



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE QUIMICA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL CENTRO MÉDICO  
NACIONAL SIGLO XXI

**“CARACTERIZACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE TREM-1, HLA-DR,  
CITOCINAS PRO Y ANTI-INFLAMATORIAS EN PERSONAS  
SANAS”**

**T E S I N A**

**QUE PARA OBTENER EL DIPLOMA DE LA  
ESPECIALIZACIÓN EN BIOQUÍMICA CLÍNICA**

**P R E S E N T A**

**Q.F.B. LUCINA ARACELI GARCIA DOMINGUEZ**

**DIRECTOR DE TESINA: DR. ARMANDO ISIBASI ARAUJO**

**MEXICO, D.F.**

**2006**



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.

## ÍNDICE

	Páginas
Índice de tablas .....	i
Abreviaturas .....	ii
Resumen .....	iii
1. Introducción .....	1 – 7
2. Justificación .....	8
3. Hipótesis .....	9
4. Objetivos	
General .....	9
Particulares .....	9
5. Metodología	
Diseño del estudio .....	10
Criterios de selección.....	10
- Criterios de inclusión .....	10-11
- Criterios de no-inclusión .....	11
- Criterios de exclusión .....	12
Descripción de variables según la metodología	
- Variables independientes .....	12-13
- Variables dependientes .....	13-14
- Variables control .....	14
Definición operacional de variables	
- Variables independientes .....	12 -13
- Variables dependientes .....	13-14
- Variables control .....	14
Selección de la muestra .....	15
Tamaño de la muestra .....	15
6. Procedimiento	
Procedimiento para la elección de donadores .....	16
Procedimiento para la toma de muestra .....	16
Determinación de citocinas .....	17-18
Separación de células mononucleares y determinación de MHC II y TREM-1 por citometría de flujo .....	18-20
Análisis estadístico .....	21
7. Resultados .....	22-28
8. Discusión .....	29-31
9. Conclusiones .....	32
10. Bibliografía .....	33-38
11. Anexos .....	39-40

# 1. INTRODUCCIÓN

## Inflamación.

La inflamación es un mecanismo de defensa del organismo, en respuesta a múltiples estímulos como son infecciones, traumatismos e intervenciones quirúrgicas entre otros <sup>(1,2)</sup>. La respuesta inflamatoria clínicamente se caracteriza por la presencia de calor, dolor, rubor, edema y pérdida de la función <sup>(3,4)</sup>. Es mediante el flujo sanguíneo como se facilita la llegada de células involucradas en el proceso inflamatorio al sitio de la agresión, y a través de mediadores específicos producidos por éstas, como se establece la respuesta inflamatoria a nivel local, o bien, la generalización del fenómeno <sup>(5)</sup>. El resultado final de la inflamación es la eliminación del agente causal, la reparación del daño tisular y, finalmente, la eliminación de las células involucradas en todo el proceso inflamatorio. Sin embargo, en ocasiones, la respuesta inflamatoria puede ser nociva para los tejidos y generar daño <sup>(6,7)</sup>.

La inmunidad innata forma parte de la respuesta inflamatoria a la infección, y los componentes celulares esenciales de esta son los neutrófilos, macrófagos, células dendríticas, células Natural Killer (NK), y los mediadores inflamatorios que estas producen son citocinas, quimiocinas, moléculas de adhesión, etc., que regulan y/o amplifican la respuesta inflamatoria <sup>(8,9)</sup>. Estas células de la respuesta innata, sobre todo los macrófagos y las células dendríticas, se distinguen por su capacidad para producir estos mediadores después de reconocer moléculas altamente conservadas presentes en microorganismos y que han sido agrupadas bajo el término de Patrones Moleculares Asociados a Patógenos (PAMPs) <sup>(8,10)</sup>,

las cuales son reconocidas a través de receptores, conocidos en conjunto como Receptores de Reconocimiento de Patrones (PRRs). Uno de estos receptores son los Receptores tipo Toll o TLRs (por sus siglas en inglés Toll-like Receptor). En humanos se han identificado once TLRs, los cuales se encuentran distribuidos en diferentes tipos de células <sup>(8, 10, 11)</sup>. Cada TLR reconoce a diferentes ligandos, así por ejemplo TLR4 reconoce al lipopolisacárido de bacterias Gram (-), TLR 3, TLR 7, TLR 8, TLR 9 reconocen ácidos nucleicos bacterianos y/o virales, mientras que TLR 5 y TLR 11 reconocen flagelina y profilina respectivamente <sup>(12)</sup>.

Una vez que los TLRs se unen a su ligando, se activan vías de señalización intracelulares que llevan a la traslocación de factores de transcripción que inducen la transcripción de genes de mediadores inflamatorios (citocinas inflamatorias y moléculas de co-estimulación) <sup>(13)</sup>. Dentro de las citocinas inducidas durante el inicio de la respuesta inflamatoria tenemos al Factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), que actúa en forma autocrina y parácrina, induciendo la producción de más citocinas pro-inflamatorias, como son: interleucina 1 (IL-1 $\beta$ ), interleucina 8 (IL-8), interleucina 6 (IL-6), interleucina 12 (IL-12) e interferón gamma (INF- $\gamma$ ). IL-12 a través de la unión a su receptor en las células NK, induce la producción de IFN  $\gamma$  <sup>(14)</sup>. El IFN- $\gamma$  actúa sobre los monocitos y activa a la NADPH oxidasa <sup>(15)</sup> para inducir la síntesis de óxido-nítrico-sintasa y regular positivamente la expresión de Moléculas de Clase II del Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHCII) en monocitos. Las MHCII son fundamentales para la presentación de antígenos a células de la respuesta adaptativa (Linfocitos T) <sup>(1,16)</sup>. Por su parte IL-1 $\beta$ , dentro de las múltiples funciones que tiene, actúa sobre su receptor en el endotelio

vascular en el sistema nervioso central e induce la síntesis de prostaglandina E2 (PGE2) por la enzima ciclo-oxigenasa-2 (COX2). La PGE2 atraviesa la barrera hematoencefálica y llega al centro termorregulador en el piso del cuarto ventrículo, donde induce la producción de Adenosin Monofosfato Cíclico (AMPc), e incrementar la temperatura corporal <sup>(17)</sup>. La IL-6 a nivel sistémico actúa principalmente sobre los hepatocitos, induciendo la producción de proteínas de fase aguda (PCR, MBL), que son opsonizantes y ayudan a eliminar las bacterias que no fueron destruidas mediante la fagocitosis <sup>(5,18)</sup>.

Las citocinas proinflamatorias se encuentran reguladas por citocinas con funciones anti-inflamatorias, como son la interleucina 10 (IL-10), el factor de transformación-beta (TGF- $\beta$ ), el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), el receptor soluble de TNF- $\alpha$ , el receptor antagonista de la IL-1 $\beta$  (IL-1ra) y algunas prostaglandinas. Especialmente la IL-10 se encarga de inhibir la producción de citocinas proinflamatorias como IL-12, con la consecuente disminución de INF- $\gamma$  <sup>(19,20)</sup>.

## **RESPUESTA INFLAMATORIA SISTEMICA**

Un estado sensibilizado de la respuesta inflamatoria que se manifiesta clínicamente constituye el Síndrome de Respuesta Inflamatoria Sistémica (SIRS), se caracteriza por la presencia de dos o más de los siguientes criterios: fiebre o hipotermia ( $>38^{\circ}\text{C}$  ó  $< 36^{\circ}\text{C}$ ), leucocitosis o leucopenia ( $>12,000$  células por  $\text{mm}^3$  o  $<4000$  células por  $\text{mm}^3$ ), taquicardia (FC  $> 90$  X') y taquipnea (FR  $> 20$  X'). El desarrollo de SIRS puede estar en relación a diferentes entidades clínicas, sin embargo, en donde primero se observó fue en pacientes con sepsis <sup>(3,21)</sup>. Es a

partir del estudio de la sepsis, que se observó que no todos los pacientes que presentaban SIRS tenían presentes microorganismos patógenos, por lo que se redefinieron los conceptos y se limitó a hablar de infección cuando un microorganismo patógeno se encontraba en el organismo. De esta manera se refiere que en SIRS se presentan las manifestaciones antes descritas, pero sin la evidencia del patógeno y Sepsis cuando se presenta SIRS acompañado de infección <sup>(22)</sup>. A estas definiciones se sumaron después las de sepsis severa, que es la presencia de sepsis pero con falla orgánica múltiple y el choque séptico cuando se presenta hipotensión persistente a pesar del manejo correspondiente. El proceso pro-inflamatorio es compensado con la producción de citocinas anti-inflamatorias. A diferencia del SIRS, la generación de una respuesta anti-inflamatoria no parece tener traducción clínica, sin embargo, se puede caracterizar desde el punto de vista molecular mediante el análisis de la expresión de las moléculas MHCII por debajo de 30% (medidas por citometría de flujo) y el incremento en la producción de IL-10. Este patrón molecular se conoce como Síndrome de Respuesta Anti-inflamatoria Compensadora (CARs). La disminución en la expresión en el número de MHCII, predispone al desarrollo de infecciones por la alteración en la presentación de antígenos microbianos por las células presentadoras de antígenos (APC) a proliferación de células T <sup>(23)</sup>. Esto tiene implicaciones importantes, por un lado, pasar por alto la presencia de un proceso infeccioso puede llevar al desarrollo de sepsis y falla orgánica múltiple, ambos padecimientos con elevada mortalidad <sup>(24)</sup>.

En ocasiones, el diagnóstico de un proceso infeccioso en pacientes hospitalizados con SIRS no es fácil. En primer lugar porque los criterios originales para definir el SIRS son inespecíficos, limitados en número y subjetivos, por lo que tienen poca especificidad <sup>(25)</sup>. La sospecha de un proceso infeccioso requiere de cultivos, que en muchas ocasiones no desarrollan los microorganismos responsables, a pesar de la presencia de estos <sup>(26)</sup>. Existen reportes de moléculas endógenas que pueden desencadenar una respuesta inflamatoria sistémica o magnificarla, actuando como ligandos de TLRs, o bien a través de receptores de la superficie celular. De estos, quizá HMGB1 sea uno de los ligandos y TREM-1 (Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells-1) uno de los receptores propuestos.

Todo lo anterior ha motivado el interés por caracterizar el comportamiento de diferentes moléculas involucradas en el SIRS y el CARS, y en las diferentes formas de sepsis, para encontrar marcadores moleculares que detecten la presencia de infecciones y/o predigan el curso de la enfermedad, de manera temprana, para poder tomar una estrategia terapéutica oportuna y de esta manera, evitar las complicaciones que pueden llevar a la muerte de los pacientes. Aunque en la actualidad se utiliza la procalcitonina para detectar la presencia de microorganismos en sangre, esta prueba está limitada a bacterias. Por lo que la búsqueda de marcadores con un espectro más amplio puede resultar muy útil.

Una molécula propuesta como marcador temprano de infección es TREM-1 <sup>(27,28)</sup>. TREM-1 es un receptor que se expresa en células mieloides, principalmente en monocitos y neutrófilos. Es una glicoproteína de 243 aminoácidos y 30 kDa,



que tiene una región extracelular con un dominio parecido a los de las inmunoglobulinas, de alrededor de 120 aminoácidos y un cuello de 70 aminoácidos, una región transmembranal con un residuo cargado positivamente (lisina), y una cola citoplásmica corta, de 5 aminoácidos, que no traducen señales <sup>(29)</sup>. TREM-1 interactúa en forma no covalente con la proteína adaptadora DAP12, con la cual forma un complejo para la transducción de señales río abajo <sup>(30)</sup>. Aunque su ligando no se conoce hasta el momento, TREM-1 contribuye a la amplificación del fenómeno inflamatorio <sup>(27)</sup>. La asociación de TREM-1 con la sepsis parte de un reporte de Bouchon y colaboradores, en el que encuentran que la expresión de TREM-1 se incrementa en neutrófilos y monocitos en presencia de padecimientos inflamatorios infecciosos (bacterias extracelulares y hongos), pero no en procesos inflamatorios no infecciosos. En este mismo reporte se menciona que existe incremento en la expresión de TREM-1 en neutrófilos peritoneales de pacientes con choque séptico, contrario a lo observado en células obtenidas de lavado peritoneal de pacientes con SIRS, sin sepsis <sup>(30)</sup>. Con este trabajo, el autor propone a TREM-1 como una molécula que amplifica la respuesta inflamatoria desencadenada por microorganismos patógenos, a través del incremento en la expresión de TREM-1. De esta manera, TREM-1 señala para la producción de citocinas pro-inflamatorias. Sin embargo, bloqueando la participación de TREM-1 (con un anticuerpo anti-TREM), se puede prevenir la producción de choque séptico en modelos murinos, a través de la inhibición de la producción de mediadores pro-inflamatorios, lo que llevó a especular que podría ser blanco terapéutico en los casos de sepsis. Gibot y colaboradores, en un estudio prospectivo, analizaron TREM-1 de membrana y encontraron incremento en su

expresión en pacientes con choque séptico <sup>(31)</sup>. Isibasi y colaboradores, reportaron que el incremento en la expresión de TREM-1 de membrana, junto con la disminución en la expresión de MHCII, se asocian con mal pronóstico en pacientes quirúrgicos <sup>(2)</sup>

Por lo anterior, el conocimiento de la expresión de moléculas MHCII y TREM-1 en personas sanas es fundamental, para poder identificar las alteraciones de estas en sujetos con padecimientos inflamatorios potencialmente infecciosos.

## RESUMEN

La inflamación es proceso que, involucra el reclutamiento y activación de células del sistema inmune innato, en respuesta a una infección o una agresión no infecciosa (traumatismo, cirugías, quemaduras o pancreatitis). Su objetivo es la eliminación del agente causal, la reparación del daño tisular y la eliminación de las células involucradas en todo este proceso. Cuando la respuesta inflamatoria se sale de control, los mediadores pro-inflamatorios se liberan en forma sistémica y hay una respuesta inflamatoria generalizada anormal en órganos lejanos al sitio de la respuesta, a esto se le conoce como síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS). El mecanismo compensador del SIRS lo constituye la Respuesta Anti-inflamatoria Compensadora (CARS) que se caracteriza por la disminución de la expresión de moléculas de clase II del complejo principal de histocompatibilidad (HLA-DR), y a lo que se le ha denominado “parálisis inmunológica”, porque los pacientes son susceptibles a infecciones y por lo tanto aumenta la probabilidad de desarrollar sepsis. En estos procesos hay una disminución de moléculas del complejo principal de histocompatibilidad de clase II (HLA-DR), y alteraciones en TREM-1 (Receptor Activador Expresado en Células Mieloides) en monocitos. TREM-1 surge recientemente como un receptor de ligando desconocido, que se expresa en células mieloides, cuya función parece estar relacionada con la amplificación de la respuesta inflamatoria, por esta razón la expresión de TREM-1 y de moléculas HLA-DR pueden actuar como señal temprana de la infección durante el desarrollo de la respuesta inflamatoria sistémica. Por lo que, el conocimiento de la expresión de dichas moléculas en personas sanas es fundamental, para poder identificar las alteraciones de estas en sujetos con padecimientos inflamatorios potencialmente infecciosos.

El presente trabajo es un estudio prospectivo, transversal, observacional y comparativo; en una población de 49 donadores de banco de sangre. 37 cumplieron los criterios establecidos por el banco de sangre y 12 fueron rechazados. Se determinó la expresión de HLA-DR y TREM-1 en monocitos de sangre periférica, separados por gradiente de densidad y teñidos con anticuerpos correspondientes. Se analizaron por citometría de flujo. Por ELISA se hizo la determinación de citocinas pro-inflamatorias (IL-6, IL-12) y anti-inflamatorias (IL-10). El promedio de expresión de HLA-DR y TREM-1 de aceptados fue de 83.2% y 34.4 IMF (intensidad media de fluorescencia) respectivamente; y los rechazados de 83.2% y 32.88 IMF. Los niveles de citocinas fueron: IL-6 e IL-12 promedio de 35.15 y 820.88 pg/ml respectivamente en el grupo de aceptados; y en el grupo de los rechazados de 10.66 y 910.50 pg/ml, respectivamente. IL-10 en aceptados fue 6.62 pg/ml y 0.96 pg/ml para los rechazados.

Este trabajo nos permite establecer límites normales de expresión de dichas moléculas, y nos permitirá usarlos como valores de referencia al analizar pacientes con patologías inflamatorias y/o infecciosas.

## 2. JUSTIFICACIÓN

La respuesta inflamatoria es un común denominador a gran cantidad de procesos patológicos. La respuesta inflamatoria aguda, dependiendo del tipo y magnitud del padecimiento, puede ser leve y autolimitada, sin traducción clínica, o puede llevar al desarrollo del SIRS. Esta respuesta en la mayoría de los casos va seguida de una fase compensadora o anti-inflamatoria, que permite recuperar la homeostasis. En ocasiones, esta fase compensadora puede ser tan intensa que desencadena el CARS. En esta etapa, los pacientes habitualmente no son portadores de infecciones, pero se encuentran en riesgo de adquirirla. Recientemente se ha despertado el interés por encontrar marcadores que detecten en forma temprana la presencia de problemas infecciosos, con la idea de continuar el tratamiento establecido o bien, reorientar el mismo. De lo anterior se desprende el reciente interés por analizar si el aumento de la expresión de TREM-1 puede considerarse como señal interna de una progresión de tipo infeccioso y/o inflamatorio.

Con lo anterior es fundamental conocer la expresión de moléculas en superficie de células mieloides específicamente la de monocitos, en personas sanas, para que sirva como referencia y así poder identificar las alteraciones de las mismas en sujetos con determinadas patologías y, principalmente, para estudios posteriores para establecer una correlación clínico-molecular que nos permita encontrar alteraciones moleculares en estadios iniciales de infecciones capaces de orientar la conducta terapéutica en una forma oportuna.

### **3. HIPÓTESIS**

La expresión de TREM-1 en sujetos sanos la encontraremos con valores bajos, en tanto que se encontrara incremento en la expresión de moléculas MHCII.

### **4. OBJETIVOS**

#### **General**

Cuantificar la expresión de TREM-1 de membrana en personas sanas.

#### **Particulares**

- Cuantificar la expresión de moléculas MHCII en sujetos sanos.
- Determinar la concentración de citocinas pro y anti-inflamatorias en personas sanas.
- Establecer la correlación clínico molecular entre el estado de salud y valores de laboratorio de personas sanas.
- Analizar o cuantificar la expresión de TREM-1, HLA-DR y citocinas en donadores que no fueron aceptados y hacer la comparación con los valores de los donadores aceptados.

## **5. METODOLOGÍA**

### **Diseño del estudio**

Estudio prospectivo y transversal. El estudio comprendió una parte clínica y otra experimental.

La parte clínica incluyó la evaluación de personas sanas, donadores del Banco de Sangre y Medicina Transfuncional del Hospital Infantil de México, "Dr. Federico Gómez". Y la parte experimental comprendió la determinación de las moléculas TREM-1, HLA-DR y algunas citocinas.

### **Criterios de selección**

Los criterios de selección del banco de sangre se establecieron de acuerdo a la NOM-003-SSA2-1993.

### **Criterios de inclusión:**

- a. Personas de cualquier sexo.
- b. Personas entre 18 y 65 años.
- c. Peso mínimo 50 Kg
- d. Nunca haber padecido paludismo, recibido vacuna antirrábica, cirugía mayor, transfusiones, parto, tatuajes, o acupuntura.
- e. No tener factores de riesgo como: homosexualidad, bisexualidad, relaciones sexuales sin protección, con parejas ocasionales o uso de drogas intravenosas.
- f. No estar menstruando ni embarazadas.

- g. No haber tomado medicamento (tetraciclinas, isotretinoína y ácido acetil salicílico entre otros) en las últimas 72 hrs.

**Criterios de no-inclusión:**

- a. Personas que en el examen físico tengan:
  - i. Peso menor de 50 kg
  - ii. Frecuencia cardíaca menor de 50 latidos/min. (excepto atletas) o mayor de 100.
  - iii. Presión arterial de 100 o mayor para la diastólica y de 180 o mayor para la sistólica.
  - iv. Temperatura axilar 36.5 o mayor u oral de 37.5 °C o mayor.
  - v. Huella de múltiples venopunciones o mala calidad de vena.
- b. Tener antecedentes patológicos:
  - i. Sujetos que en los últimos 5 años tengan antecedentes de paludismo.
  - ii. Personas que en los últimos 3 años tengan antecedentes de dos o más infecciones bacterianas, septicemia, neumonía, meningitis.
  - iii. Aquellas que en el último año tengan: sífilis, gonorrea, infección por *chlamydia*.
  - iv. En los últimos 6 meses hayan tenido: cirugía o accidente mayor, parto, cesárea o aborto.
- c. Serología Positiva (HIV, VHC, VHB, brucelosis, sífilis, enfermedad de chagas)
- d. Biometría hemática alterada (valores de hemoglobina, hematocrito, plaquetas, glóbulos blancos y rojos por debajo o arriba de las cifras reportadas en la tabla A.

### **Criterios de exclusión:**

Personas cuyas muestras sanguíneas no fueron factibles de procesar por situaciones inherentes a la toma y/o procesamiento de la misma como son: muestras hemólisadas, mala formación del gradiente de densidad o separación inadecuada de las células monoclonales.

### **Descripción de las variables según la metodología**

#### **Variables independientes:**

- Donadores de Banco de sangre

#### **Variables dependientes:**

- Expresión de TREM-1
- Secreción de IL-6, IL-10 e IL-12.
- Expresión de MHC II.

#### **Variables de control**

- Edad.
- Sexo.

### **Definición operacional de variables**

#### **Variables independientes**

Donador Altruista de Banco de Sangre:

Sujeto que proporciona su sangre o componentes de ésta, para alguien que la requiera.



Donador Familiar de Banco de Sangre:

Persona que proporciona su sangre o componentes de ésta, a favor de un paciente vinculado con ella.

### **Variables Dependientes**

IL-6:

Proteína soluble, involucrada en la regulación de la actividad celular, particularmente de la respuesta inmune. Tiene efectos predominantes en la respuesta inflamatoria y se encuentra involucrada en la generación de la respuesta sistémica inflamatoria. Su determinación en el presente trabajo es mediante ELISA y el resultado se expresa en picogramos por ml, es una variable cuantitativa continua.

HLA-DR:

Molécula del complejo principal de histocompatibilidad de clase II, encargada de la presentación de antígenos exógenos a las células T y localizada en la superficie de las células presentadoras de antígenos. Su determinación en el presente trabajo es a través de citometría de flujo.

IL-10:

Citocina involucrada en la regulación de la actividad celular, particularmente de la respuesta inmune. Tiene efectos predominantes en la respuesta anti-inflamatoria y se encuentra involucrada en la generación de la respuesta sistémica anti-inflamatoria compensadora. Su determinación en el presente trabajo es mediante

ELISA y el resultado se expresa en picogramos por ml, es una variable cuantitativa continua.

IL-12:

Proteína soluble, participa en la regulación de la actividad celular, particularmente de la respuesta inmune. Tiene efectos predominantes en la respuesta inflamatoria y se encuentra involucrada en la generación de la respuesta sistémica inflamatoria. Su determinación en el presente trabajo es mediante ELISA y el resultado se expresa en picogramos por ml, es una variable cuantitativa continua.

TREM-1:

Receptor activador expresado en células Mieloides (Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells). Es una proteína que pertenece a la Ig-SF. Se expresa en neutrófilos, monocitos CD14<sup>alto</sup> y principalmente en células que infiltran tejidos infectados por bacterias. Difícilmente detectable en tejidos inflamados no infectados. No se conoce ligando y su activación induce la liberación de mediadores pro-inflamatorios, presentando un efecto sinérgico en presencia de LPS

### **Variables de control**

Edad: expresada en años en una escala cuantitativa discreta.

Sexo: expresado en una escala cualitativa nominal. Masculino, Femenino.

### **Selección de la muestra**

Se incluyeron personas electivamente seleccionadas por el Banco de Sangre y Medicina Transfuncional del Hospital Infantil de México, Federico Gómez.

### **Tamaño de la muestra**

Se trata de un estudio clínico básico, donde se buscó conocer el patrón de expresión molecular de HLA-DR, TREM-1, IL-10, IL-12 e IL-6 en 49 personas sanas donadores de Banco de Sangre del Hospital Infantil de México Federico Gómez que fueron captados durante el periodo establecido por el proyecto.

## **6. PROCEDIMIENTO**

### **Procedimiento para la elección de donadores**

Los donadores estudiados acreditaron cada una de las etapas establecidas por el banco de sangre y sus valores de la biometría hemática estuvieron dentro de los rangos de referencia que se muestran en la tabla A (ver anexos) y las pruebas serológicas fueron negativas Tabla B (ver anexo).

Etapas de selección de los donadores:

Etapa 1. Medición de signos vitales, talla, temperatura y peso.

Etapa 2. Recolección de datos personales.

Etapa 3. Toma de muestra para determinación de Biometría Hemática y Triglicéridos.

Etapa 4. Historia Clínica y exploración Física.

Etapa 5. Área de Flebotomía: Toma de muestra para pruebas serológicas.

### **Procedimiento para la toma de muestra**

A los donadores se les extrajo por punción venosa cuatro tubos de sangre periférica con un volumen de 7 mL por tubo, dos tubos fueron utilizados para las pruebas en el banco de sangre, una para determinación de citocinas que se colocó en un tubo sin anticoagulante, y la otra para determinación de TREM-1 y MHC clase II colocada en un tubo con anticoagulante heparina.

### **Determinación de citocinas en suero**

Los tubos de muestra sin heparina, se centrifugaron a 2500 rpm durante 10 minutos a 8 grados centígrados. Se extrajo el suero con pipetas de precisión y puntas desechables. Se hicieron alícuotas de 250  $\mu$ L cada una en tubos Eppendorf de 0.5 mL. Posteriormente se congelaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis. Identificando cada uno de los tubos con las iniciales del paciente y fecha de obtención de la muestra.

Se llevó a cabo el ELISA por duplicado para la detección de las citocinas pro-inflamatorias IL-6 e IL-12 y la citocina anti-inflamatoria IL-10. Se utilizó el kit OptEIA™ (Pharmingen), se realizó la detección de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. El procedimiento en general se explica a continuación:

- Se utilizaron placas de 96 pozos y se cubrieron con 50 $\mu$ L de anticuerpo de captura diluido en solución reguladora (la concentración dependió de la citocina, de acuerdo a las recomendaciones del fabricante). Las placas se incubaron toda la noche a  $4^{\circ}\text{C}$  y al día siguiente se lavaron 3 veces con solución reguladora de lavado (PBS con Tween-20 al 0.05%).
- Los pozos fueron cubiertos con 200  $\mu$ L de solución reguladora de bloqueo (PBS con FBS 10%, pH 7.0), se incubaron por 1 hora a temperatura ambiente y se lavaron 3 veces con solución de lavado.
- Se prepararon diluciones seriadas del estándar y por duplicado se colocaron 100  $\mu$ L de cada concentración estándar y 100  $\mu$ L por duplicado de cada muestra y controles.

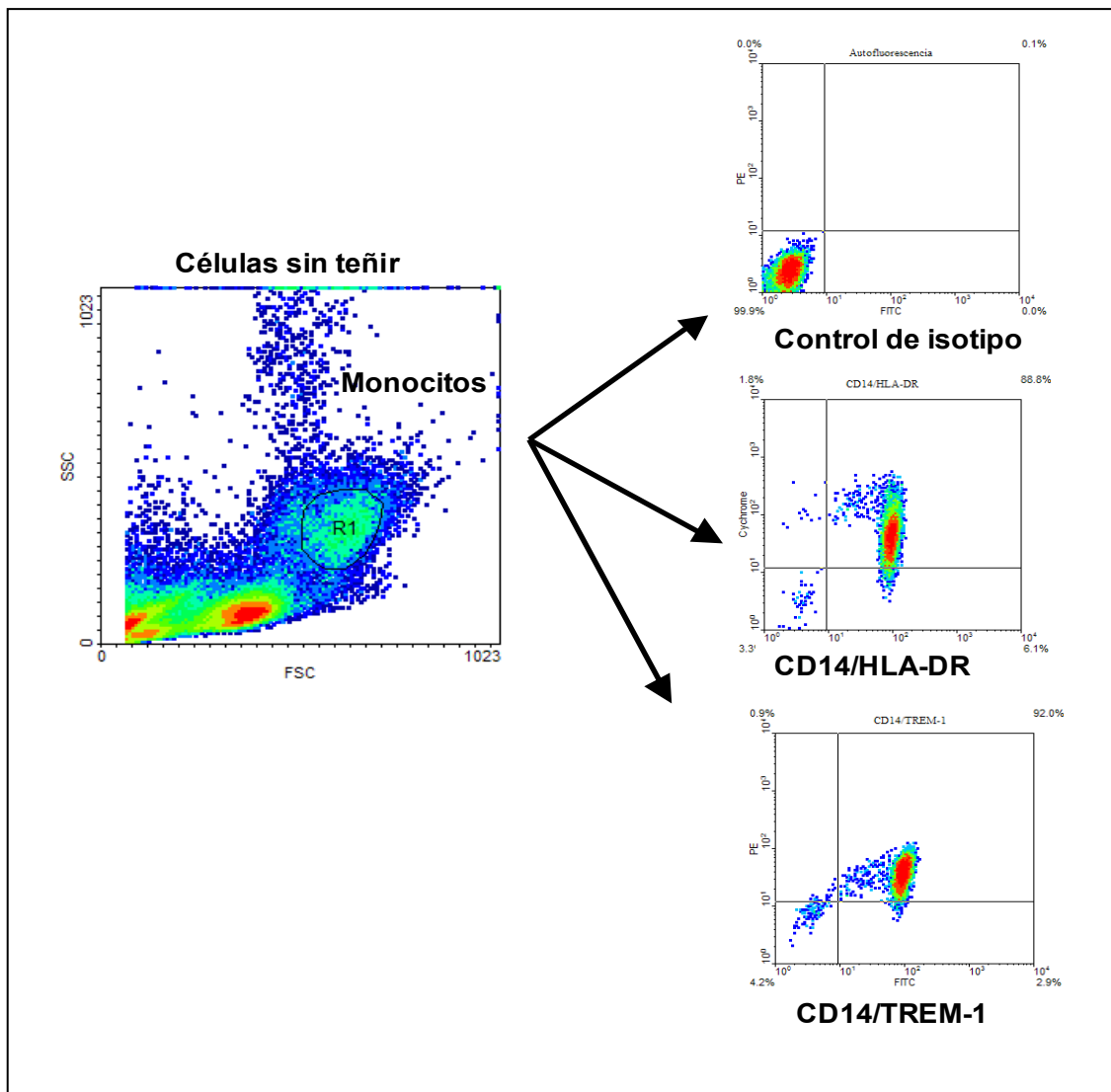
- Las placas permanecieron en incubación por dos horas a temperatura ambiente y se lavaron cinco veces con solución de lavado.
- Se añadieron 100  $\mu$ L Anticuerpo de detección más estreptavidina-HRP a cada pozo y se incubó por una hora a temperatura ambiente. Se lavaron siete veces con solución de lavado.
- Se añadieron 100  $\mu$ L de sustrato (tetrametilbenzidina más peróxido de hidrógeno) a cada pozo y se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente protegidos de la luz. Se añadieron 50  $\mu$ L de solución de paro (ácido sulfúrico 2 N) y 30 minutos después se leyó la absorbancia a 450 nm en el lector Fluoroskan.

**Separación de células mononucleares y detección de MHC II y TREM-1 por citometría de flujo.**

- La muestra de sangre en tubos con anticoagulante se colocó en tubos Falcón de 50 mL, se diluyó 1:2 con solución 0.9% de NaCl
- En tubos Falcón de 15 mL se colocaron 2 mL de Ficoll hypaque, y se agregaron 11 mL de sangre previamente diluida y se centrifugó a 1500 rpm durante 30 minutos a temperatura ambiente.
- Se transfirió el anillo de células mononucleares a tubos Falcón de 15 mL, se lavaron con solución salina isotónica, llevando cada tubo hasta un volumen de 15 mL, se centrifugó a 1500 rpm durante 10 minutos a 12°C, se decantó el sobrenadante y se resuspendió el botón celular. Se hicieron dos lavados mas con solución 0.9% de NaCl a 1,100 y 1000 rpm durante 10 minutos a 12 °C.

- Al termino del último lavado se removió el sobrenadante y se resuspendió el botón en 2 mL de solución 0.9% de NaCL.
- Se realizó el conteo celular en cámara de Newbauer haciendo una dilución 1:10 en azul tripan.
- Se rotularon 5 tubos para FACS con las iniciales de cada paciente y fecha. Se agregó anticuerpo a cada tubo como sigue:
  - Tubo 1: Sin anticuerpo.
  - Tubo 2: 4  $\mu$ L de anti CD14 marcado con FITC.
  - Tubo 3: 5  $\mu$ L de anti TREM-1 marcado con PE.
  - Tubo 4: 4  $\mu$ L de anti HLA-DR marcado con Cychrome.
  - Tubo 5 : 4  $\mu$ L de anti CD14 FITC.+ 5  $\mu$ l de anti TREM-1 PE + 4  $\mu$ l de anti-HLA-DR Cychrome.
- A cada tubo se agregaron 2 millones de células mononucleares. Se agitó suavemente y se incubó en la oscuridad a 4 °C por 20 minutos.
- Se agregaron 300  $\mu$ l de solución de lisis a cada tubo, se agitó suavemente e incubó a temperatura ambiente por 15 minutos.
- Al termino de la incubación se agregaron 1000  $\mu$ l de solución 0.9%, se agitó suavemente y se centrifugó a 2500 rpm a temperatura ambiente durante 5 minutos. Se decantó el sobrenadante y se resuspendió el botón celular. Posteriormente se agregaron 200  $\mu$ l de solución fisiológica. Finalmente se taparon los tubos y se guardaron en la oscuridad a 4°C para su lectura.
- La lectura se realizó por citometría de flujo, a partir de células sin teñir, la región de monocitos se seleccionó por tamaño y granularidad, posteriormente

se ajustó la autofluorescencia, corroborando el bloqueo con el control de isotipo y se compensó la sobreposición de la fluorescencia de los fluorocromos empleados (FITC y PE). Una vez ajustados todos los parámetros, se analizaron las muestras con tinción doble de CD14 /HLA-DR y CD14 /TREM-1 (fig.1 análisis de monocitos en sangre periférica).



**Fig. 1.** Determinaciones de HLA-DR y TREM-1 en monocitos de sangre periférica, mediante citometría de flujo.



## **Análisis Estadístico**

Para el análisis se utilizó el programa estadístico SPSS versión 11.0. Aplicándose descripción mediante medidas de resumen, medidas de tendencia central y de dispersión, así como análisis inferencial mediante pruebas de homogeneidad con estadístico de Levene para comparación de medidas y  $X^2$  para frecuencias y proporciones. En todos los casos se consideró estadísticamente significativo un valor de probabilidad menor o igual a 0.05; posteriormente medidas de asociación estadística mediante t de Student para grupos independientes y  $X^2$  para dos grupos independientes.

## 7. RESULTADOS

En el periodo comprendido de agosto del 2005 a mayo del 2006, se incluyeron 49 sujetos que acudieron a donar sangre al Banco de Sangre del Hospital Infantil Federico Gómez. Se dividieron en dos grupos, con base en su aceptación o rechazo de acuerdo a los criterios del banco de sangre. 37 individuos conformaron el grupo de donadores aceptados, por cumplir con los criterios establecidos por el banco de sangre; los 12 restantes conformaron el grupo de donadores rechazados por banco de sangre por no cumplir con alguno de los criterios de inclusión. El promedio de edades para el grupo de donadores aceptados fue de 33.7 años (19-53) con  $\pm$  DE (Desviación Estandar) 9.06, y para el grupo de donadores no aceptados fue de 33 años (20-51) con  $\pm$  DE 10.84, sin diferencia significativa, entre los dos grupos.

La distribución por sexo se muestra en la tabla 1, observándose que en ambos grupos predominó el sexo masculino.

Grupo	Sexo	N	%	Valor de p
D. aceptados	F	7	19	p > 0.05
	M	30	81	
D. no aceptados	F	4	33	p > 0.05
	M	8	67	

**Tabla 1.** Distribución por sexo.

Respecto al grupo sanguíneo, entre los donadores aceptados se encontraron tres grupos sanguíneos diferentes: A Rh (+), B Rh (+) y O Rh (+), predominando este

último, con un 73%. En el caso de donadores no aceptados, solo a 3 personas se les determinó el grupo sanguíneo, siendo los tres O Rh (+).

Dentro del grupo de donadores no aceptados, la causa principal de rechazo fue leucocitosis, la cual estuvo presente en cinco personas (41.7%), dos donadores dieron reactivo a pruebas de serología, uno a enfermedad de Chagas y otro a Hepatitis C (17%), dos donadores mas presentaron clínicamente una infección respiratoria viral, uno presentó anemia, otro leucopenia y otro poliglobulinemia.

### **Cuantificación de HLA-DR y TREM-1 en donadores aceptados y no aceptados.**

Se analizó y comparó la expresión de MHCII en monocitos de sangre periférica en los dos grupos. En donadores aceptados el promedio de expresión de MHCII fue de 83.2% (47.11 – 96.51), en tanto que en donadores no aceptados fue de 83.2% (57.80 – 96.66), no existiendo diferencias significativas entre los grupos ( $p > 0.05$ ).

Respecto a la expresión de TREM-1 el promedio de expresión en los donadores aceptados fue de 34.48 IMF (9.0 – 82.8) y en los donadores no aceptados fue de 32.88 IMF (11.0 – 59.2), no existiendo diferencias significativas entre los grupos

Tabla 2.

Molécula	Grupos	N	Rango	Media	DE	CV	p
HLA-DR	aceptados	37	47.1 - 96.5	83.19	11.62	0.14	p > 0.05
	no aceptados	12	57.8 - 96.6	83.18	11.04	0.13	
TREM-1	aceptados	37	9.0 - 82.3	34.48	16.29	0.47	p > 0.05
	no aceptados	12	11.0 - 59.2	32.87	13.70	0.42	

**Tabla 2.** Análisis estadístico de la expresión de HLA-DR y TREM-1. No hay diferencias significativas entre aceptados y no aceptados.

### **Cuantificación de citocinas en donadores aceptados y no aceptados.**

En cuanto a los niveles de citocinas IL-6, IL-12 e IL-10 en suero de donadores se tiene que:

IL-6. Los donadores aceptados tuvieron valores promedio de 35.15 pg/ml, mientras que en los donadores no aceptados el promedio fue de 10.65 pg/ml (Tabla 3). IL-12. Los donadores aceptados tuvieron un promedio de 820.88 pg/ml y los no aceptados 910.49 pg/ml. Para la citocina anti-inflamatoria IL-10, el promedio en los donadores aceptados fue de 6.61 pg/ml y en los no aceptados fue de 0.95 pg/ml.

Citocinas	Grupos	N	Rango	Media pg/mL	DE	CV	p
IL-6	aceptados	37	0 - 371.80	35.15	84.18	2.39	p > 0.05
	no aceptados	12	0 - 21.53	10.65	6.72	0.63	
IL-12	aceptados	37	84.30 - 2042	820.88	549.86	0.67	p > 0.05
	no aceptados	12	322 - 1444.98	910.49	358.15	0.39	
IL-10	aceptados	37	0 - 127.63	6.61	23.2	3.51	p > 0.05
	no aceptados	12	0 - 11.47	0.95	3.31	3.48	

**Tabla 3.** Análisis estadístico de las citocinas (IL-6, IL-12 y IL-10), comparando los valores entre aceptados y no aceptados.

También se realizó una comparación respecto a los valores de la biometría hemática tomada a los donadores de ambos grupos, se muestra en la tabla 4. De este análisis solo se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas en la cuenta de glóbulos blancos, en donde se observaron valores mas elevados en donadores no aceptados con una  $p = 0.045$ , y en los linfocitos donde los valores mas elevados los tuvieron los donadores aceptados,  $p = 0.013$ . En el resto de los valores no hubo diferencias estadísticamente significativas.

<b>Biometría</b>	<b>Grupos</b>	<b>N</b>	<b>Rango</b>	<b>Media</b>	<b>DE</b>	<b>CV</b>	<b>P</b>
<b>HB</b>	Aceptados	37	13.2 - 19.4	16.88	1.45	0.08	p > 0.05
	no aceptados	12	12.0 - 19.4	16.27	1.95	0.12	
<b>HCTO</b>	aceptados	37	39.8 - 57.5	50.53	4.32	0.08	p > 0.05
	no aceptados	12	38.9 - 57.5	48.92	5.03	0.10	
<b>Eritrocitos</b>	aceptados	37	4.65 - 6.47	5.50	0.42	0.07	p > 0.05
	no aceptados	12	3.90 - 6.33	5.33	0.66	0.12	
<b>Leucocitos</b>	aceptados	37	5.3 - 10.0	7.06	1.36	0.19	
	no aceptados	12	4.4 - 13.0	8.94	2.82	0.31	p = 0.045
<b>linfocitos</b>	aceptados	37	17.1 - 51.8	34.16	6.65	0.19	p = 0.013
	no aceptados	12	14.4 - 55.0	27.32	11.13	0.41	
<b>plaquetas</b>	aceptados	37	174 - 478	272.27	86.85	0.32	p > 0.05
	no aceptados	12	190 - 432	287.91	71.23	0.25	

**Tabla 4.** Comparación de los valores obtenidos estadísticamente de la biometría hemática entre aceptados y no aceptados.

También se realizó un análisis comparando los valores de MHCII, TREM-1 citocinas y biometría hemática, por sexo entre los grupos (tabla 5 y 6), tanto de donadores aceptados como de los rechazados, observándose que el promedio de expresión de TREM-1 en mujeres fue de 43,87 IMF y en los hombres fue de 31.25 IMF sin diferencia significativa y para MHCII se encontró que en las mujeres el promedio de expresión fue de 81.90 % y en los hombres de 83.56, también sin diferencias significativas.

Las diferencias significativas que se obtuvieron fueron en glóbulos rojos, hemoglobina y hematocrito siendo más alto en los hombres con un valor de p= 0.000. El resto de los valores en todos los análisis no mostraron diferencias significativas.

	Grupos	N	Rango	Media	DE	CV	P
<b>HLA-DR</b>	Masculino	30	47.11 - 96.51	83.09	12.49	0.15	p > 0.05
	Femenino	7	71.45 - 91.26	83.66	7.39	0.09	
<b>TREM-1</b>	Masculino	30	9.0 - 64.0	32.08	12.74	0.39	p > 0.05
	Femenino	7	24.2 - 82.8	44.75	25.62	0.57	
<b>HB</b>	Masculino	30	14.6 - 19.4	17.32	1.11	0.06	p = 0.000
	Femenino	7	13.2 - 17.0	14.97	1.2	0.08	
<b>HCTO</b>	Masculino	30	43.1 - 57.5	51.89	3.28	0.06	p = 0.000
	Femenino	7	39.8 - 50.3	44.68	3.27	0.07	
<b>Eritrocitos</b>	Masculino	30	4.72 - 6.47	5.60	0.35	0.06	p = 0.000
	Femenino	7	4.65 - 5.86	5.15	0.41	0.08	
<b>Leucocitos</b>	Masculino	30	5.3 - 10.0	7.18	1.43	0.20	p > 0.05
	Femenino	7	5.8 - 8.3	6.55	0.92	0.14	
<b>linfocitos</b>	Masculino	30	17.1 - 51.8	33.57	7.16	0.21	p > 0.05
	Femenino	7	31.9 - 39.9	36.68	2.93	0.08	
<b>Plaquetas</b>	Masculino	30	169 - 438	266.17	84.62	0.32	p > 0.05
	Femenino	7	174 - 478	298.42	98.34	0.33	
<b>IL-6</b>	Masculino	30	0 - 371.80	41.72	92.47	2.21	p > 0.05
	Femenino	7	0 - 15.14	6.98	6.82	0.98	
<b>IL-12</b>	Masculino	30	84.3 - 2042	759.88	540.6	0.71	p > 0.05
	Femenino	7	0 - 812.86	1082.31	550.61	0.51	
<b>IL-10</b>	Masculino	30	0 - 127.63	7.32	25.44	3.50	p > 0.05
	Femenino	7	0 - 61.38	3.58	9.48	2.65	

**Tabla 5.** Análisis estadístico comparando los valores de MHCII, TREM-1 citocinas y biometría hemática, entre hombres y mujeres del grupo de aceptados

	Grupos	N	Rango	Media	DE	CV	P
HLA-DR	Masculino	8	57.8 - 96.66	85.35	12.18		p > 0.05
	Femenino	4	89.3 - 70.15	78.82	7.92		
TREM-1	Masculino	8	11.0 - 45.1	28.15	12.64		p > 0.05
	Femenino	4	59.2 - 33.4	42.32	11.72		
HB	Masculino	8	15.2 - 19.4	17.28	1.23		p = 0.000
	Femenino	4	12.0 - 15.2	14.25	1.51		
HCTO	Masculino	8	46.4 - 57.5	51.58	3.34		p = 0.000
	Femenino	4	38.9 - 45.9	43.60	3.20		
Eritrocitos	Masculino	8	4.82 - 6.33	5.65	0.46		p = 0.000
	Femenino	4	3.90 - 5.18	4.7	0.56		
Leucocitos	Masculino	8	6.2 - 13.0	9.86	2.38		p > 0.05
	Femenino	4	4.4 - 11.2	7.1	3.05		
linfocitos	Masculino	8	14.4 - 32.6	22.78	7.24		p = 0.038
	Femenino	4	25.5 - 55.0	36.4	12.94		
Plaquetas	Masculino	8	234 - 432	279.12	62.90		p > 0.05
	Femenino	4	190 - 401	305.5	93.60		
IL-6	Masculino	8	0 - 16.88	9.21	5.04		p > 0.05
	Femenino	4	0 - 21.53	13.54	9.46		
IL-12	Masculino	8	473.05 - 1328.0	968.69	284.11		p > 0.05
	Femenino	4	322.80-1444.98	794.1	504.86		
IL-10	Masculino	8	0 - 11.47	1.43	4.05		p > 0.05
	Femenino	4	0 - 0	0	0		

**Tabla 6.** Análisis estadístico comparando los valores de MHCII, TREM-1 citocinas y biometría hemática, entre hombres y mujeres de no aceptados



## 8. DISCUSIÓN

Actualmente se sabe que la inflamación puede darse en presencia o ausencia de infección, cuando se da en presencia de infección, el huésped inicia una respuesta inmune innata rápida a través de sus células contra los microorganismos, el reconocimiento se hace mediante estructuras moleculares por medio de los receptores TLRs, esta interacción activa al NF- $\kappa$ B, produciendo liberación de citocinas proinflamatorias y antiinflamatorias, ambos grupos de citocinas son responsables de la regulación fisiológica inicial ante el estrés y la inflamación <sup>(2,3,8)</sup>.

En el área de la inflamación, hay un gran interés por encontrar marcadores moleculares que nos permitan conocer con oportunidad la evolución de nuestros pacientes y la presencia de complicaciones en forma temprana. Lo anterior ayudará a iniciar la terapia adecuada. En este campo, la investigación es mucho más intensa, enfocada en encontrar un fármaco que limite la respuesta inflamatoria. El estudio de la procalcitonina y la proteína C activada recombinante han sido muy importantes. Pese a lo anterior, aún no se encuentra la “bala mágica” diagnóstica o terapéutica, por lo que es importante continuar en la línea de investigación. Por lo anterior, el conocimiento de la expresión de MHCII, TREM-1 y citocinas pro y anti-inflamatorias en personas sanas es fundamental, para poder identificar las alteraciones de éstas en sujetos con padecimientos inflamatorios potencialmente infecciosos <sup>(29,32,33,34)</sup>.

En el presente trabajo se realizó el análisis de la expresión de moléculas de TREM-1 y MHCII en monocitos de sangre periférica de una población sana.

Los donadores no aceptados (12) [excluidos por leucocitosis (5), enfermedad de Chagas (1), VHC (1), leucopenia (1), infección de vías aéreas superiores (2), poliglobulia (1) y anemia (1)], no afectó el diagnóstico de rechazo para la expresión de las moléculas de MHCII y TREM-1, ya que el valor promedio obtenido para dichas moléculas fue igual al grupo de donadores aceptados. Haciendo un análisis individual del grupo no aceptado sólo se encontró a un individuo con baja expresión de MHCII (57.8%), siendo el diagnóstico de rechazo de este individuo leucocitosis y el valor más alto de la expresión de TREM-1 (59.2 IMF) se presentó en un individuo con leucocitosis. Se ha reportado que niveles bajos de HLA-DR se asocian a complicaciones en los pacientes, encontrándose una alta relación con infecciones. Los niveles altos de esta molécula ayudan a la recuperación de los pacientes. Con respecto al valor de TREM-1, niveles altos indica que hay un proceso inflamatorio o infeccioso.

No se encontraron diferencias significativas entre cada grupo con respecto a las citocinas estudiadas.

Al analizar los valores de las biometrías hemáticas entre los grupos se obtuvieron diferencias significativas en el valor de glóbulos blancos, siendo los valores más elevados en el grupo de donadores no aceptados ( $p = 0.045$ ) y en los linfocitos el valor más elevado se presentó en el grupo de donadores aceptados ( $p = 0.013$ ). El análisis donde se compararon los valores de los hombres, con los de las mujeres se observó diferencias significativas entre el valor de glóbulos rojos, hemoglobina y hematocrito siendo los valores más altos en los hombres de los grupos de aceptados y no aceptados, que en las mujeres; en tanto que el valor de linfocitos fue más alto en mujeres del grupo no aceptado ( $p = 0.038$ ). El resto de los valores

no mostraron diferencias significativas, incluyendo la expresión de las moléculas HLA-DR , TREM-1 y citocinas analizadas.

## 9. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en el presente trabajo servirán para establecer límites de referencia de personas sanas en cuanto a la expresión de TREM-1 y HLA-DR.

La expresión de TREM-1 en monocitos de sangre periférica de personas sanas fue de  $34 \text{ IMF} \pm \text{DE de } 16.3$ , con un rango de 9 a 82 IMF. No encontrándose diferencias significativas con respecto a la expresión de personas no aceptadas.

La expresión de moléculas de clase II en monocitos de sangre periférica de personas sanas fue de  $83\% \pm \text{DE } 11.6$  con un rango de 47 a 97, No encontrándose diferencias con respecto al valor de la expresión en personas no aceptadas.

Concluyendo así que los valores de moléculas de clase II en personas sanas se encuentran elevados y los de TREM-1 se encuentran bajos.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

1. Hynninen M, Pettila V, Orko R. Predictive value of monocyte histocompatibility leukocyte antigen-DR expression and plasma interleukin-4 and -10 levels in critically ill patients with sepsis. *Shock*. 2003; 20: 1-4.
2. Gonzalez-Roldan N, Ferat-Osorio E, duna-Vicente R, Wong-Baeza I, Esquivel-Callejas N, studillo-de I, V, Sanchez-Fernandez P, rriaga-Pizano L, Villasis-Keever MA, Lopez-Macias C, Isibasi A. Expression of triggering receptor on myeloid cell 1 and histocompatibility complex molecules in sepsis and major abdominal surgery. *World J Gastroenterol* 2005; 11:7473-7479.
3. Davies MG, Hagen PO. Systemic inflammatory response syndrome. *Br. J surg*. 1997; 84: 920-935.
4. Mannick JA, Rodrick ML, Lederer JA. The Immunologic response to injury. *J AM Coll Surg*. 2001; 193: 237-244.
5. Kaplanski G, Marin V, Montero-Julian F, Mantovani A, Farnarier C. IL-6 a regulator of the transition from neutrophil to monocyte recruitment during inflammation. *Trends immunol*. 2003; 24: 25-29.
6. Sherwood ER, Toliver-Kinsky T. Mechanisms of the inflammatory response. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol*. 2004; 18:385-405.

7. Luster AD, Alon R, von Andrian UH. Immune cell migration in inflammation: present and future therapeutic targets. *Nat. Immunol.* 2005; 6:1182-1190.
8. Weigan MA, Hörner C, Bardenheuer HJ, Bouchon A. The systemic inflammatory response syndrome. *Best Pract Res Clin Anaesth.* 2004; 18: 455-475.
9. Medzhitov R, Janeway C. Jr. Innate immunity. *N. Engl. J. Med.* 2000; 343: 338-344.
10. Jack RS, Fan X, Bernheiden M, Rune G, Ehlers M, Weber A, Kirsch G, Mentel R, Furl B, Freudenberg M, Schmitz G, Stelter F, Schutt C. Lipopolysaccharide-binding protein is required to combat a murine gram-negative bacterial infection. *Nature.* 1997; 389: 742-745.
11. Tsujimoto H, Ono S, Majita T, Efron PA, Kinoshita M, Hiraide H. Differential toll-like receptor expression after ex vivo lipopolysaccharide exposure in patients with sepsis and following surgical stress. *Clin Immunol.* 2006; 1-8.
12. O'Neill LA. How Toll-like receptors signal: what we know and what we don't know. *Curr Opin Immunol* 2006; 18:3-9.
13. Kiyoshi Takeda, Shizuo Akira. Toll-like receptor in innate immunity. *Internacional immunology* 2005; 17:1-14

14. Trinchieri JM. Pathophysiological role of pro- and anti-inflammatory cytokines in sepsis. *Sepsis* 1998; 2:127-140.
15. Babior BM. NADPH oxidase. *Curr Opin Immunol* 2004; 16:1-6.
16. Essen PJ, Holling T, Kuipers HF, Stoep N. Transcriptional regulation of antigen presentation. *Curr Opin Immunol* 2004; 16:67-75.
17. Han J, Lee JD, Tobias PS, Ulevitch RJ. Endotoxin induces rapid protein tyrosine phosphorylation in 70Z/3 cells expressing CD14. *J Biol Chem* 1993; 268:25009-25014.
18. Ogawa K, Hirai M, Katsube T, Murayama M, Hamaguchi K, Shimakawa T, Naritake Y, Hosokawa T and Kajiwara T. Suppression of cellular immunity by surgical stress. *Surgery*. 2000; 127: 329-336.
19. Martin C, Boisson C, Haccoun M, Thomachot L, Mege JL. Patterns of cytokine evolution (tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6) after septic shock, and severe trauma. *Crit Care Med* 1997; 25:1813-1819.
20. Lyons A, Nelly JL, Rodrick ML, Mannick JA, Lederer JA. Major injury induces increases production of interleukin-10 by cells of the immune systems with a negative impact on resistance of infection. *Ann Surg* 1997; 226:450-458.

21. Selberg O, Hecker H, Martin M, Klos A. Discrimination of sepsis and systemic inflammatory response syndrome by determination of circulating plasma concentrations of procalcitonin. *Crit Care Med.* 2000; 28: 2793-2798.
22. Bone RC, Grodzin CJ, Balk RA. Sepsis: a new hypothesis for pathogenesis of the disease process. *Chest.* 1997; 112:235-243.
23. Wolk K, Docke W, von B, V, Volk H, Sabat R. Comparison of monocyte functions after LPS- or IL-10-induced reorientation: importance in clinical immunoparalysis. *Pathobiology* 1999; 67:253-256.
24. Dodek P, Keenan S, Cook D, Heyland D, Jacka M, Hand L, Muscedere J, Foster D, Mehta N, Hall R, Brun-Buisson C. Evidence-based clinical practice guideline for the prevention of ventilator-associated pneumonia. *Ann Intern Med* 2004; 141:305-313
25. Alberti C, Brun-Buisson C, Chevret S, Antonelli M, Goodman SV, Martin C, Moreno R, Ochagavia AR, Palazzo M, Werdan K, Le G, Jr. Systemic inflammatory response and progression to severe sepsis in critically ill infected patients. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 171:461-468.



26. Sands KE, Bates DW, Lankester PN, Graman PS, Hibberd PL, Kahn KL, Parsonnet J, Panzer R, Orav EJ, Snyderman DR, Black E, Schwartz JS, Moore R, Johnson BL, Jr., Platt R. Epidemiology of sepsis syndrome in 8 academic medical centers. *JAMA* 1997; 278:234-240
27. Bouchon A, Facchetti F, Weigand MA, Colonna M. TREM-1 amplifies inflammation and is a crucial mediator of septic shock. *Nature* 2001; 410:1103-1107.
28. Colonna M. TREMS in the immune system and beyond. *Nature Rev.* 2003; 3: 1-9.
29. Colonna M, Facchetti F. TREM-1 (triggering receptor expressed on myeloid cells): a new player in acute inflammatory responses. *J Infect Dis* 2003; 187 Suppl 2:S397-S401
30. Bouchon A, Dietrich J, Colonna M. Cutting edge: inflammatory responses can be triggered by TREM-1, a novel receptor expressed on neutrophils and monocytes. *J Immunol* 2000; 164:4991-4995.
31. Gibot S, Le Renard PE, Bollaert PE, Kolopp-Sarda MN, Bene MC, Faure GC, Levy B. Surface triggering receptor expressed on myeloid cells 1 expression patterns in septic shock. *Intensive Care Med* 2005; 31:594-597.

32. Monneret G, Finck ME, Venet F, Debard A L, Bohe J, Bienvenu J, Lepape A. The anti-inflammatory response dominates after septic shock: association of low monocyte HLA-DR expression and high interleukin-10 concentration. *Immunol lett.* 2004; 95: 193-198.
  
33. Dinarello CA. Proinflammatory and anti-inflammatory cytokines as mediators in the pathogenesis of septic shock. *Chest.* 1997; 112: 321S-329S.
  
34. Tschaikowsky K, Hedwig-Geissing M, Schiele A, Bremer F, Schywolsky M, Schütter J. Coincidence of pro- and anti-inflammatory responses in the early phase of severe sepsis: Longitudinal study of mononuclear histocompatibility leukocyte antigen-DR expression, procalcitonin, C-reactive protein, and changes in T-cell subsets in septic and postoperative patients. *Crit Care Med.* 2002; 30: 1015-1023.

## 11. ANEXOS

### HOJA DE RECOLECCION DE DATOS "CARACTERIZACION DE TREM-1 EN VOLUNTARIOS SANOS

#### Datos de identificación

Nombre		Iniciales	
Código de barras		No de Donador	
Sexo		Edad	
Grupo Sanguíneo		No Telefónico	
Fecha de toma de muestra			

#### Signos Vitales

Peso	
Talla	
Temperatura	
Frecuencia Cardiaca	
Presión Arterial	
Frecuencia Respiratoria	

#### Antecedentes no patológicos

No patológico	Si	No	Observaciones
Tabaco			
Alcohol			
Alergias			
Transfusiones			
Toxicom			
Otros			

#### Antecedentes Patológicos

Patología	Si	No	Observaciones
Diabetes Mellitas			
Hipertensión Arterial			
Cardiopatía isquémica			
Cirugías			

#### Resultados de Laboratorio

Biometría Hemática			Serología	
Erit		EO	HIV	
Hb		BA	VHC	
Hto		PLQ	VHB	
Leu			Brucelosis	
Neu			Chagas	
Lin			Sifilis	
Mon				

#### Comentarios

---



---



---

Fig. 2 Hoja de recolección de datos.

## 11. ANEXOS

### HOJA DE RECOLECCION DE DATOS "CARACTERIZACION DE TREM-1 EN VOLUNTARIOS SANOS

#### Datos de identificación

Nombre		Iniciales	
Código de barras		No de Donador	
Sexo		Edad	
Grupo Sanguíneo		No Telefónico	
Fecha de toma de muestra			

#### Signos Vitales

Peso	
Talla	
Temperatura	
Frecuencia Cardiaca	
Presión Arterial	
Frecuencia Respiratoria	

#### Antecedentes no patológicos

No patológico	Si	No	Observaciones
Tabaco			
Alcohol			
Alergias			
Transfusiones			
Toxicom			
Otros			

#### Antecedentes Patológicos

Patología	Si	No	Observaciones
Diabetes Mellitas			
Hipertensión Arterial			
Cardiopatía isquémica			
Cirugías			

#### Resultados de Laboratorio

Biometría Hemática			Serología	
Erit		EO	HIV	
Hb		BA	VHC	
Hto		PLQ	VHB	
Leu			Brucelosis	
Neu			Chagas	
Lin			Sifilis	
Mon				

#### Comentarios

---



---



---

Fig. 2 Hoja de recolección de datos.

<b>Células</b>	<b>Unidades</b>	<b>Limites</b>
Glóbulos Blancos	$x 10^9 / L$	4.5 – 10.5
Glóbulos Rojos	$x 10^6 / uL$	4.0 – 6.6
Hemoglobina	g / dL	11 – 18.0
Hematocrito	%	35.0 – 60.6
MCV	FL	80.0 – 99.9
MCH	Pg	27.0 – 31.6
MCHC	g / dL	33.0 – 37.6
Plaquetas	$x 10^3 / uL$	150 – 450
% Linfocitos	%	20.5 – 51.5
Nº Linfocitos	$x 10^9 / L$	1.2 - 3.4

Tabla A. Valores de referencia de Biometría Hemática

Pruebas Serológicas	
HIV	Negativo
VHC	Negativo
VHB	Negativo
Brucelosis	Negativo
Chagas	Negativo
Sífilis	Negativo

Tabla B. Pruebas Serológicas que se realizan en Banco de Sangre.

## ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

	PAGINAS
Fig. 1 Determinación de HLA-DR y TREM-1 en monocitos de sangre periférica.	20
Tabla 1. Distribución por sexo.	22
Tabla 2. Análisis estadístico de la expresión de HLA-DR y TREM-1 entre aceptados y no aceptados.	24
Tabla 3. Análisis estadístico de citocinas (IL-6, IL-12 y IL-12) Entre aceptados y no aceptados.	25
Tabla 4. Comparación de los valores obtenidos estadísticamente de BH entre aceptados y no aceptados.	26
Tabla 5. Análisis estadístico comparando los valores de MHC II, Citocinas y BH entre hombres y mujeres del grupo – Aceptado.	27
Tabla 6. Análisis estadístico comparando los valores de MHC II, TREM-1, Citocinas y BH entre hombres y mujeres del grupo No-Aceptado.	28
Fig. 2 Hoja de recolección de datos.	39
Tabla A. Valores de referencia de biometría hemática.	40
Tabla B. Pruebas serológicas que se realizan en Banco de sangre.	40

## ABREVIATURAS

AMPc	Adenosin mono fosfato cíclico
APC	Células presentadoras de antígenos
CARS	Síndrome de respuesta antiinflamatoria compensadora
°C	Grados centígrados
CD	Moléculas de la superficie celular expresada por varios tipos de células del sistema inmune y se conocen por su número
COX2	Ciclo oxigenasa 2
BH	Biometría hemática
DAP12	Proteína adaptadora 12
ELISA	Análisis de inmunoabsorción ligado a enzimas
FC	Frecuencia cardíaca
FR	Frecuencia respiratoria
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
G-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos
HB	Hemoglobina
HIV	Virus de la inmunodeficiencia humana
HLA-DR	Antígeno leucocitario humano DR
HMGB1	Proteína B1 del grupo de alta movilidad electroforética
HCTO	Hematocrito
IL	Interleucina
IMF	Intensidad media de fluorescencia
INF	Interferón
MBL	Lectina que une manosa
MHC II	Moléculas de clase II del complejo principal de histocompatibilidad
NF-κB	Factor nuclear κB
NK	Células asesinas naturales
PAMs	Patrones moleculares que pueden estar o no asociados a patógenos
PCR	Proteína C reactiva
PE	Ficoeritrina
PGE2	Prostaglandina
PRRs	Receptores de reconocimiento de patrones
SIRS	Síndrome de respuesta inflamatoria sistémico
TGF	Factor de crecimiento transformante
TLRs	Receptores tipo toll
TNF	Factor de necrosis tumoral
TREM	Receptor activador expresado en células mieloides
VHB	Virus de hepatitis B
VHC	Virus de hepatitis C
X'	Por minuto

<b>Células</b>	<b>Unidades</b>	<b>Limites</b>
Glóbulos Blancos	$x 10^9 / L$	4.5 – 10.5
Glóbulos Rojos	$x 10^6 / uL$	4.0 – 6.6
Hemoglobina	g / dL	11 – 18.0
Hematocrito	%	35.0 – 60.6
MCV	FL	80.0 – 99.9
MCH	Pg	27.0 – 31.6
MCHC	g / dL	33.0 – 37.6
Plaquetas	$x 10^3 / uL$	150 – 450
% Linfocitos	%	20.5 – 51.5
Nº Linfocitos	$x 10^9 / L$	1.2 - 3.4

Tabla A. Valores de referencia de Biometría Hemática

Pruebas Serológicas	
HIV	Negativo
VHC	Negativo
VHB	Negativo
Brucelosis	Negativo
Chagas	Negativo
Sífilis	Negativo

Tabla B. Pruebas Serológicas que se realizan en Banco de Sangre.