



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**

**EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE CCR5 EN LINFOCITOS T DE PACIENTES
CON COVID19 Y SU ASOCIACIÓN CON MARCADORES DE INFLAMACIÓN
SISTÉMICA.**

**TESIS QUE PRESENTA:
THALIA ESMERALDA MORFIN MORALES**

**PARA OBTENER EL GRADO DE ESPECIALISTA EN:
MEDICINA INTERNA**

**TUTOR DE TESIS
DRA. en C. LOURDES ANDREA ARRIAGA PIZANO**



CIUDAD DE MEXICO

Agosto 2021



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

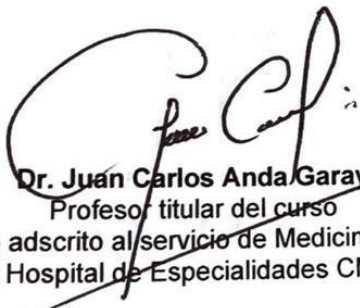
Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).


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

EVALUACION DE LA EXPRESIÓN DE CCR5 EN LINFOCITOS T DE PACIENTES CON COVID 19 Y SU ASOCIACION CON MARCADORES DE INFLAMACION 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 Inmunología
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 **Evaluación de la expresión de CCR5 en linfocitos T de pacientes con COVID19 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-2021-3601-143

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:

A mi familia por acompañarme y apoyarme siempre a lo largo de mi carrera, por ser siempre un ejemplo a quienes seguir y a quienes admirar.

A Cristian, por estar siempre a mi lado en estos años, por animarme en los momentos difíciles, por estar en las buenas, en las malas, en las mejores y en las peores.

A mi tutora y profesores por su apoyo a lo largo de este proyecto, por permitirme formar parte de este equipo y poder contribuir al conocimiento de esta enfermedad.

A mi universidad, por guiarme durante la carrera de Medicina y ahora en la especialidad, porque es un orgullo representar a la máxima casa de estudios.

Índice

Resumen	6
Abreviaturas.....	8
Antecedentes.....	9
Planteamiento del problema	14
Pregunta de Investigación	14
Hipótesis	15
Objetivos.....	15
Metodología.....	16
Diseño del Estudio.....	16
Universo de trabajo	16
Criterios de inclusión.....	16
Criterios de no inclusión.....	16
Criterios de Exclusión.....	17
Tamaño de muestra	17
Variables	17
Variables dependientes.....	17
Variables Independientes	17
Definición operacional de las variables.....	18
Procedimiento General.....	22
Resultados.....	29
Discusión.....	36
Conclusión	38
Referencias	39
Anexo	41

Resumen

Introducción: En la infección por SARS-CoV se ha observado una asociación de la gravedad de la enfermedad con el incremento en la respuesta inflamatoria, sin encontrar un patrón definido en la liberación de citocinas. En el caso de COVID19, una de las quimiocinas que ha atraído el interés es la citocina CCL-5, también conocida como RANTES, ya que en modelos in vitro se ha observado que la infección con SARS CoV2 induce la secreción de CCL-5. Sin embargo, hasta el momento los resultados sobre CCL-5 y CCR5, su receptor, en relación con el desenlace de los pacientes con COVID 19 han sido contradictorios.

Objetivo: En este trabajo se propuso evaluar la relación de la expresión de CCR5 en linfocitos T con los marcadores de inflamación sistémica y desenlace de los pacientes con COVID19. **Pacientes y métodos:** Se utilizaron leucocitos criopreservados de pacientes mayores de 18 años ingresados en la UMAE Hospital de Especialidades del CMN SXXI entre febrero y mayo de 2021 con diagnóstico de COVID-19 corroborado mediante RT-PCR. Como objetivos secundarios se determinaron los niveles de linfocitos T (CD3+) que expresan CCR5, se cuantificó CCL-5 en suero y se determinó si existe relación entre los niveles séricos de CCL-5, la expresión de CCR5 en linfocitos y los diferentes marcadores de inflamación en el suero (dímero D, ferritina, proteína C reactiva e IL-6 y el índice NLR). **Análisis estadístico:** Se utilizó estadística descriptiva con base a las variables de interés. Para el análisis comparativo se realizaron pruebas de hipótesis mediante t de Student ó U-Mann Whitney o ANOVA de 2 vías y post-prueba Bonferroni o Dunn. **Resultados:** Se realizó el análisis en muestras sanguíneas de 18 pacientes (13 egresados por mejoría y 5 por defunción). No se obtuvieron diferencias significativas de la concentración sérica de la quimiocina CCL5 (Rantes) entre los pacientes que mejoraron o fallecieron tras haber sido pacientes graves de COVID-19. Sin embargo, la expresión del receptor CCR5 en los linfocitos T se encontró incrementada en el grupo correspondiente a la sobrevida. Se planteó buscar una correlación entre los porcentajes de poblaciones de linfocitos T que expresaban CCR5 con los marcadores inflamatorios dímero D, CPR, IL6 y NLR, encontrando una relación inversamente proporcional con estos marcadores, a diferencia de la ferritina con la cual se encontró una relación directamente proporcional. **Conclusiones:** En este trabajo no se demostró una diferencia entre la concentración de la quimiocina CCR5 entre los pacientes con infección grave por COVID 19 que egresaron por mejoría o por defunción. Sin embargo, hay evidencia de que el receptor CCR5 puede ser útil como biomarcador pronóstico para los pacientes con infección por SARS COV2, por lo que consideramos importante seguir evaluando este eje.

Datos de Alumno:	
Apellido paterno:	Morfin
Apellido Materno:	Morales
Nombre:	Thalia Esmeralda
Teléfono:	55 40697829
Universidad:	Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad:	Facultad de Medicina
Carrera:	Médico Cirujano
Número de cuenta:	307209526
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:	Evaluación de la expresión de CCR5 en linfocitos T de pacientes con COVID19 y su asociación con marcadores de inflamación sistémica.
Número de páginas:	47
Año:	2021

Abreviaturas

APB	Periferal blood Adult (Sangre Periférica de Adulto)
CCL	Chemokine (C-C motif) (Quimiocina con dos residuos de cisteína adyacentes)
CCR5	Chemokine (C-C motif) receptor (Receptor de la quimiocina RANTES)
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-strands RNA, RNA de doble cadena)
DNA	Deoxyribonucleic acid (Ácido desoxirribonucleico)
DHL	Deshidrogenasa láctica
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
MCP-1	Monocyte chemoattractant protein-1 (Proteína quimioatrayente de monocitos-1)
MDA5	Melanoma differentiation antigen 5
MIP1α	Macrophage inflammatory protein-1 alpha
MIP1β	Macrophage inflammatory protein-1 beta
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 Peridininina)
RANTES	Regulated on activation, normal T cell expressed and secreted (Regulado en la activación, células T normales expresadas y secretadas)
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)

EVALUACION DE LA EXPRESIÓN DE CCR5 EN LINFOCITOS T DE PACIENTES CON COVID 19 Y SU ASOCIACION CON MARCADORES DE INFLAMACION SISTÉMICA.

Antecedentes

Los Coronavirus (CoVs) se conocen como agentes patógenos responsables del resfriado común¹ y se subdividen a en alfa, beta, gamma y delta. Los beta-CoVs están los HCoV-OC43, HCoV-HKU, SARS-CoV y MERS-CoV². Estos últimos bajas dieron lugar al SARS-CoV (*Severe Acute Respiratory Syndrome*), que en 2002, 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 graves 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 *in vivo*. 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 qué 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 un incremento en el reclutamiento de células de la respuesta inmune, neutrófilos y macrófagos en el intersticio pulmonar y alvéolos, 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 hospedero 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-CoV-2. 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-CoV-2 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-CoV-2. Estos receptores detectan RNA viral y activan vías de señalización antivirales que finalmente producen IFN de tipo I y citocinas pro-inflamatorias^{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- κ B, 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 (INFR), 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. En la infección por el SARS-Co-V 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 los mediadores inflamatorios, como las citocinas y las quimiocinas se incrementan en suero no se reconoce un patrón específico.

Una de las quimiocinas que ha atraído el interés en el caso de COVID19 es la citocina CCL-5, también

conocida como RANTES (*regulated on activation, normal T cell expressed and secreted*), ya que en modelos in vitro, utilizando células humanas provenientes de vías aéreas, se ha observado que la infección con SARS-CoV-2 induce la secreción de CCL-5²⁹.

Esta citocina ejerce sus funciones vía su receptor, C-C Chemokine Receptor 5 (CCR5). CCR5 pertenece a una familia de receptores acoplados a proteína G que se expresa en la superficie de monocitos, linfocitos T y macrófagos^{29, 30}. Este CCR5 puede reconocer, además de CCL5 a las quimiocinas MIP1- α y MIP1- β (*Macrophage inflammatory protein-1 alpha*), también conocidas como CCL3 y CCL4, respectivamente. Esta MIP1 α , β está involucrada en las respuestas inflamatorias en respuesta a los virus de influenza y coxsackie; esta quimiocina así como MIP1- β , están involucradas en la respuesta frente a HIV. La producción de la quimiocina CCL-5 puede atraer a células T, macrófagos y eosinófilos hacia sitios de inflamación, lo que favorece la secreción de citocinas inflamatorias y a su vez la amplificación de la respuesta inmune, siendo identificado su papel en otras infecciones virales^{28, 30, 31}. Citocinas proinflamatorias como Il-12 pueden inducir la expresión de CCR5 en linfocitos²⁹. En el caso de infección por SARS-CoV-2, la respuesta inflamatoria secundaria a la liberación de citocinas como CCL5, IL-6 y TNF- α generarían una cascada inflamatoria que conduce al Síndrome de Insuficiencia respiratoria aguda y falla orgánica multisistémica³⁷.

Particularmente en COVID19, los resultados sobre CCL-5 y CCR5 son contradictorios. Se ha reportado que cuando existen variantes genéticas, específicamente la presencia del alelo CCR5D32, que produce un CCR5 truncado con menor capacidad de señalización, los pacientes con COVID19 son más susceptibles a desarrollar infecciones graves y fallecer ³⁰.

Por otro lado, la presencia de la misma variante genética se ha reportado como factor protector para la infección por SARS-CoV-2³², mientras que otros autores han concluido que la presencia de dicho alelo en la población europea no se ha correlacionado con la gravedad de infección ni con la mortalidad por COVID19 ^{33,34}.

Así mismo, se han utilizado tratamiento con anticuerpos monoclonales que bloquean al circuito de CCL5-CCR5, disminuyendo la cantidad de citocinas proinflamatorias en suero, restaurando la cantidad de linfocitos T CD8+ en circulación y disminuyendo la viremia, clínicamente traducido en disminución del requerimiento de vasopresores, interrupción del tratamiento sustitutivo de la función renal, retiro de la ventilación mecánica y por tanto mayor sobrevida ^{35,36, 37}.

Planteamiento del problema

La quimiocina CCL-5 y su receptor CXCR5 podrían estar involucrados en la fisiopatología de COVID19 por la posibilidad que tiene de inducir la redistribución de células hacia compartimentos como el pulmón. Sin embargo, todavía no está claro si en pacientes que ya están hospitalizados por COVID19 y con mediadores inflamatorios elevados, la expresión de este receptor, CCR5 en linfocitos, tendrá impacto en índices como el NLR, o el desenlace de la enfermedad.

Pregunta de Investigación

En pacientes hospitalizados por infección por COVID 19 del Hospital de Especialidades Centro Médico Nacional Siglo XXI ¿Cuál es la relación entre la cantidad de linfocitos T que expresan al receptor de las quimiocinas CCL5 (CXCR5), la respuesta inflamatoria sistémica y desenlace de la enfermedad?

Hipótesis

Ho: La expresión de CCR5 en linfocitos tendrá una relación directa con los marcadores de inflamación sistémica.

Hi: La expresión de CCR5 en linfocitos no tendrá relación con los marcadores de inflamación sistémica.

Objetivos

Objetivo General

Evaluar la relación de la expresión de CCR5 en linfocitos T con los marcadores de inflamación sistémica y desenlace de los pacientes

Objetivos particulares

1. Cuantificar los niveles de linfocitos T (CD3+) que expresan CCR5 en pacientes con COVID19
2. Cuantificar los ligandos de CCR5, CCL-5, MIP-1 α y MIP-1 β en suero de pacientes con COVID19.
3. Establecer si existe asociación entre los niveles séricos de CCL-5 y la expresión de CCR5 en linfocitos y
4. Establecer si existe asociación CCR5 en linfocitos y los marcadores de inflamación en el suero: dímero D, ferritina, proteína C reactiva e IL-6 y el índice NLR.
5. Establecer si existe asociación CCR5 en linfocitos y el desenlace de pacientes hospitalizados por COVID19.

Metodología

Diseño del Estudio

Descriptivo: ya que se limitó a establecer cuál es el nivel de expresión de CXCR5, de su ligando en suero y el número de linfocitos en circulación.

Observacional: ya que se evaluó la expresión de CCR5 en linfocitos sin mediar manipulación de por medio.

Transversal: ya que solo se tomó la muestra al ingreso de los pacientes al protocolo.

Retrospectivo: Ya que se utilizarán muestras de células criopreservadas de pacientes que fueron reclutados para su inclusión en el protocolo y hasta concluir el término establecido para el protocolo R-2020-3601-043, que fue aprobado por este CLIES.

Universo de trabajo

Pacientes adultos que ingresen 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.

Criterios de inclusión

1. Pacientes adultos de ambos sexos, mayores de 18 años que ingresen a la UMAE Hospital de especialidades del CMN SXXI con diagnóstico de COVID-19 y que se corrobore 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 rechacen 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 considerará una muestra por conveniencia y se incluirán a todos los pacientes que cumplan los criterios de inclusión de marzo a septiembre de 2020

Variables

Variables dependientes

1. Cantidad de células T CCR5+
2. Valores de IgG anti SARS CoV2 en suero
3. Alta médica por mejoría o desenlace fatal
4. Valor de NLR

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, $\times 10^3 /\mu\text{L}$, BilirubinA, 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)	Cuantitativa discreta	Indicador que marca la relación entre el peso y la talla de un individuo utilizado en la detección del	Se calcula utilizando el peso en kilogramos dividido por	IMC normal es de 18.5 a 24.9 sobrepeso como un IMC igual o superior a 25 y	Expediente clínico

		sobrepeso y obesidad en adultos.	el cuadrado de la talla en metros (kg/m ²)	la obesidad como un IMC igual o superior a 30	
CCL5	Cuantitativa continua	Quimiocina también conocida como RANTES que es liberada por células epiteliales en sitios de inflamación	Cuantificación en suero mediante inmunoensayo	pg/mL	Inmunoensayo múltiple en perlas
MIP-1 α	Cuantitativa continua	Quimiocina también conocida CCL3 que es liberada por macrófagos en condiciones inflamación y es ligando de CCR5	Cuantificación en suero mediante inmunoensayo	pg/mL	Inmunoensayo múltiple en perlas
MIP-1 β y	Cuantitativa continua	Quimiocina también conocida como CCL4 que es liberada en condiciones de inflamación en respuesta a virus. Es ligando de CCR5	Cuantificación en suero mediante inmunoensayo	pg/mL	Inmunoensayo múltiple en perlas
Linfocitos T CCR5+	Cuantitativa continua	Cantidad de células T (CD3+) en sangre periférica que expresan CCR5	Se calcula el número absoluto a partir de la frecuencia de células CD3+CCR5+ en sangre periférica	Cel/mL	Inmunofenotipificación por citometría de flujo
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

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, conjuntivis, dolor torácico.

Caso confirmado: Paciente que cumpla 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 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, $1 \times 10^3 / \mu\text{L}$. Bilirubina, 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 anormalidad por sistema de órganos y explica las intervenciones clínicas²⁴.

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 orgánica²⁵.

SIRA (Síndrome de Insuficiencia Respiratoria del Adulto): Síndrome agudo caracterizado por falla respiratoria de origen no cardiogénico que conlleva a disfunción en la oxigenación²⁶.

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 cardíaca, 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.

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) del protocolo R-2020-3601-043; que en su carta de consentimiento informado contiene la leyenda: “También queremos solicitar a través de este documento de autorización, que nos autorice a guardar las muestras que obtenemos al momento de tomar su sangre para poder realizar en un futuro análisis complementarios a los que hoy estamos proponiendo”, mediante consentimiento informado (con firma en la carta de consentimiento informado, ver Anexos), se realizó el siguiente proyecto utilizando leucocitos aislados de sangre periférica y criopreservados. 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 pacientes²⁷.

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 fueron 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 se 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 llevaba 48 horas. Por lo que existió la posibilidad de tomar muestras en pacientes con resultados negativos (Ver Anexo de Flujoograma 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 plasma, siguiendo los protocolos de protección para el paciente y para el personal médico (Anexo). La toma de muestra se realizó al ingreso. De allí se procedió a aislar los leucocitos por eliminación de hematíes por choque osmótico y se colocaron en medio de criopreservación con medio RPMI/SFB30%/DMSO10%.

Identificación y caracterización de linfocitos T por inmunofenotipo

A partir de leucocitos previamente criopreservados, que se recuperaron con condiciones de incremento paulatino de temperatura, se “lavaron” para retirar el exceso de DMSO y se verificó la viabilidad (que debe ser de al menos el 80%). Se colocaron 5×10^5 células y se adicionaron 1000 μL de solución de lisis de eritrocitos (cloruro de amonio al 0.15M,) y se incubó 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente se adicionó 1 mL de solución amortiguadora a base de fosfatos (PBS 1x) y se centrifugó durante 5 min a 1500 rpm. El botón celular obtenido se resuspendió en 150 μL de PBS 1x. Se agregaron 50 μL de ésta última suspensión celular a un tubo de auto-fluorescencia (sin anticuerpos, AF) y a un tubo de tinción en donde se realizó el marcaje con los siguientes anticuerpos: CD45 Pacific Blue (Biolegend, clona J.33), CD3 FITC (Biolegend, clona LSE2), CCR5 APC-Cy7 (Biolegend, clona 8G7).

Pasados 15 min de incubación a temperatura ambiente y en oscuridad, se agregaron 250 μL de una dilución 1:10 de solución de lisis y fijado (BD FACSTM Lysing Solution Cat. 349202) y se incubaron por 10 min a temperatura ambiente en oscuridad. Finalmente, las células se lavaron por centrifugación agregando 1 ml de PBS y posteriormente se resuspendieron en 50 μL de solución isotónica. Se

adquirieron al menos diez mil eventos correspondientes a la población de linfocitos T (FSCmed, SSCmed, CD45high, CD3+) utilizando un citómetro FACS ARIA (BD™ Biosciences, San José, CA, USA) equipado con tres láser y el juego de filtros adecuados para la detección de los fluorocromos conjugados a los anticuerpos utilizados. Los inmunofenotipos se analizaron utilizando el programa de análisis citométrico Infinicyt (Cytognos y EuroFlow™, Salamanca, España).

En el algoritmo para la identificación de leucocitos totales, se utilizaron tres gráficas de puntos: tamaño-área (FSC-A) vs tamaño-altura (FSC-H), que permite distinguir los eventos que fueron adquiridos de forma individual por el citómetro (singuletes); tamaño (FSC-A) vs complejidad (SSC-A), en la cual podemos seleccionar a los eventos que presenten el tamaño y complejidad clásicos de leucocitos de sangre periférica humana viables; y complejidad (SSC-A) vs expresión de CD45, con la que podemos discriminar a los leucocitos (CD45+, en diferentes grados) de los eritrocitos remanentes (CD45-). Una vez seleccionados los leucocitos totales, se procedió a la identificación de los linfocitos (FSClow, SSClow, CD45hi) y su caracterización como T (CD3+) que expresan o no CCR5.

Cuantificación de quimiocinas séricas

Mediante inmunoensayos múltiples basados en perlas se cuantificaron citocinas en suero humano por citometría de flujo. El kit para esta cuantificación incluye a las quimiocinas: CXCL8, CCL2, CCL3, CXCL10, CCL5, CXCL5 y CCL17. Para los objetivos de este estudio nos enfocaremos en los niveles de RANTES, MIP1a y MIP1 b; como ligandos de CXCR5.

Preparación de la mezcla de perlas: Se agitó cada suspensión de perlas antes de tomar las alícuotas durante 30 segundos en vórtex. Posteriormente, se tomaron 10µL de cada suspensión de perlas del kit (Tabla 1) por cada muestra para analizar. Se preparó la mezcla suficiente para los tubos a analizar contando la curva estándar por duplicado.

Preparación de las muestras: Alícuotas de suero de pacientes conservadas a -70° C de ~200µL. Fueron transferidas a refrigerador REVCO a -20° C una noche antes de la fecha de análisis. Posteriormente fueron transferidas a refrigerador a 4°C el día del análisis. La alícuota se diluyó 1:4 con la solución específica para tal fin siguiendo las especificaciones del fabricante. Se colocó en el tubo correspondiente

y se agitó con el vórtex y agregando 50µL de cada mezcla de perlas a su correspondiente tubo marcado. Se transfirieron 50µL de las muestras diluidas, del estándar, y de las correspondientes diluciones a los tubos rotulados. Se agregaron 50µL de reactivo de detección (proporcionado por el kit) a los correspondientes tubos. Los tubos se incubaron por 3 horas protegidos de la luz a temperatura ambiente. Se agregó 1mL de solución amortiguadora de lavado (proporcionada por el kit) a todos los tubos. Se centrifugó a 200 g por 5 minutos. Se descartó el sobrenadante cuidadosamente y se añadieron 300µL de solución amortiguadora de lavado. Re-suspender el botón. Las muestras se analizaron con un citómetro de flujo FACS Aria Ilu (BD™ Biosciences, San José, CA, USA), que se encuentra en el Laboratorio Centro de Instrumentos/Citometría de Flujo de la Coordinación de Investigación en Salud, ubicado en la planta baja del Hospital de Especialidades CMN “Siglo XXI”, del IMSS.

Análisis estadístico

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 a 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 biomarcadores inflamatorios, 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 correspondía. 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. 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 tuvieron un riesgo mínimo, al momento de tomar la muestra y que para este protocolo ya no tiene riesgo alguno.

El mencionado protocolo R-2020-3601-043; que en su carta de consentimiento informado contiene la leyenda: “También queremos solicitar a través de este documento de autorización, que nos autorice a guardar las muestras que obtenemos al momento de tomar su sangre para poder realizar en un futuro análisis complementarios a los que hoy estamos proponiendo”, fue previamente autorizado por este CLIES.

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 respetarán 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 utiliza 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 solicitará la firma de una carta de consentimiento informado antes de iniciar el mismo (Anexo Carta de consentimiento). La persona que solicitará dicho consentimiento será el investigador principal y/o alguno de los colaboradores que serán considerados como sub-investigadores.

Riesgo de la Investigación: Dado que este protocolo incluye células que se derivaron de la toma de muestras sanguíneas, esta se clasificó con un riesgo tipo I, mínimo, pero en esta ocasión no se tomó sangre periférica, sino solo se recuperó las células criopreservadas previamente.

Balance Riesgo/Beneficio: Dado que las determinaciones biológicas se harán 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 es el relacionado con la toma de sangre, la cual se realizará 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 ingresen 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) serán mantenidas en resguardo en la UIMIQ de la UMAE Hospital de Especialidades del CMN SXXI y únicamente serán utilizadas 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 llevarán ningún dato personal de los participantes.

Selección de Participantes: Antes de invitar a cada paciente a participar en el proyecto, se le explicó 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 derivar de ello. Si el paciente decidía no ser seleccionado para el protocolo se continuó 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 invitó 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 considera 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 anexa la carta de bioseguridad que informa acerca del manejo de muestras de sangre. Los RPBI generados durante el estudio serán 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 fueron colocadas 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 fueron obtenidas de pacientes que cumplan los criterios de selección. Todo el material punzocortante que haya sido 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 explicó con detenimiento en la carta de consentimiento y asentimiento.

Resultados

En el presente trabajo se realizó el análisis en muestras de 18 pacientes que fueron ingresados al Hospital de Especialidades de Centro Médico Nacional Siglo XXI y contaron con prueba positiva para SARS-CoV-2, de ellos 13 fueron pacientes que fueron egresados por mejoría y 5 por defunción, de cada paciente se consiguió el consentimiento informado para participar en el estudio y se obtuvo una muestra sanguínea para la determinación de cada una de las variables a analizar.

En la tabla 1 se presentan los datos demográficos y de laboratorio de los pacientes incluidos en el proyecto y como podemos observar no hay diferencia estadísticamente significativa en cuanto a la edad, peso, talla e IMC de los pacientes, con respecto al género si se obtuvo significancia ya que en la corte de pacientes de este estudio un mayor porcentaje de mujeres fallece en comparación con los hombres. De acuerdo a los datos de la biometría hemática, química sanguínea de tres elementos (glucosa, urea, creatinina) e indicadores inflamatorios, únicamente se encontraron diferencias significativas en urea, siendo esta más elevada en los pacientes que fallecieron ($p=0.0483$), CRP y fibrinógeno también presentaron significancia en el grupo correspondiente a defunción, con respecto a los sobrevivientes, con valores de $p=0.0295$ y $p=0.0350$ respectivamente, en cuanto a las demás variables evaluadas en la tabla 1 no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre los pacientes que mejoraron y los que fallecieron; con respecto a las comorbilidades, obtuvimos diferencia significativa en los pacientes que presentan hipertensión y obesidad con respecto a la sobrevida ($p = 0.0145$ y $p < 0.0001$ respectivamente, en la corte analizada observamos que la presencia de DM2 no está relacionada con el desenlace de los pacientes, estos datos contrastaron con la prevalencia de obesidad, ya que se identificó un mayor porcentaje de pacientes obesos en el grupo de sobrevida respecto a defunción ($p < 0.0001$).

En cuanto a la concentración sérica de la quimiocina CCL5 (Rantes) en este estudio no obtuvimos diferencias significativas entre los pacientes que mejoraron o fallecieron tras haber sido pacientes graves de COVID-19; con el propósito de evaluar los niveles de CCR5 en linfocitos T y su correlación con marcadores de inflamación en pacientes con COVID-19 grave, se analizó la expresión de este receptor

mediante citometría de flujo en poblaciones de linfocitos, así mismo se evaluó la media de la intensidad de fluorescencia (MIF) para CCR5 en los linfocitos T y como podemos observar, al evaluar estadísticamente los porcentajes y la MIF hubo una diferencia significativa ($p=0.0140$) en la MIF de CCR5 encontrando una expresión incrementada del receptor en el grupo correspondiente a sobrevivida.

Los análisis estadísticos realizados para estos parámetros contemplaron un análisis mediante chi cuadrada para los datos de las variables ordinales (Sexo, DM2, HAS y Obesidad), y un análisis no paramétrico con U de Mann Whitney para datos de variables cuantitativas (Edad, Talla, IMC, Biometría hemática, Química sanguínea, marcadores inflamatorios y expresión de CCR5 y CCL5). Se considero un valor de $p<0.05$ como estadísticamente significativo.

En la figura 1 se muestra la asociación entre la concentración sérica de CCL5 y el porcentaje de linfocitos que expresan CCR5 así como la MIF para este receptor, para ello se realizó un análisis de correlación de Spearman; entre las concentraciones de CCL5 sérico y la cantidad de linfocitos T que expresan CCR5 (Fig. 1 a) en la que se obtuvo un valor de $r=-0.1001$, sugiriendo una tendencia negativa en la relación de estos parámetros, de igual modo se realizó otra correlación de Spearman para identificar la relación entre las concentraciones de CCL5 sérica y la expresión de CCR5 en linfocitos T (Fig 1 b) en donde se encontró una $r= -0.2673$, que también sugiere una tendencia negativa congruente con la cantidad de linfocitos que expresaban este receptor.

Tabla 1. Datos sociodemográficos de la población de estudio

VARIABLE	Total (n=18)	Mejoría (n=13)	Defunciones (n=5)	p
EDAD (Años)	51.44±12.98	46.53±10.85	64.20±9.03	0.0152
SEXO (%)	MASC: 61.1 FEM: 38.9	MASC: 69.2 FEM: 30.8	MASC: 40 FEM: 60	<0.0001
PESO (%)	87.07±17.32	89.25±17.35	81.40±17.79	0.5673
TALLA (%)	1.67±0.08	1.68±0.07	1.62±0.11	0.3003
IMC (kg/m ²)	31.39±6.67	31.32±4.54	31.56±11.29	0.2773
ESTANCIA (Días)	9.11±4.14	8.92±2.95	9.60±6.80	0.6827
DM2 %	11.1	7.7	20	0.0145
HAS %	22.2	15.4	40	<0.0001
OBESIDAD %	55.6	69.2	20	<0.0001
LEU (10 ⁹ /L)	6.69-10.64	6.63-10.28	7.27-13.17	0.2460
HB (mg/dl)	14.25-16.92	14.35-16.70	13.30-18.10	0.3987
HTO (%)	42.42-49.92	46.10-48.70	39.55-57.70	0.6869
PLAQ (U)	211.50-359.50	209.00-294.00	193.50-625.50	0.5663
NEU (%)	75.32-88.00	67.60-85.20	80.80-90.50	0.1172
LINF (%)	5.80-13.65	5.30-10.60	5.90-11.35	0.6869
MONO (%)	3.40-5.57	3.55-5.65	2.75-5.75	0.6497
EO (%)	0-0	0.00-0.05	0-0	0.5221
BAS (%)	0.19-0.37	0.10-0.30	0.15-0.65	0.1838
NEU (10 ⁹ /L)	5.23-9.59	5.20-8.82	6.08-11.15	0.2004
LINF (10 ⁹ /L)	0.60-1.37	0.70-1.39	0.55-1.16	0.1734
MONO 10 ⁹ /L)	0.27-0.55	0-27-0.52	0.21-0.70	0.8704
EOS (10 ⁹ /L)	0-0	0-0	0-0	0.5221
BAS (10 ⁹ /L)	0.01-0.04	0.01-0.02	0.00-0.06	0.4266
GLU (mg/dl)	89.25-124.00	92.50-125.00	78.50-143.00	0.1646
CRE (mg/dl)	0.69-0.93	0.67-0.90	0.69-0.99	0.6158
UREA (mg/dl)	27.80-51.92	27.80-49.20	44.95-79.15	0.0483
FERRITINA (ng/ml)	230.92-1647.50	197.00-1918.00	420.20-1335.00	0.9130
CRP (mg/dl)	0.97-21.05	0.84-10.62	11.08-29.59	0.0295
PCT (ng/ml)	0.10-0.23	0.07-0.20	0.14-0.51	0.1028
DIMERO D (µg/ml)	0.58-2.05	0.45-64.57	0.79-1.36	0.8490
FIBRINOGENO (mg/dl)	103.75-788.75	43.42-752.50	628.00-936.50	0.0350
CCR5 %	9.53-22.18	9.61-22.50	9.11-22.54	0.7750
MIF CCR5	1650.50-2124.50	1769.50-2246.00	1332.50-1792.00	0.0140
CCL5 (pg/ml)	1264.75-2673.25	1254.50-2303.00	1366.21-3310.50	0.3359
IL6 (pg/ml)	2.08-115.47	1.20-85.57	51.56-170.55	0.1118
NRL	4.85-14.17	4.06-12.59	7.22-15.32	0.0754

Variables ordinales: Chi cuadrada

Variables cuantitativas: U de Mann Whitney

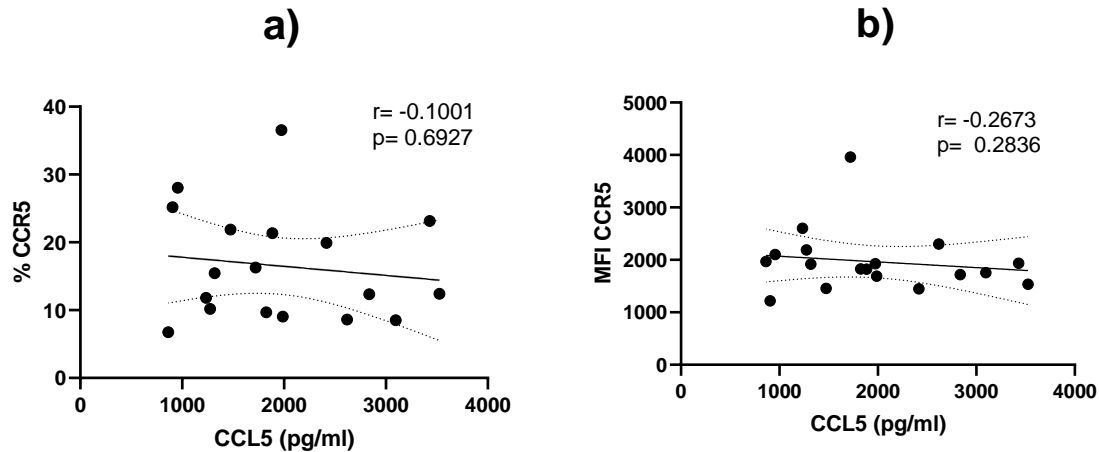
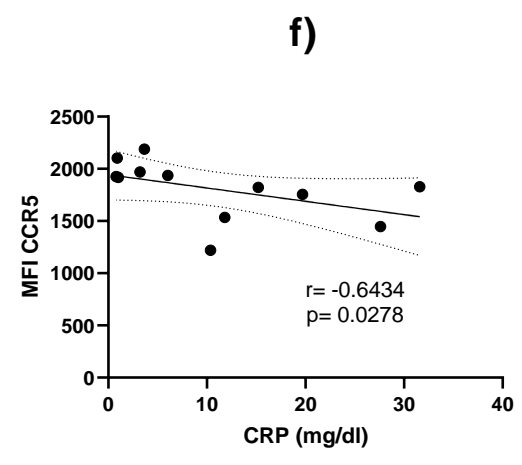
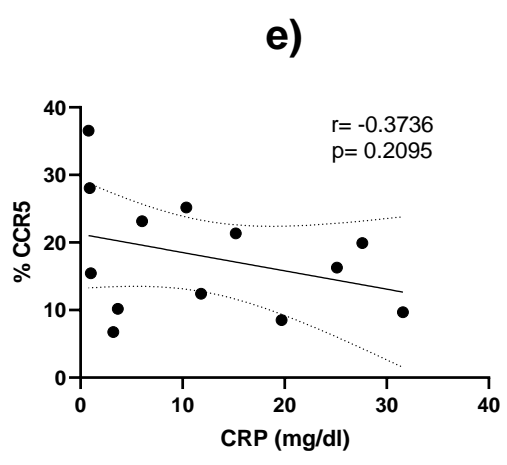
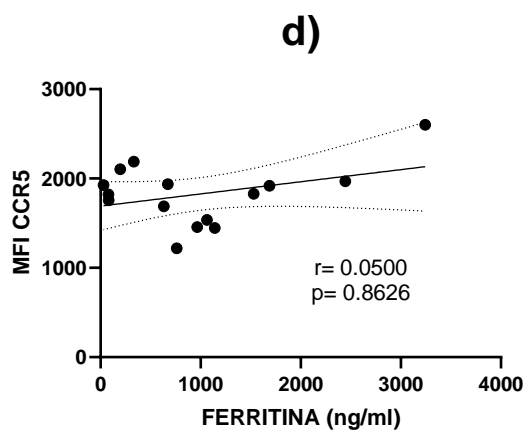
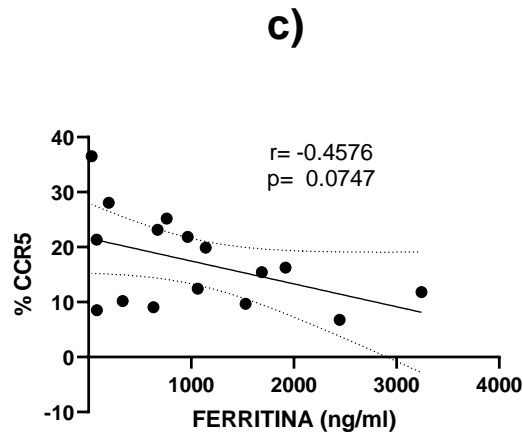
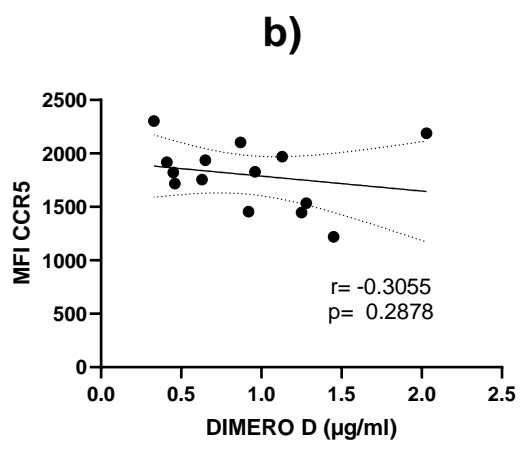
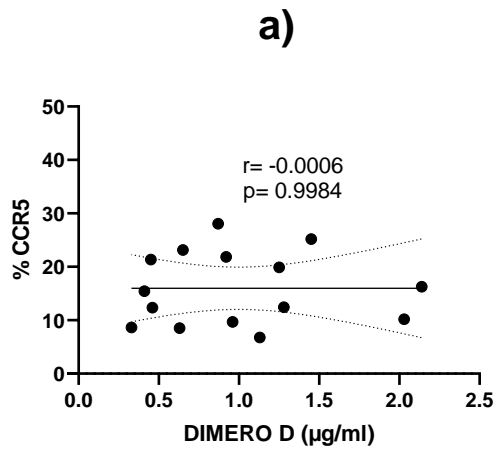


Figura 1. Correlación entre la expresión de CCL5 con su receptor en linfocitos. Correlación de Spearman entre el porcentaje (a) y la expresión representada como intensidad media de fluorescencia (b) de CCL5 sérico con respecto a CCR5. Se consideró la significancia estadística en $p < 0.05$.

Como siguiente objetivo se planteó buscar una correlación entre los porcentajes de poblaciones de linfocitos T que expresaban CCR5 con los marcadores inflamatorios (Dímero D, Ferritina, CRP, IL-6 y NLR) en donde se observó una $r = -0.0006$ para Dímero D; $r = -0.4576$ para Ferritina; $r = -0.3736$ para CRP; $r = -0.4430$ para IL-6 y una $r = -0.1703$ para NLR; todas sugiriendo una tendencia negativa. (Fig. 2 a,c,e,g,i). Así mismo se buscó una relación entre la expresión de CCR5 en linfocitos T y los marcadores inflamatorios antes mencionados; obteniéndose una $r = -0.3055$ para Dímero D; $r = -0.4576$; $r = -0.6434$ para CRP; $r = -0.2267$ para IL 6 y una $r = -0.1961$ para NLR mostrando una tendencia negativa (Fig 2 b,f,h,j); mientras que la relación con Ferritina obtuvo un valor de $r = 0.0500$ (Fig. 2 d), sugiriendo una tendencia positiva de correlación; de las asociaciones realizadas obtuvimos diferencias estadísticamente significativas para CRP vs MIF de CCR5 en linfocitos, con una $p = 0.0278$.



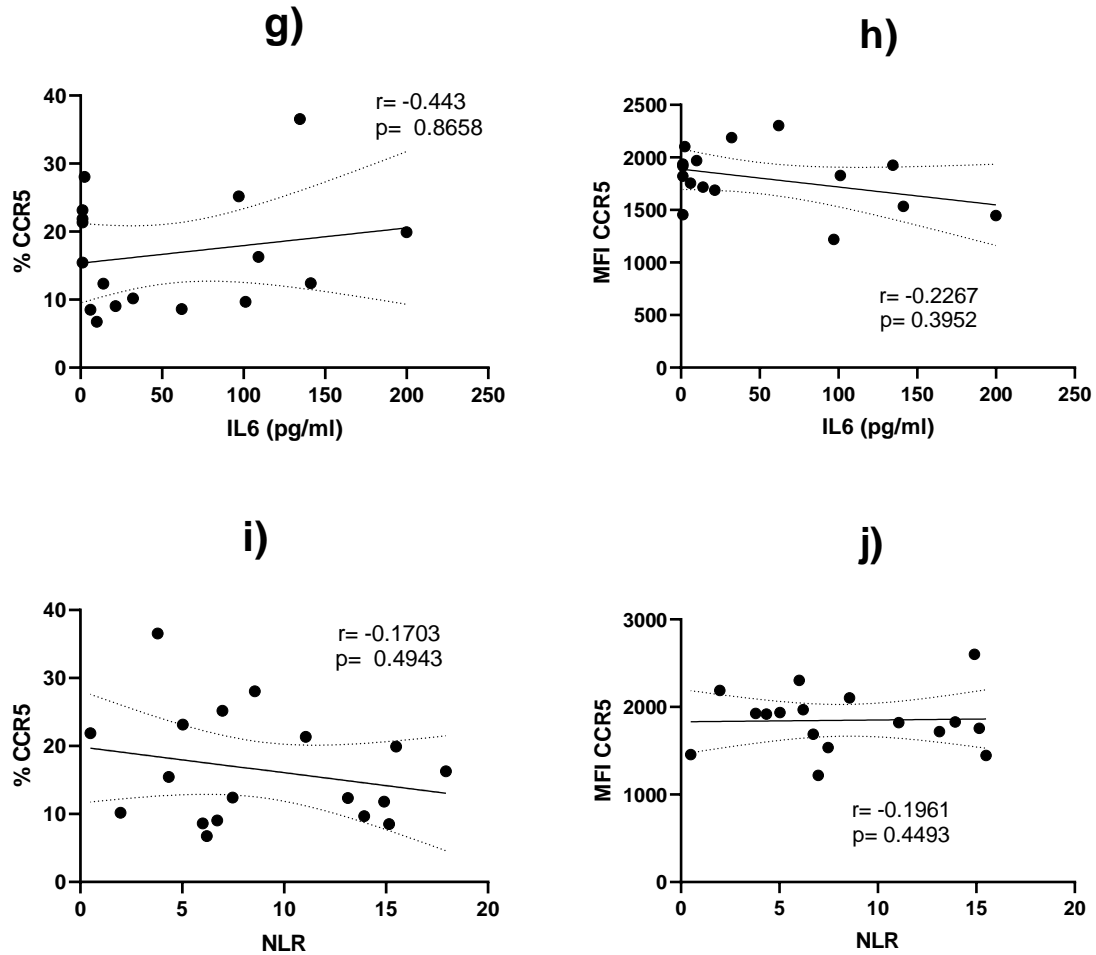
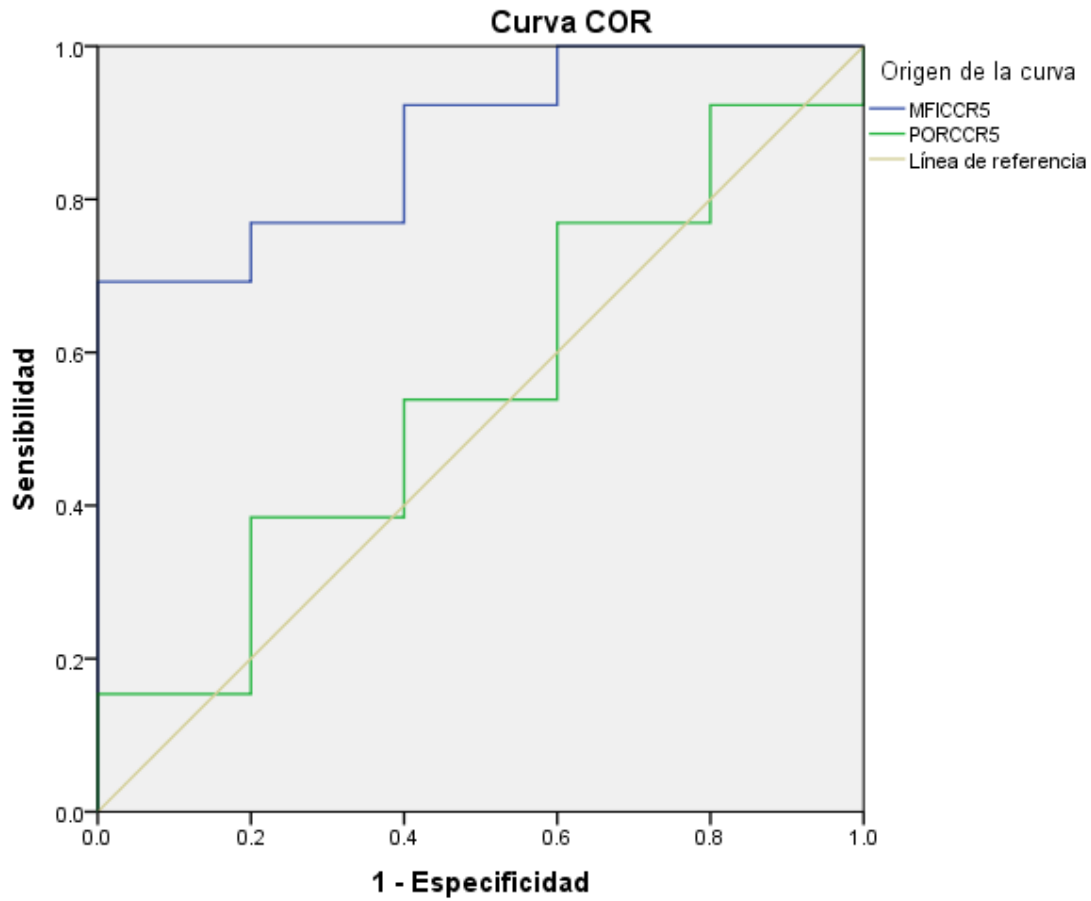


Figura 2. Expresión de CCR5 en linfocitos T de pacientes con COVID 19 y su asociación con marcadores de inflamación sistémica. Correlación de CCR5 sérico con los parámetros inflamatorios en pacientes con COVID 19 graves. Expresados en porcentaje (a, c, e, g, i) y en medias de intensidad de fluorescencia (b, d, f, h, j). Análisis mediante correlación de Spearman; se considera un valor de $p < 0.05$ como significancia estadística.

Por último y con el propósito de identificar la especificidad y sensibilidad del porcentaje de la población de linfocitos T CCR5+ y su expresión (MFI) como marcadores de supervivencia en pacientes con COVID 19 grave, se realizó una curva ROC (Fig.3) en la cual se identificó el valor de área bajo la curva (AUC) de 0.554 para la población de linfocitos T CCR5+ y de 0.877 para la MFI de la expresión de este receptor.



Área bajo la curva

Variable(s) de resultado de prueba	Área	Error estándar ^a	Significación asintótica ^b	95% de intervalo de confianza asintótico	
				Límite inferior	Límite superior
MFICCR5	.877	.084	.016	.713	1.000
PORCCR5	.554	.153	.730	.255	.853

a. Bajo el supuesto no paramétrico

b. Hipótesis nula: área verdadera = 0,5

Figura 3. Curva ROC para CCR5. Especificidad y sensibilidad de la expresión de CCR5 y el porcentaje poblacional CCR5+ como marcador de supervivencia.

Discusión

La infección respiratoria producida por SARS-CoV-2 que genera la enfermedad COVID-19 ha presentado una tasa de mortalidad del 11% y una capacidad de diseminación de infección de hasta 2.2 personas, por lo que resulta de suma importancia conocer posibles biomarcadores diagnóstico que nos ayuden a tener un mejor control de la enfermedad ocasionada por este agente etiológico⁴.

Se ha descrito que en los casos graves de COVID-19 hay mayor probabilidad de presentar linfopenia, hipoalbuminemia, elevación de DHL, PXC y dímero D^{38,39,40}. Los niveles de biomarcadores séricos como la urea, creatinina y cistatina C también se elevan en pacientes con enfermedad grave por COVID-19 en comparación con los casos leves⁴¹. Así mismo, la fatiga, mialgias y disnea son más comunes en los pacientes graves^{38,39,40}.

El presente trabajo planteó como objetivo, evaluar si existía una correlación entre la expresión de CCR5 en linfocitos T y la presencia de la quimiocina CCL5 en suero de pacientes con COVID-19 grave, así mismo se buscó si la expresión de CCR5 en linfocitos T y el porcentaje poblacional de linfocitos T CCR5+ poseían una relación con diferentes marcadores inflamatorios empleados en la clínica con propósito pronóstico en pacientes con COVID-19. Por último, se evaluó si la expresión y/o las poblaciones CCR5+ tenían una asociación con la supervivencia de los pacientes con COVID-19 grave.

En cuanto a la concentración sérica de CCL5 (Rantes), que es una quimiocina que se ha descrito participa importantemente en procesos inflamatorios, nosotros no obtuvimos diferencias significativas entre los pacientes que mejoraron o fallecieron tras haber sido pacientes graves de COVID-19, sin embargo, se evaluó si la expresión de CCR5 que es el receptor para CCL5 se encontraba modificado en los linfocitos T de estos pacientes. En pacientes con HIV, se sabe que CCL5 señala a partir de CCR5, y que este eje participa en la activación de linfocitos T, particularmente de linfocitos T CD8⁺, en su activación y función antiviral, observándose una competencia entre CCL5 y las partículas virales de HIV por su unión al receptor⁴².

En pacientes con COVID-19 grave se han identificado niveles más altos de esta quimiocina en suero, con respecto a controles sanos⁴³. En modelos murinos, se ha descrito que los niveles elevados de CCL5 pueden causar insuficiencia renal aguda mediante afección tubular y toxicidad hepática, que puede ir desde hepatitis aguda hasta afección crónica^{44,45}, que son hallazgos comúnmente encontrados en pacientes con la infección por COVID-19. Así mismo, se ha descrito que el uso de anticuerpos monoclonales que bloquean al circuito de CCL5-CCR5 en pacientes con COVID 19, disminuye la cantidad de citocinas proinflamatorias en el suero, lo que clínicamente se ha traducido en disminución del requerimiento de vasopresores, interrupción del tratamiento sustitutivo de la función renal, retiro de la ventilación mecánica y por tanto mayor sobrevida^{35,36, 37}. Por lo anterior y por los hallazgos opuestos que se tienen para este receptor en pacientes con COVID-19 resulta importante seguir evaluando este eje CCR5 y CCL5, así como determinar su funcionalidad celular y su relación con la supervivencia de los pacientes^{30, 32-37}.

En el presente trabajo vimos la relación que existe entre CRP que es una proteína de fase aguda y la expresión de CCR5 en los linfocitos, lo cual llama la atención debido a que el incremento de esta proteína se ha asociado a múltiples patologías inflamatorias y se le ha asociado a que podría ser un posible biomarcador diagnóstico en diferentes procesos inflamatorios, sin embargo aún falta esclarecer la asociación que podría haber con el receptor de quimiocinas CCR5 en pacientes con COVID-19, ya que se ha descrito que la proteína C reactiva puede disminuir la expresión de algunos receptores de quimiocinas, entre ellos CCR5 en monocitos adherentes, sin embargo en monocitos circulantes presenta el efecto opuesto, ya que tiende a incrementar la expresión de dicho receptor⁴⁶. Por último, podemos observar la asociación que existe entre la MFI para CCR5 en los linfocitos y la relevancia que puede llegar a tener como un biomarcador pronóstico como se observa en la curva ROC.

Conclusión

Aunque en este trabajo no se demostró una diferencia entre la concentración de la quimiocina CCR5 entre los pacientes que tuvieron mejoría clínica en comparación con los que fallecieron, hay evidencia de que el receptor CCR5 puede ser útil como biomarcador pronóstico para los pacientes con infección por SARS COV2, además de ser una fuente potencial de tratamiento específico para esta enfermedad, demostrado ya en otros estudios, por lo que consideramos importante seguir evaluando este eje CCR5 y CCL5, así como determinar su funcionalidad celular y su relación con la supervivencia de los pacientes.

Referencias



1. Velavan TP, Meyer CG. The COVID-19 epidemic. *Trop Med Int Health* 2020;25:278-80.
2. Wu D, Wu T, Liu Q, Yang Z. The SARS-CoV-2 outbreak: what we know. *Int J Infect Dis* 2020.
3. Liu J, Zheng X, Tong Q, et al. Overlapping and discrete aspects of the pathology and pathogenesis of the emerging human pathogenic coronaviruses SARS-CoV, MERS-CoV, and 2019-nCoV. *J Med Virol* 2020.
4. Chan JF, Yuan S, Kok KH, et al. A familial cluster of pneumonia associated with the 2019 novel coronavirus indicating person-to-person transmission: a study of a family cluster. *Lancet* 2020;395:514-23.
5. Zhou F. Articles1054www.thelancet.com Vol 395 March 28, 2020Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. *Lancet* 2020;395:1054-62.
6. Sohrabi C, Alsafi Z, O'Neill N, et al. World Health Organization declares global emergency: A review of the 2019 novel coronavirus (COVID-19). *Int J Surg* 2020;76:71-6.
7. Imai Y, Kuba K, Rao S, et al. Angiotensin-converting enzyme 2 protects from severe acute lung failure. *Nature* 2005;436:112-6.
8. Imai Y, Kuba K, Penninger JM. The discovery of angiotensin-converting enzyme 2 and its role in acute lung injury in mice. *Exp Physiol* 2008;93:543-8.
9. Channappanavar R, Perlman S. Pathogenic human coronavirus infections: causes and consequences of cytokine storm and immunopathology. *Semin Immunopathol* 2017;39:529-39.
10. Kindler E, Thiel V. SARS-CoV and IFN: Too Little, Too Late. *Cell Host Microbe* 2016;19:139-41.
11. Kumar H, Kawai T, Akira S. Pathogen recognition by the innate immune system. *Int Rev Immunol* 2011;30:16-34.
12. Wu B, Hur S. How RIG-I like receptors activate MAVS. *Curr Opin Virol* 2015;12:91-8.
13. Kindler E, Thiel V, Weber F. Interaction of SARS and MERS Coronaviruses with the Antiviral Interferon Response. *Adv Virus Res* 2016;96:219-43.
14. Prompetchara E, Ketloy C, Palaga T. Immune responses in COVID-19 and potential vaccines: Lessons learned from SARS and MERS epidemic. *Asian Pac J Allergy Immunol* 2020.
15. Wong CK, Lam CW, Wu AK, et al. Plasma inflammatory cytokines and chemokines in severe acute respiratory syndrome. *Clin Exp Immunol* 2004;136:95-103.
16. Chien JY, Hsueh PR, Cheng WC, Yu CJ, Yang PC. Temporal changes in cytokine/chemokine profiles and pulmonary involvement in severe acute respiratory syndrome. *Respirology* 2006;11:715-22.
17. Mihara M, Hashizume M, Yoshida H, Suzuki M, Shiina M. IL-6/IL-6 receptor system and its role in physiological and pathological conditions. *Clin Sci (Lond)* 2012;122:143-59.
18. Tanaka T, Kishimoto T. Targeting interleukin-6: all the way to treat autoimmune and inflammatory diseases. *Int J Biol Sci* 2012;8:1227-36.
19. Mullberg J, Geib T, Jostock T, et al. IL-6 receptor independent stimulation of human gp130 by viral IL-6. *J Immunol* 2000;164:4672-7.
20. Yawata H, Yasukawa K, Natsuka S, et al. 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. *EMBO J* 1993;12:1705-12.
21. Muller-Newen G, Kuster A, Hemmann U, et al. Soluble IL-6 receptor potentiates the antagonistic activity of soluble gp130 on IL-6 responses. *J Immunol* 1998;161:6347-55.
22. Channappanavar R, Fehr AR, Vijay R, et al. Dysregulated Type I Interferon and Inflammatory Monocyte-Macrophage Responses Cause Lethal Pneumonia in SARS-CoV-Infected Mice. *Cell Host Microbe* 2016;19:181-93.
23. Huang C, Wang Y, Li X, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet* 2020;395:497-506.
24. Fowler RA, Lapinsky SE, Hallett D, et al. Critically ill patients with severe acute respiratory syndrome. *JAMA* 2003;290:367-73.
25. Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA* 2016;315:801-10.
26. Cutts S, Talboys R, Paspula C, Prempeh EM, Fanous R, Ail D. Adult respiratory distress syndrome. *Ann*

R Coll Surg Engl 2017;99:12-6.

27. Tejedor P, F., Mejora del proceso de un servicio de urgencias de hospital mediante la metodología Lean. *Emergencias* 2014;26:84-93.
28. Nansen A, Christensen JP, Andreasen S, et al. The role of CC chemokine receptor 5 in antiviral immunity. *Blood*. 2002;99(4):1237–1245.
29. Iwasaki M, Mukai T, Gao P, et al. A critical role for IL-12 in CCR5 induction on T cell receptor-triggered mouse CD4+ and CD8+ T cells. *Eur. J. Immunol* 2001;31:2411-2420.
30. Iannaccone G, Scacciavillani R, Del Buono MG, et al. Weathering the Cytokine Storm in COVID-19: Therapeutic Implications. *Cardiorenal Med*. 2020;10(5):277-287.
31. Panda AK, Padhi A, Prusty BAK. CCR5 Δ 32 minor allele is associated with susceptibility to SARS-CoV-2 infection and death: An epidemiological investigation. *Clin Chim Acta*. 2020;510:60-61.
32. Hubacek JA, Dusek L, Majek O, et al. CCR5 Δ 32 deletion as a protective factor in Czech first-wave COVID-19 subjects. *Physiol Res*. 2021;70(1):111-115.
33. Starčević ČN, Tota M, Ristić S. Does the CCR5- Δ 32 mutation explain the variable coronavirus-2019 pandemic statistics in Europe?. *Croat Med J*. 2020;61(6):525-526.
34. Bernas SN, Baldauf H, Wendler S, et al. CCR5 Δ 32 mutations do not determine COVID-19 disease course. *Int J Infect Dis*. 2021;105:653-655.
35. Patterson BK, Seethamraju H, Dhody K, et al. CCR5 inhibition in critical COVID-19 patients decreases inflammatory cytokines, increases CD8 T-cells, and decreases SARS-CoV2 RNA in plasma by day 14. *Int J Infect Dis* 2021;103:25–32.
36. Patterson BK, Seethamraju H, Dhody K, et al. Disruption of the CCL5/RANTES-CCR5 Pathway Restores Immune Homeostasis and Reduces Plasma Viral Load in Critical COVID-19. Preprint. medRxiv. 2020;2020.05.02.20084673.
37. Agresti N, Lalezari JP, Amodeo PP, et al. Disruption of CCR5 signaling to treat COVID-19-associated cytokine storm: Case series of four critically ill patients treated with leronlimab. *J Transl Autoimmun*. 2021;4:100083.
38. Wang D, Hu B, Hu C, et al. Clinical Characteristics of 138 Hospitalized Patients With 2019 Novel Coronavirus-Infected Pneumonia in Wuhan, China. *JAMA*. 2020 Mar 17;323(11).
39. Chen N, Zhou M, Dong X, et al. Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. *Lancet*. 2020 Feb 15;395(10223).
40. Li S, Jiang L, Li X, et al. Clinical and pathological investigation of patients with severe COVID-19. *JCI Insight*. 2020 Jun 18;5(12).
41. Zhang L, Guo H. Biomarkers of COVID-19 and technologies to combat SARS-CoV-2. *Adv Biomark Sci Technol*. 2020;2:1-23.
42. Cocchi F, DeVico AL, Garzino-Demo A, Arya SK, Gallo RC, Lusso P. Identification of RANTES, MIP-1 alpha, and MIP-1 beta as the major HIV-suppressive factors produced by CD8+ T cells. *Science*. 1995;270(5243).
43. Patterson BK, Seethamraju H, Dhody K, Corley MJ, Kazempour K, Lalezari JP, et al. CCR5 Inhibition in Critical COVID-19 Patients Decreases Inflammatory Cytokines, Increases CD8 T-Cells, and Decreases SARS-Cov-2 RNA in Plasma by Day 14. *Int J Infect Dis*. 2020, 103.
44. Yu TM, Palanisamy K, Sun KT, Day YJ, Shu KH, Wang IK, Shyu WC, Chen P, Chen YL, Li CY. RANTES mediates kidney ischemia reperfusion injury through a possible role of HIF-1 α and lncRNA PRINS. *Sci Rep*. 2016 Jan 4;6:18424.
45. Chen, L., Zhang, Q., Yu, C., Wang, F., & Kong, X. Functional Roles of CCL5/RANTES in liver disease. *Liver Research*. 2020.
46. Montecucco F, Steffens S, Burger F, Pelli G, Monaco C, Mach F. C-reactive protein (CRP) induces chemokine secretion via CD11b/ICAM-1 interaction in human adherent monocytes. *J Leukoc Biol*. 2008;84(4):1109-19.

Anexo

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 POLITICAS DE SALUD COORDINACIÓN DE INVESTIGACIÓN EN SALUD	Carta de consentimiento informado para participación en protocolos de investigación (adultos)
Nombre del estudio:	“Evaluación de la expresión de CCR5 en linfocitos T de pacientes con COVID19 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) , primordialmente los llamados linfocitos están más activadas, aunque en menor proporción, 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 las moléculas de comunicación entre las células (conocidas como RANTES, MIP1alfa y beta) que son moléculas que al ser reconocidas por los linfocitos 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 expondrán 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</p>



Andrea Arriaga Pizano al teléfono 55 56 276900 ext. 21476

Participación o retiro:

Su participación en este estudio es completamente voluntaria. Si usted decide no 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:

Dra Thalia Esmeralda Morfin Morales, 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 1. Carta 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	Fiebre			Fatiga	
	Disnea			Diarrea	
	Tos			Náuseas	
	Rinorrea			Hiposmia/anosmia	
	Expectoración			Artralgias	
	Mialgias			Cefalea	
	Artralgias			Dolor torácico	
	Disgeusia			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 2. Carta de consentimiento informado.

 INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL SEGURIDAD Y SOLIDARIDAD SOCIAL	
 INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL UNIDAD DE EDUCACIÓN, INVESTIGACIÓN Y POLITICAS DE SALUD COORDINACIÓN DE INVESTIGACIÓN EN SALUD	
Carta de consentimiento informado para participación en protocolos de investigación (adultos)	
Nombre del estudio:	“Evaluación de la expresión de CCR5 en linfocitos T de pacientes con COVID19 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) , primordialmente los llamados linfocitos están más activadas, aunque en menor proporción, 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 las moléculas de comunicación entre las células (conocidas como RANTES, MIP1alfa y beta) que son moléculas que al ser reconocidas por los linfocitos 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</p>



Andrea Arriaga Pizano al teléfono 55 56 276900 ext. 21476

Participación o retiro:

Su participación en este estudio es completamente voluntaria. Si usted decide no 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: Dra Thalia Esmeralda Morfin Morales, 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 3. 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 Inmunoquímica, Hospital de Especialidades “Dr Bernardo Sepúlveda Gutiérrez”, Centro Médico Nacional SIGLO XXI, hace constar que el protocolo titulado: “Evaluación de la expresión de CCR5 en linfocitos T de pacientes con COVID19 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):

- Material biológico infecto-contagioso: (Tejido sanguíneo)
 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