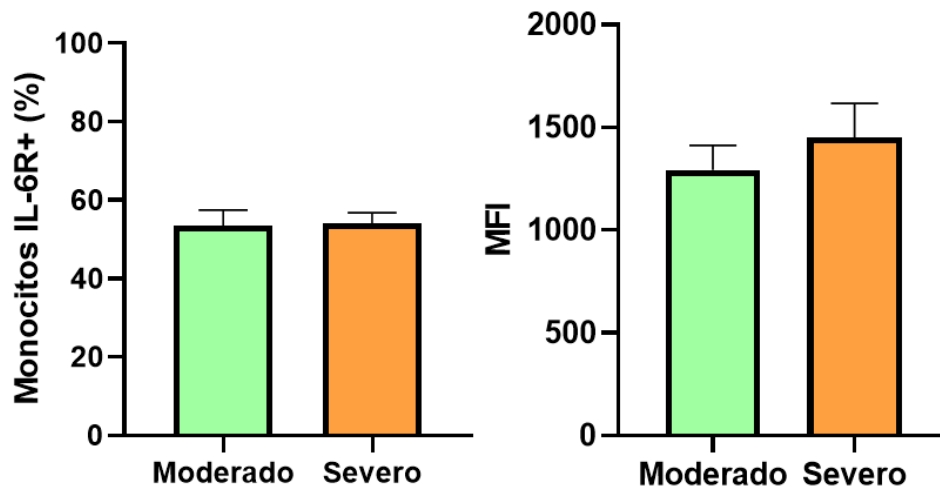


Figura 3: Distribución porcentual de monocitos IL-6R+.

Se muestran los porcentajes(%) de monocitos IL-6R+ y el valor de la media de la intensidad de fluorescencia (MFI) de monocitos provenientes pacientes que tuvieron COVID-19 moderado o severo de acuerdo a la escala BULUT.

Cálculo de los índices NLR, MLR y SIRI

Con los datos obtenidos de la citometría hemática se calcularon los índices NLR, MLR y SIRI de pacientes con COVID-19 moderado o severo, posteriormente se aplicó una prueba estadística para datos no paramétricos (U de Mann-Whitney) para observar una diferencia estadística significativa se espera una $p < 0.05$, estos cálculos se muestran en la tabla 3, donde se muestran las medias aritméticas de los índices seguido del percentil 25 y 75 como rango de la distribución de los datos. En el cálculo de SIRI para los pacientes moderados se muestra el valor mínimo y máximo como rango ya que solo se contó con dos determinaciones.

Tabla 3: índices NLR, MLR y SIRI en pacientes con COVID-19 moderado o severo

Índice	Total (n=18)	Moderado (n=4)	Severo (n=14)	Valor de p
NLR	8.84 (4.86-14.18)	9.24 (3.92-14.66)	8.73 (5.77-13.63)	0.8784
MLR	0.46 (0.32-0.57)	0.54 (0.35-0.81)	0.44 (0.28-0.57)	0.5739
SIRI	7.93 (1.66-7.64)	9.71 (1.1-18.31) *	7.64 (1.76-7.36)	0.9231

No se encontraron diferencias estadísticas significativas entre los índices NLR, MLR y SIRI en pacientes con COVID-19 severo o moderado

Asociación entre la expresión de IL-6R y las concentraciones de dímero D, Ferritina, NLR y MLR

Para determinar si existe alguna correlación entre la expresión de IL-6R en monocitos de pacientes con COVID-19 severo o moderado con diferentes marcadores e índices de inflamación se realizaron correlaciones de Spearman, una prueba estadística para datos no paramétricos en donde el valor de r cercano a 1 representa una mayor probabilidad de que ambas variables estén relacionadas una con otra y además determina la p donde una $p < 0.05$ representa una diferencia estadística significativa entre los datos de los paciente severos y moderados, los resultados se muestran en la figura 4.

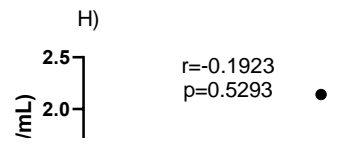
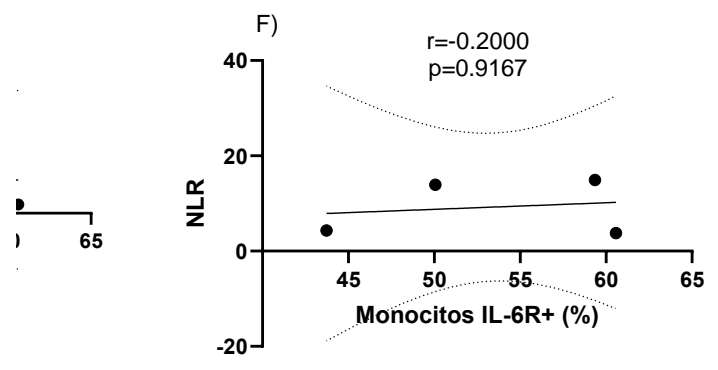
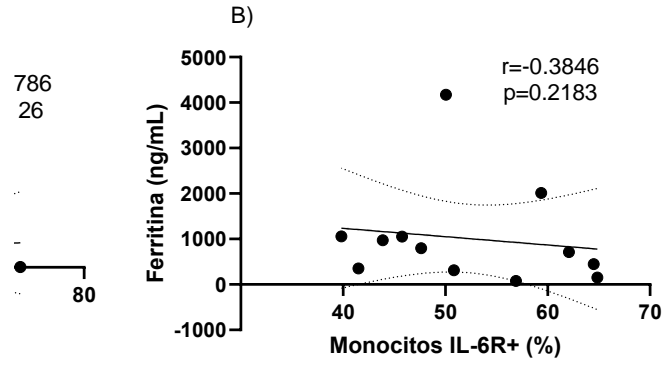


Figura 4: Correlación del porcentaje de monocitos IL-6R+ de pacientes con COVID-19 moderado o severo. Total (n=18) graficas: A, B, C, D; Pacientes con COVID-19 moderado (n=4) graficas: E, F, G; Pacientes con COVID-19 severo (n=14) gráficas: H, I, J, K. No se realizó la correlación de la ferritina en pacientes moderados ya que solo se tienen determinaciones de dos pacientes.

Se encontró que podría existir una tendencia a relación entre la concentración de dímero D y la distribución porcentual de los monocitos IL-6R+(Figura 4, gráfica E).

Discusión

En la COVID-19 se han estudiado diferentes marcadores de la respuesta inflamatoria para evaluar el comportamiento de esta enfermedad, moléculas clásicas de la inflamación como la IL-6, el dímero D, la ferritina además de los índices NLR, MLR y SIRI que han servido para evaluar el estado inflamatorio en los estadios de los pacientes que han padecido esta enfermedad, se ha observado la constante necesidad de evaluar predictores para determinar el mejor tratamiento y mejora oportuna de los pacientes. La importancia de la respuesta inflamatoria en la COVID-19 radica en controlar esta respuesta exacerbada y para esto se debe entender el origen de esta²⁶. La IL-6 es una citocina proinflamatoria que activa a diferentes poblaciones celulares, como se ha estudiado poco el papel de esta citocina en los monocitos en donde no se ha determinado una relación directa entre la expresión del receptor de IL-6 (IL-6R) en los monocitos, una de las células más importantes para la resolución del proceso inflamatorio, en este trabajo se encontró que no existe una diferencia estadísticamente significativa entre la expresión de IL-6R en monocitos provenientes de pacientes con COVID-19 severo o moderado, como se ha visto que las terapias antagonistas del IL-6R como el tozilizumab no generan un beneficio directo para la resolución de la enfermedad severa mientras que otros trabajos apoyan el uso de este biológico como un blanco que ayuda a disminuir el cuadro inflamatorio²⁷, sin embargo es importante comparar estos grupos de pacientes con la cantidad de IL-6R que se expresa en individuos sanos para evaluar su distribución con un control.

Tampoco se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los valores de los índices inflamatorios como NLR, MLR y SIRI, reflejando una gran homogeneidad de los valores de la distribución leucocitaria en pacientes moderados o severos con COVID-19, sugiriendo que las afectaciones en las poblaciones de leucocitos, como la linfopenia es independiente de la severidad de la enfermedad sin embargo se mantiene como referencia en los hemogramas para el diagnóstico diferencial de COVID-19²⁸.

Cuando estos índices se relacionan con la expresión de IL-6R en este trabajo no se observan diferencias significativas, mientras que los índices NLR, MLR, SIRI se han observado aumentados en la COVID-19 se observó que como los monocitos no aumentan su expresión de IL-6R y entre los estadios moderado y severo de la enfermedad no existe una asociación directa entre estos. De la misma forma marcadores inflamatorios como el dímero D y la ferritina se mantienen homogéneos en los pacientes que presentan un cuadro

moderado o severo en este trabajo, en contraste con trabajos previos donde estos marcadores aumentan con la severidad²⁹, esto se puede deber al número de observaciones con los que se cuentan en este trabajo, y aumentarlas nos daría un panorama más claro de como se comporta la expresión de IL-6R.

Cómo se mencionó previamente los marcadores inflamatorios marcadamente elevados y las citocinas proinflamatorias elevadas como la IL-6 se asocian a COVID 19 severo y desenlace fatal, por lo que el bloqueo de la vía inflamatoria puede prevenir la progresión de la enfermedad³⁰. Actualmente la indicación de uso de agentes como tocilizumab está indicado solo en pacientes con requerimiento alto de oxígeno, es decir pacientes con enfermedad severa y que se encuentran en las primeras 24 a 48 horas posteriores al ingreso hospitalario. Sin embargo, también su inicio ha sido indicado en pacientes con requerimientos bajos de oxígeno que continúan con progresión de la enfermedad a pesar del uso de dexametasona y que tienen marcadores inflamatorios significativamente elevados.

Una limitante importante en el uso de estos agentes es tener precaución en pacientes con inmunosupresión, es importante recalcar que las recomendaciones de grupos de expertos varían, actualmente la sociedad estadounidense de enfermedades infecciosas (IDSA) sugiere agregar estos agentes a pacientes que reciben glucocorticoides que presenten COVID 19 progresivo grave o crítico y que presenten elevación de marcadores de inflamación sistémica³¹.

La evidencia actual sugiere beneficio en la mortalidad con tocilizumab donde su aplicación en pacientes hospitalizados con COVID-19, la mortalidad por todas las causas fue menor entre los que recibieron tocilizumab en comparación con placebo o tratamiento estándar. Se ha observado en diversos estudios que el beneficio de agregar estos agentes depende del momento del inicio y sobre todo como apoyo al tratamiento con dexametasona, ya que los estudios han sugerido que los pacientes presentaban más probabilidades de beneficiarse en aquellos donde se utilizó los glucocorticoides³².

Sin embargo, otros ensayos no han logrado demostrar un beneficio en la mortalidad con estos agentes, al ser utilizados en pacientes con COVID-19 grave que no estaban intubados, pero que además tenían un estado proinflamatorio (elevación de ferritina, PCR, dimero D) no se detectó diferencia en la tasa de intubación o muerte comparado con placebo³³. Por lo tanto el porqué de los diferentes resultados observados en diferentes estudios es incierta, lo que sugiere que existen muchas otras implicaciones que los niveles

de receptores de interleucina 6, siendo clave la fase clínica del paciente, que la cantidad de receptores expresados por las células del sistema inmunológico, en este caso en concreto por los monocitos, lo que sugiere que la fase de la enfermedad que probablemente se asocie más a otros eventos (daño pulmonar, fase de la lesión pulmonar) tiene mayor impacto, que la cantidad en concreto de los receptores.

Por el numero limitado de observaciones (n=4 en el caso de moderado) es factible se requiera aumentar el numero de pacientes en este grupo, nos podría brindar información mas clara de este fenómeno, también la correlación entre ferritina, NLR y MLR en pacientes con COVID-19 severo podrían sugerir una tendencia a presentar datos estadísticamente significativo por sus valores de p cercanos a 0.05, pero es necesario aumentar el número de observaciones (pacientes) para tener una evidencia mas clara del comportamiento de estos marcadores y la severidad de la enfermedad.

Conclusión

Podemos determinar por los hallazgos obtenidos en este trabajo que en la enfermedad por COVID-19 ya sea en estadio moderado y severo de acuerdo al BULUT, los monocitos no presentan mayor expresión de IL-6R y no solo ello, sino que además marcadores inflamatorios tales como el dinero D y la ferritina, se observaron niveles similares en los diferentes cuadros de severidad que se abordaron. Por lo que no existe una asociación clara entre la gravedad del cuadro y por ende determinar un pronóstico en base a la cantidad de receptores obtenidos. Sin embargo, es importante recalcar que esto puede deberse al número de observaciones obtenidas y por ende es importante aumentarlas para obtener un mejor panorama de la expresión de IL-6R.

Referencias

1. Velavan, T. P., & Meyer, C. G. (2020). The COVID-19 epidemic. *Tropical medicine & international health : TM & IH*, 25(3), 278–280. <https://doi.org/10.1111/tmi.13383>
2. Wu, D., Wu, T., Liu, Q., & Yang, Z. (2020). The SARS-CoV-2 outbreak: What we know. *International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases*, 94, 44–48. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.03.004>
3. Liu, J., Zheng, X., Tong, Q., Li, W., Wang, B., Sutter, K., Trilling, M., Lu, M., Dittmer, U., & Yang, D. (2020). Overlapping and discrete aspects of the pathology and pathogenesis of the emerging human pathogenic coronaviruses SARS-CoV, MERS-CoV, and 2019-nCoV. *Journal of medical virology*, 92(5), 491–494. <https://doi.org/10.1002/jmv.25709>
4. Chan, J. F., Yuan, S., Kok, K. H., To, K. K., Chu, H., Yang, J., Xing, F., Liu, J., Yip, C. C., Poon, R. W., Tsoi, H. W., Lo, S. K., Chan, K. H., Poon, V. K., Chan, W. M., Ip, J. D., Cai, J. P., Cheng, V. C., Chen, H., Hui, C. K., ... Yuen, K. Y. (2020). A familial cluster of pneumonia associated with the 2019 novel coronavirus indicating person-to-person transmission: a study of a family cluster. *Lancet (London, England)*, 395(10223), 514–523. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30154-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30154-9)
5. Zhou, F., Yu, T., Du, R., Fan, G., Liu, Y., Liu, Z., Xiang, J., Wang, Y., Song, B., Gu, X., Guan, L., Wei, Y., Li, H., Wu, X., Xu, J., Tu, S., Zhang, Y., Chen, H., & Cao, B. (2020). Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. *Lancet (London, England)*, 395(10229), 1054–1062. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30566-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30566-3)
6. Sohrabi, C., Alsafi, Z., O'Neill, N., Khan, M., Kerwan, A., Al-Jabir, A., Iosifidis, C., & Agha, R. (2020). World Health Organization declares global emergency: A review of the 2019 novel coronavirus (COVID-19). *International journal of surgery (London, England)*, 76, 71–76. <https://doi.org/10.1016/j.ijisu.2020.02.034>
7. Imai, Y., Kuba, K., Rao, S., Huan, Y., Guo, F., Guan, B., Yang, P., Sarao, R., Wada, T., Leong-Poi, H., Crackower, M. A., Fukamizu, A., Hui, C. C., Hein, L., Uhlig, S., Slutsky, A. S., Jiang, C., & Penninger, J. M. (2005). Angiotensin-converting enzyme 2 protects from severe acute lung failure. *Nature*, 436(7047), 112–116. <https://doi.org/10.1038/nature03712>

8. Imai, Y., Kuba, K., & Penninger, J. M. (2008). The discovery of angiotensin-converting enzyme 2 and its role in acute lung injury in mice. *Experimental physiology*, 93(5), 543–548. <https://doi.org/10.1113/expphysiol.2007.040048>
9. Channappanavar, R., & Perlman, S. (2017). Pathogenic human coronavirus infections: causes and consequences of cytokine storm and immunopathology. *Seminars in immunopathology*, 39(5), 529–539. <https://doi.org/10.1007/s00281-017-0629-x>
10. Kindler, E., & Thiel, V. (2016). SARS-CoV and IFN: Too Little, Too Late. *Cell host & microbe*, 19(2), 139–141. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.01.012>
11. Kumar, H., Kawai, T., & Akira, S. (2011). Pathogen recognition by the innate immune system. *International reviews of immunology*, 30(1), 16–34. <https://doi.org/10.3109/08830185.2010.529976>
12. Wu, B., & Hur, S. (2015). How RIG-I like receptors activate MAVS. *Current opinion in virology*, 12, 91–98. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2015.04.004>
13. Kindler, E., Thiel, V., & Weber, F. (2016). Interaction of SARS and MERS Coronaviruses with the Antiviral Interferon Response. *Advances in virus research*, 96, 219–243. <https://doi.org/10.1016/bs.aivir.2016.08.006>
14. Prompetchara, E., Ketloy, C., & Palaga, T. (2020). Immune responses in COVID-19 and potential vaccines: Lessons learned from SARS and MERS epidemic. *Asian Pacific journal of allergy and immunology*, 38(1), 1–9. <https://doi.org/10.12932/AP-200220-0772>
15. Wong, C. K., Lam, C. W., Wu, A. K., Ip, W. K., Lee, N. L., Chan, I. H., Lit, L. C., Hui, D. S., Chan, M. H., Chung, S. S., & Sung, J. J. (2004). Plasma inflammatory cytokines and chemokines in severe acute respiratory syndrome. *Clinical and experimental immunology*, 136(1), 95–103. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2004.02415.x>
16. Chien, J. Y., Hsueh, P. R., Cheng, W. C., Yu, C. J., & Yang, P. C. (2006). Temporal changes in cytokine/chemokine profiles and pulmonary involvement in severe acute respiratory syndrome. *Respirology (Carlton, Vic.)*, 11(6), 715–722. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1843.2006.00942.x>
17. Yawata, H., Yasukawa, K., Natsuka, S., Murakami, M., Yamasaki, K., Hibi, M., Taga, T., & Kishimoto, T. (1993). Structure-function analysis of human IL-6 receptor: dissociation of amino acid residues required for IL-6-binding and for IL-6 signal transduction through gp130. *The EMBO journal*, 12(4), 1705–1712.



18. Curfs, J. H., Meis, J. F., & Hoogkamp-Korstanje, J. A. (1997). A primer on cytokines: sources, receptors, effects, and inducers. *Clinical microbiology reviews*, 10(4), 742–780. <https://doi.org/10.1128/CMR.10.4.742>
19. Müllberg, J., Geib, T., Jostock, T., Hoischen, S. H., Vollmer, P., Voltz, N., Heinz, D., Galle, P. R., Klouche, M., & Rose-John, S. (2000). IL-6 receptor independent stimulation of human gp130 by viral IL-6. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 164(9), 4672–4677. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.164.9.4672>
20. Rose-John, S., Waetzig, G. H., Scheller, J., Grötzinger, J., & Seeger, D. (2007). The IL-6/sIL-6R complex as a novel target for therapeutic approaches. *Expert opinion on therapeutic targets*, 11(5), 613–624. <https://doi.org/10.1517/14728222.11.5.613>
21. Bersanelli, M., Giannarelli, D., Castrignanò, P., Fornarini, G., Panni, S., Mazzoni, F., Tiseo, M., Rossetti, S., Gambale, E., Rossi, E., Papa, A., Cortellini, A., Lolli, C., Ratta, R., Michiara, M., Milella, M., De Luca, E., Sorarù, M., Mucciarini, C., Atzori, F., ... Buti, S. (2018). INfluenza Vaccine Indication During therapy with Immune checkpoint inhibitors: a transversal challenge. The INVIDia study. *Immunotherapy*, 10(14), 1229–1239. <https://doi.org/10.2217/imt-2018-0080>
22. Amezcua-Guerra, L. M., Audelo, K., Guzmán, J., Santiago, D., González-Flores, J., García-Ávila, C., Torres, Z., Baranda-Tovar, F., Tavera-Alonso, C., Sandoval, J., & González-Pacheco, H. (2021). A simple and readily available inflammation-based risk scoring system on admission predicts the need for mechanical ventilation in patients with COVID-19. *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society ... [et al.]*, 70(6), 731–742. <https://doi.org/10.1007/s00011-021-01466-x>
23. Fowler, R. A., Lapinsky, S. E., Hallett, D., Detsky, A. S., Sibbald, W. J., Slutsky, A. S., Stewart, T. E., & Toronto SARS Critical Care Group (2003). Critically ill patients with severe acute respiratory syndrome. *JAMA*, 290(3), 367–373. <https://doi.org/10.1001/jama.290.3.367>
24. Singer, M., Deutschman, C. S., Seymour, C. W., Shankar-Hari, M., Annane, D., Bauer, M., Bellomo, R., Bernard, G. R., Chiche, J. D., Cooper-Smith, C. M., Hotchkiss, R. S., Levy, M. M., Marshall, J. C., Martin, G. S., Opal, S. M., Rubenfeld, G. D., van der Poll, T., Vincent, J. L., & Angus, D. C. (2016). The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA*, 315(8), 801–810. <https://doi.org/10.1001/jama.2016.0287>

25. Mihara, M., Hashizume, M., Yoshida, H., Suzuki, M., & Shiina, M. (2012). IL-6/IL-6 receptor system and its role in physiological and pathological conditions. *Clinical science (London, England : 1979)*, 122(4), 143–159. <https://doi.org/10.1042/CS20110340>
26. Magro, G. (2020). SARS-CoV-2 and COVID-19: Is interleukin-6 (IL-6) the ‘culprit lesion’ of ARDS onset? What is there besides Tocilizumab? *SGP130Fc. Cytokine: X*, 2(2), 100029.
27. Liu, B., Li, M., Zhou, Z., Guan, X., & Xiang, Y. (2020). Can we use interleukin-6 (IL-6) blockade for coronavirus disease 2019 (COVID-19)-induced cytokine release syndrome (CRS)? *Journal of autoimmunity*, 111, 102452. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2020.102452>
28. Bastug, A., Bodur, H., Erdogan, S., Gokcinar, D., Kazancioglu, S., Kosovali, B. D., ... & Yilmaz, F. M. (2020). Clinical and laboratory features of COVID-19: Predictors of severe prognosis. *International immunopharmacology*, 88, 106950.
29. Peng, J., Qi, D., Yuan, G., Deng, X., Mei, Y., Feng, L., & Wang, D. (2020). Diagnostic value of peripheral hematologic markers for coronavirus disease 2019 (COVID-19): A multicenter, cross-sectional study. *Journal of clinical laboratory analysis*, 34(10), e23475.
30. Mehta P, McAuley DF, Brown M, et al. COVID-19: consider cytokine storm syndromes and immunosuppression. *Lancet* 2020; 395:1033.
31. Infectious Diseases Society of America Guidelines on the Treatment and Management of Patients with COVID-19 <https://www.idsociety.org/practice-guideline/covid-19-guideline-treatment-and-management/> (Accessed on February 21, 2021).
32. Ghosn L, Chaimani A, Evrenoglou T, et al. Interleukin-6 blocking agents for treating COVID-19: a living systematic review. *Cochrane Database Syst Rev* 2021; 3:CD013881.
33. Stone JH, Frigault MJ, Serling-Boyd NJ, et al. Efficacy of Tocilizumab in Patients Hospitalized with Covid-19. *N Engl J Med* 2020; 383:2333.

Anexo

Anexo 1. Carta de consentimiento informado

Anexo 1. Carta de consentimiento informado

 INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL SEGURIDAD Y SOLIDARIDAD SOCIAL	
 INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL UNIDAD DE EDUCACIÓN, INVESTIGACIÓN Y POLÍTICAS DE SALUD COORDINACIÓN DE INVESTIGACIÓN EN SALUD	
Carta de consentimiento informado para participación en protocolos de investigación (adultos)	
Nombre del estudio:	“Expresión del receptor a IL-6 en monocitos y su asociación con marcadores de inflamación sistémica”
Patrocinador externo (si aplica):	NO APLICA
Lugar y fecha:	
Número de registro institucional:	
Justificación y objetivo del estudio:	<p>A usted se le invita a participar en este estudio por que cumple con los criterios de inclusión, que dentro de ellos es presentar la enfermedad COVID-19, generada por el virus SARS-CoV2 (Coronavirus).</p> <p>Nuestro objetivo es conocer si un tipo de células de defensa (leucocitos) particularmente aquellas conocidas como linfocitos que están más activadas aunque en menor número del normal en respuesta al proceso infeccioso/inflamatorio de pacientes con COVID19.</p> <p>Al igual que usted, otras personas más serán invitadas a participar. Su participación en este estudio es completamente voluntaria. Por favor lea la información que le proporcionamos, y haga las preguntas que desee antes de decidir si desea o no participar.</p>
Procedimientos:	<p>Si usted acepta participar ocurrirá lo siguiente:</p> <p>Le pediremos que nos permita tomarle de su brazo una muestra de sangre al inicio de su evaluación por el servicio de emergencia/urgencias o a su ingreso al área de atención hospitalaria a pacientes con COVID19. La cantidad de sangre que le tomaremos equivale a una cucharada sopera regular (6mL). También requerimos que nos otorgue autorización para tomar algunos datos de su expediente clínico que nos permitan saber detalles del proceso infeccioso.</p> <p>De la muestra de sangre, ya en el laboratorio, tomaremos una pequeña parte y la pondremos en contacto con moléculas (anticuerpos) que al unirse o no a las células (leucocitos) en su sangre indican el tipo de célula y si está o no activada (inmunofenotipo) expresando el receptor a la molécula conocida como IL-6, que es una molécula que al ser reconocidas por las células se espera favorezca la inflamación.</p>
Posibles riesgos y molestias:	<p>Dolor o moretón en el brazo donde entra la aguja para tomar la sangre. En este estudio más allá del dolor mínimo asociado con la toma de sangre, las molestias incluyen las asociadas a la recopilación de la información mediante el cuestionario y la toma de signos vitales. Toda la información, tanto la anterior como la recopilada de su expediente clínico, será tomada bajo absoluta reserva y no se manipularán ni expiondrán de ninguna manera sus datos personales, ya que no son necesarios para el análisis.</p>
Posibles beneficios que recibirá al participar en el estudio:	<p>Aunque directamente no obtendrá ningún beneficio de los datos obtenidos, estos permitirán verificar si la activación de las células mieloides pueden o no servir como indicadores de los pacientes a complicarse o resolver más rápido la enfermedad y orientar la vigilancia selectivamente en un futuro para oras personas que lleguen a padecer de COVID19 o enfermedades parecidas.</p>
Información sobre resultados y alternativas de tratamiento:	<p>Usted recibirá el tratamiento adecuado para resolver la infección respiratoria que padece, independientemente que resulte ser por COVID-19 u otro agente infeccioso diferente a SARS CoV2, en el remoto caso de presentarse complicaciones asociadas a su participación en el presente estudio por la toma de muestra de sangre, el IMSS otorgará y cubrirá todas las atenciones requeridas.</p> <p>Si a Usted le interesan conocer sus resultados de lo que analizamos de su sangre y células de defensa, puede contactar a la responsable del proyecto, a la Dra. Lourdes Andrea Arriaga Pizano al teléfono 55 56 276900 ext. 21476</p>
Participación o retiro:	<p>Su participación en este estudio es completamente voluntaria. Si usted decide no</p>



participar, seguirá recibiendo la atención médica brindada por el IMSS, se le ofrecerán los procedimientos establecidos dentro de los servicios de atención médica del IMSS. Es decir, que, si usted no desea participar en el estudio, su decisión, no afectará su relación con el IMSS y su derecho a obtener los servicios de salud u otros servicios que recibe del IMSS. Si en un principio desea participar y posteriormente cambia de opinión, usted puede abandonar el estudio en cualquier momento. El abandonar el estudio en momento que quiera no modificará de ninguna manera los beneficios que usted tiene como paciente atendida en el MSS. Para los fines de esta investigación sólo utilizaremos la información que usted nos ha brindado desde el momento en que acepto participar y hasta el momento en el cual nos haga saber que ya no desea participar.

Privacidad y confidencialidad:

La información que obtengamos de su expediente clínico será guardada de manera confidencial, para garantizar su privacidad. Cuando los resultados de este estudio sean publicados o presentados en conferencias no se dará información que pudiera revelar su identidad. Su identidad será protegida y ocultada. Para proteger su identidad le asignaremos un número que utilizaremos para identificar sus datos, y usaremos ese número en lugar de su nombre en nuestras bases de datos.

Declaración de consentimiento:

Después de haber leído y habiéndome explicado todas mis dudas acerca de este estudio:

- No acepto participar en el estudio.
- Si acepto participar y que se tome la muestra solo para este estudio.
- Si acepto participar y que se tome la muestra para este estudios y estudios futuros, conservando su sangre hasta por seis meses tras lo cual se destruirá la misma.

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

Investigadora o Investigador Responsable: Dra. Lourdes Andrea Arriaga Pizano, Unidad de Investigación Médica en Inmunología Hospital de Especialidades, CMNN "Siglo XXI", IMSS
Teléfono. 55 56 276900 ext. 21476

Colaboradores: Dr. Pedro Axel Bautista Castellanos, Tel: 56 27 6900 ext. 21544

En caso de dudas o aclaraciones sobre sus derechos como participante podrá dirigirse a: Comité Local de Ética de Investigación en Salud del 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: comité.eticainv@imss.gob.mx

Nombre y firma del participante

Nombre y firma de quien obtiene el consentimiento

Testigo 1

Testigo 2

Nombre, dirección, relación y firma

Nombre, dirección, relación y firma

Este formato constituye una guía que deberá completarse de acuerdo con las características propias de cada protocolo de investigación, sin omitir información relevante del estudio.

Clave: 2810-009-013

Anexo 2. Cronograma

	Bimestre 1 Mayo-Junio 2021	Bimestre 2 Julio-Agosto 2021	Bimestre 3 Sept-Oct 2021	Bimestre 4 Nov-Dic 2021
Diseño del protocolo	X			
Registro ante Comités locales de Ética e Investigación	X			
Recolección de datos clínicos		X	X	X
Análisis del Inmunofenotipo de leucocitos circulantes		X	X	X
Cálculo de los índices NLR, MLR y SIRI				
Análisis estadístico				X
Revisión Bibliográfica	X	X	X	X
Redacción de trabajo escrito				X

Anexo 3. Hoja de recolección de datos

Nombre del paciente							
Número de afiliación							
Teléfono							
Edad							
Género		Masculino			Femenino		
Peso (kg)							
Talla (m)							
Comorbilidades	Comorbilidades (Índice de Charlson)						
	Diabetes	Si (1)	No (0)	Hipertensión Arterial	Si (1)	No	
	Complicación crónica de DM	Si (1)	No (0)	Dislipidemia	Si (1)	No	
	Enfermedad arterial periférica	Si (1)	No (0)	Insuficiencia cardíaca IV	Si (1)	No	
	Enfermedad vascular cerebral	Si (1)	No (0)	Cardiopatía isquémica /IAM	Si (1)	No	
	Demencia	Si (1)	No (0)	Insuficiencia renal crónica	Si (1)	No	
	Epilepsia	Si (1)	No (0)	Insuficiencia hepática aguda	Si (1)	No	
	Enf. Tejido conectivo	Si (1)	No (0)	Cirrosis hepática	Si (1)	No	
	Hipotiroidismo	Si (1)	No (0)	Lupus	Si (1)	No	
	inmunosupresión	Si (1)	No (0)	infección VIH /SIDA	Si (1)	No	
	RCP previo a ingreso	Si (1)	No (0)	EPOC	Si (1)	No	
	Linfoma	Si (1)	No (0)	Leucemia	Si (1)	No	
	Tumor solido	Si (1)	No (0)	Úlcera gastroduodenal	Si (1)	No	
	Tabaquismo	Si (1)	No (0)	Exposición humo	Si (1)	No	
	Medicación Crónica						
Diagnóstico de ingreso							
Fecha ingreso a TRIAGE							
Fecha de ingreso a unidad COVID							
Fecha de inicio de síntomas							
Síntomas iniciales		Si	No		Si		
Otros síntomas				Fatiga			
				Diarrea			
				Náuseas			
				Hiposmia/anosmia			
				Artralgias			
				Cefalea			
				Dolor torácico			
				Otros, especifique			
Laboratorios	Parámetro		Ingreso		Días 3-7		Día
	Hemoglobina						
	Leucocitos totales						
	Linfocitos totales						
	Neutrófilos totales						
	Plaquetas						
	Creatinina						
	Glucosa						
	Bilirubinas totales						
	DHL						
	Proteína C reactiva						
	Procalcitonina						
	Dímero D						
	Fibrinógeno						
	CK total						
	Uresis (ml/kg/hora)						
	Lactato						

Anexo 4. Carta de Bioseguridad

CARTA DE ANUENCIA POR EL COMITÉ DE BIOSEGURIDAD PARA EFECTUAR EL ESTUDIO, CON IMPLICACIONES DE BIOSEGURIDAD

Quien suscribe Dra. Lourdes Andrea Arriaga Pizano con número de matrícula 99092680, adscrita a la Unidad de Investigación Médica en Inmunología, Hospital de Especialidades “Dr Bernardo Sepúlveda Gutiérrez”, Centro Médico Nacional SIGLO XXI, hace constar que el protocolo titulado: “Expresión del receptor a IL-6 en monocitos y su asociación con marcadores de inflamación sistémica”, del cual es responsable, TIENE IMPLICACIONES DE BIOSEGURIDAD debido a que se trabajará con (marcar las opciones que apliquen):

- (X) Material biológico infecto-contagioso: (Tejido sanguíneo)
- (X) Muestras de pacientes con COVID19 (probable o comprobado)
- () Cepas patógenas de bacterias o parásitos: __(bacteria o parásito)_____
- () Virus: __(virus)_____
- () Material radiactivo: __(radioisótopo(s))_____
- () Animales y/o células y/o vegetales genéticamente modificados: (tipo de material) _____
- () Sustancias tóxicas, peligrosas o explosivas: (tipo de material)
- () Material que puede poner en riesgo la salud o la integridad física del personal de salud o los derechohabientes del IMSS o afectar al medio ambiente: ____(tipo de material)_____
- () Animales (de laboratorio, granja o vida silvestre): _____
- () Trasplante de células, tejidos u órganos _____
- () Terapia celular _____

Asimismo, declara que conoce, ha leído y cumplirá las normas, reglamentos y manuales de bioseguridad que apliquen al proyecto (consultar: “Bioseguridad en la Investigación en Salud” de la página web de la Coordinación de Investigación en Salud del I.M.S.S.)

(Enlistar los documentos que apliquen):

- a) NOM-087-ECOL-SSA1-2002, aplicando todas las especificaciones descritas para la protección de los binomios ambiental-salud, ambiental-residuos peligrosos, así como el manejo y clasificación de Residuos Peligrosos Biológico-Infecciosos (RPBI) de manera adecuada, por lo cual esta normatividad será respetada en su totalidad en la presente propuesta de investigación.
- b) _____

(Estos documentos, además, deben mencionarse en el apartado: “Aspectos de Bioseguridad” del protocolo de investigación)

También manifiesta que existe evidencia documental **auditable** de que:

- a) Se cuenta con los permisos y/o licencias oficiales que se requieran para llevar a cabo el trabajo propuesto.

- b) Las instalaciones de los laboratorios involucrados se encuentran en estado satisfactorio de operación y son adecuadas para llevar a cabo el trabajo propuesto.
- c) El equipo a utilizar se encuentra en estado satisfactorio de operación.
- d) Existen dispositivos personales de protección que se encuentran en estado satisfactorio de operación.
- e) Los involucrados en el proyecto, incluyendo a los estudiantes que participen en el mismo, han recibido la capacitación necesaria para trabajar con el material señalado anteriormente.
- f) Se mantendrán las condiciones adecuadas de instalaciones, equipo y personal durante el desarrollo del proyecto y que el protocolo se suspenderá en caso de haber alguna irregularidad.

(Lo anterior también debe mencionarse en el apartado: “Aspectos de Bioseguridad” del protocolo de investigación).



Dra. Lourdes Andrea Arriaga Pizano
Matricula: 99092680
Unidad de Investigación Médica en Inmunoquímica
Hospital de Especialidades “Dr. Bernardo Sepúlveda Gutiérrez”
Centro Médico Nacional “SXXI”
Instituto Mexicano del Seguro Social
Tel: 56276900 (ext:21476)
E mail: landapi@hotmail.com

