



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

***“Evaluación de la actividad endofagocítica de células  
mieloides de pacientes con inflamación sistémica”***

**TESIS**

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

**PRESENTA**

**LORENA HERNÁNDEZ TORRES**

**Ciudad de México**

**2016**





Universidad Nacional  
Autónoma de México

UNAM



## **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 está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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

## **JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:**           **PROFESOR: RODOLFO PASTELIN PALACIOS**  
**VOCAL:**               **PROFESOR: GIBRAN PEREZ MONTESINOS**  
**SECRETARIO:**       **PROFESOR: LOURDES ANDREA ARRIAGA PIZANO**  
**1er. SUPLENTE:**     **PROFESOR: GUSTAVO OLVERA GARCIA**  
**2° SUPLENTE:**       **PROFESOR: OCTAVIO CASTRO ESCAMILLA**

## **SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

UNIDAD DE INVESTIGACIÓN MÉDICA EN INMUNOQUÍMICA (UIMIQ) DEL HOSPITAL DE ESPECIALIDADES DEL CENTRO MÉDICO NACIONAL SIGLO XXI DEL INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL (IMSS)

---

**ASESOR DEL TEMA: DRA. LOURDES ANDREA ARRIAGA PIZANO**

---

(Nombre y firma)

**SUPERVISOR TÉCNICO: CDR. LUIS ANGEL FLORES MEJÍA**

---

(Nombre y firma)

**SUSTENTANTE: LORENA HERNÁNDEZ TORRES**

---

(Nombre y firma)

# ÍNDICE

ABREVIATURAS .....	IV
RESUMEN .....	1
MARCO TEÓRICO .....	2
<i>Proceso inflamatorio</i> .....	2
<i>Procesos de eliminación de patógenos en el sistema inmune innato</i> .....	3
<i>Sistemas para la eliminación o contención de bacterias</i> .....	5
<i>Fagocitosis</i> .....	8
<i>Etapas del proceso de fagocitosis</i> .....	9
<i>Inflamación sistémica</i> .....	13
<i>Sepsis</i> .....	15
<i>Inflamación crónica</i> .....	20
<i>Obesidad e inflamación</i> .....	21
<i>Respuesta inmune innata y obesidad</i> .....	23
<i>Mecanismos de señalización implicados en la inflamación y la obesidad</i> .....	25
<i>Fagocitosis en respuesta inflamatoria</i> .....	26
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	27
JUSTIFICACIÓN .....	27
HIPÓTESIS .....	28
OBJETIVO GENERAL.....	28
OBJETIVOS PARTICULARES.....	28
MATERIALES Y MÉTODOS .....	29

<i>Selección de pacientes</i> .....	29
<i>Obtención de muestra sanguínea</i> .....	29
<i>Preparación de pHrodo Bioparticles</i> .....	29
<i>Identificación de leucocitos.</i> .....	30
<i>Evaluación de endofagocitosis</i> .....	31
<b>RESULTADOS</b> .....	<b>32</b>
<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>39</b>
<b>CONCLUSIÓN</b> .....	<b>43</b>
<b>REFERENCIAS</b> .....	<b>43</b>
<b>ANEXO 1. CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO.</b> .....	<b>48</b>

## ABREVIATURAS

AF	Autofluorescencia
APCs	“Antigen Presenting Cells” ó Células presentadoras de antígeno
CARS	“Compensatory Antinflammatory Response Syndrome” ó Síndrome de Respuesta Antiinflamatoria Compensatoria
CMN	Centro Médico Nacional
CMSP	Células mononucleares de sangre periférica
CR3	“Complement Receptor 3” ó Receptor de complemento 3 (Macrophage-1 antigen)
CRP	“C-Reactive proteins” ó Proteína C reactiva
DAMPS	“Danger Associated Molecular Patterns” ó Patrones moleculares asociados a daño
DT2	Diabetes tipo 2
E. coli	Escherichia coli
EE	“Early Endosome” ó Endosoma Temprano
FSC	“Forward Scatter” ó Detector Frontal
HGF	“Hepatocyte Growth Factor” ó Factor de crecimiento del Hepatocito
Fc	Fracción cristalizante de los anticuerpos
HLA-DR	“Human Leukocyte Antigen DR” ó Antígeno Leucocitario Humano DR
ICAM-1	“Intracellular Adhesion Molecule 1” ó Molécula de Adhesión Intracelular 1
IFN	Interferón
Ig	Inmunoglobulina
IKKB	“Inhibitor of Nuclear Factor Kappa-B kinase subunit beta” ó Inhibidor de la cinasa kappa B
IL	Interleucina
IMC	Índice de Masa Corporal
KO	Knockout
LDL	“Low Density Lipoprotein” ó Lipoproteína de baja densidad
LE	“Late Endosome” ó Endosoma Tardío
LFA-1	“Leukocyte Function Associated Molecule-1” ó Molécula Asociada a Función Leucocitaria
LIF	“Leukemia Inhibitor Factor” ó Factor Inhibidor de Leucemia
LPS	Lipopolisacárido
Ly	“Lysosome” ó Lisosoma
MAC	“Membrane Attack Complex” ó Complejo de Ataque a Membrana “Mean Arterial Pressure” ó Presión Arterial Media
MAP	
MARS	“Mixed Antagonist Response Syndrome” ó Síndrome de Respuesta de Antagonista Mezclados
MBL	“Manose Binding Lectine” ó Lectina de unión a manosa
MCP1	“Monocyte Chemoattractant Protein-1” ó Proteína Quimioatrayente de Monocitos 1
MFI	Intensidad Media de Fluorescencia
MIMF	“Macrophage Migration Inhibitory Factor” ó Factor Inhibitorio de la

	Migración de Macrófagos
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato
NF-KB	“Nuclear Factor Kappa B” ó Factor de Transcripción Nuclear Kappa B
NK	“Natural killer”
NLRs	“NOD-Like Receptors” ó Receptores tipo NOD
OMS	Organización Mundial de la Salud
PAI-1	“Plasminogen Activator Inhibitor 1” ó Inhibidor del Activador de Plasminógeno
PAM3SCK4	N-Palmitoyl-S-[2,3- BIS(Palmitoyloxy)-(2R,2S)-Propyl] –Cys-[S]-Lys(4) Trihydrochloride
PAMPs	“Pathogen Associated Molecular Patterns” ó Patrones Moleculares Asociados a Patógenos
PBS	“Phosphate Buffer Solution” ó Solución Amortiguadora de Fosfatos
PE-Cy7	“Phycoeritrin-Cyanine 7” ó Ficoertrina-Cianina 7
PRRs	“Pattern Recognition Receptors” ó Receptores de Reconocimiento de Patrón
RE	Retículo Endoplásmico
RLRs	“RIG-Like Receptors” ó Receptores Tipo RIG
ROS	“Reactive Oxygen Species” ó Especies Reactivas de Oxígeno
SAA3	“Serum Amyloid A3” ó Apolipoproteína A3
SIRS	“Systemic Inflammatory Response Syndrome” ó Síndrome de Respuesta Inflamatoria Sistémica
SOFA	“Sequential Organ Failure Assessment” ó Evaluación Secuencial de Falla Orgánica
SSC	“Side Scatter” ó Detector Lateral
TA	Tejido Adiposo
TLR	“Toll Like Receptor” ó Receptor Tipo <i>Toll</i>
TNF	“Tumour Necrosis Factor” ó Factor de necrosis tumoral
TREM-1	“Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells-1” ó Receptor de Activación Expresado en Células Mieloides-1
UCI	Unidad de Cuidados Intensivos
VCAM	“Vascular Cell Adhesion Molecule” ó Molécula de adhesión celular vascular
VLA-4	“Very Late Antigen 4” o Integrina $\alpha 4 \beta 1$

## Resumen

La inflamación es una respuesta de defensa que ocurre en los tejidos vascularizados ante una infección, traumatismo o lesión; involucra el reclutamiento y activación de células del sistema inmune innato a un estímulo químico, físico o microbiológico. El curso normal de la respuesta inflamatoria lleva a la eliminación del agente causal, la reparación del daño tisular y la eliminación mediante fagocitosis de agentes infecciosos, así como de los restos de células involucradas en dichas respuestas. Los neutrófilos eliminan al microorganismo mediante fagocitosis y estallido respiratorio, funciones que dependen del reconocimiento de patógenos, así como de un ambiente propicio de citocinas. Una vez contenido el agente infeccioso, se limita y resuelve el proceso inflamatorio (por mediadores lipídicos como lipoxinas, resolvinas y protectinas). En esta fase de resolución los macrófagos (tanto residentes de tejido como derivados de monocitos) eliminan los restos celulares, neutrófilos muertos y cuerpos apoptóticos.

Sin embargo, en ocasiones, la respuesta inflamatoria se vuelve sistémica y/o crónica. La exposición a los mediadores inflamatorios en estas enfermedades alteran la dinámica funcional de leucocitos. Se propone que el estado inflamatorio puede redireccionar los procesos de eliminación de agentes patógenos, lo que explicaría la predisposición de este tipo de pacientes a infecciones. Se ha reportado que en los procesos de sepsis disminuye la capacidad endo-fagocítica de los neutrófilos circulantes, primordialmente porque estos corresponden a formas inmaduras que se han movilizado tempranamente hacia la circulación sanguínea. Sin embargo, hasta el momento se desconoce si los procesos de fagocitosis de células mieloides circulantes se alteran diferencialmente dependiendo de si es inflamación sistémica aguda, como en sepsis, o crónica y de bajo grado, como se propone que ocurre en obesidad. Nuestro objetivo en este trabajo fue evaluar y comparar la capacidad fagocítica en células mieloides circulantes de pacientes con inflamación sistémica aguda o sepsis y crónica de bajo grado u obesidad. Se incluyeron pacientes con sepsis (n=5), u obesidad (n=5) y sujetos sanos (n=5). De cada sujeto se obtuvieron 3mL de sangre periférica y se evaluó la capacidad endofagocítica a partir de la capacidad de internalización y eliminación de bacterias *E. coli* marcadas con el fluorocromo pH Green. Así, mediante citometría de flujo, se identificaron y cuantificaron las poblaciones leucocitarias mayoritarias en sangre periférica y se detectamos la fluorescencia acoplada a *E. Coli* que revelaba la capacidad fagocítica. Observamos que los pacientes con sepsis y obesidad presentan tendencia al aumento de monocitos (sépticos  $77\pm 14\%$  vs obesos  $82\pm 6\%$  vs sanos  $69\pm 17\%$ ) y granulocitos (sépticos  $80\pm 21\%$  vs obesos  $86\pm 10\%$  vs sanos  $73\pm 16\%$ ) con respecto a sujetos sanos, aunque sin diferencias significativas ( $p > 0.05$ , ANOVA de una vía). También encontramos que, en comparación de las células de sujetos sanos, la capacidad endofagocítica está disminuida en los sujetos con inflamación sistémica, tanto para monocitos como neutrófilos, en el caso de pacientes con sepsis y de neutrófilos para el caso de pacientes con obesidad ( $p < 0.05$ ). En conclusión, la predisposición a infecciones en sujetos con inflamación sistémica, solo en sujetos con inflamación sistémica aguda como sepsis pero no en crónico como obesidad, se relacionaría con menor capacidad endofagocítica por los neutrófilos.



## **Marco Teórico**

La inflamación es una respuesta propia de tejidos vascularizados ante el daño producido por un agente de naturaleza microbiológica, química o física. Es un proceso de vital importancia, ya que, después de las barreras físicas, es la primera línea de defensa del organismo. De su adecuado desarrollo depende la eliminación de agentes infecciosos o detritus celulares y la restitución del tejido<sup>1</sup>.

El proceso de inflamación local requiere de la activación de células residentes del tejido (como células epiteliales y macrófagos), de células endoteliales y de leucocitos circulantes que migrarán hacia el tejido, atraídos por gradientes de quimiocinas y citocinas. La activación endotelial, indispensable para favorecer que los leucocitos circulantes se frenen y atraviesen las paredes vasculares hacia el tejido, también depende de estos mediadores solubles (citocinas/quimiocinas). Una vez en el tejido, neutrófilos y monocitos activan el estallido respiratorio y la fagocitosis, lo que ayuda a controlar a microorganismos y/o depurar detritus celulares. Fisiológicamente, se requiere que se redireccione el proceso inflamatorio a fin de favorecer los mecanismos de reconstrucción del tejido una vez que se ha eliminado el agente patógeno. En esta última fase predomina la presencia de citocinas anti-inflamatorias y la actividad de células reguladoras<sup>1,2</sup>.

En caso de que el daño no pueda ser limitado o contenido, el proceso inflamatorio se puede extender, tanto en el tiempo como en espacio, dando así lugar a inflamación crónica, granulomatosa o procesos de inflamación sistémica<sup>1</sup>. En estos estados patológicos, donde fallan los mecanismos de contención de la inflamación, los monocitos activados participan en el desarrollo de aterosclerosis<sup>3</sup>, hipertensión arterial<sup>4</sup> y síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS)<sup>5</sup>.

### ***Proceso inflamatorio***

En la respuesta inflamatoria típica se ven involucrados cuatro componentes: inductores inflamatorios, sensores que los detectan, mediadores inflamatorios inducidos por estos últimos, y los tejidos que son blanco de estos mediadores<sup>1</sup>.

En condiciones basales, las células del endotelio vascular mantienen y regulan el flujo sanguíneo, controlan la permeabilidad de las paredes de los vasos sanguíneos y, en algunos casos, inmovilizan a los leucocitos circulantes por tiempos cortos<sup>6</sup>. Por otro lado, durante el proceso inflamatorio, el endotelio vascular establece interacciones directas con los leucocitos mediante integrinas y selectinas, indispensables para su migración hacia los tejidos; adicionalmente, el endotelio puede también liberar factores de crecimiento y mediadores inflamatorios hacia el sitio de inflamación<sup>7, 8</sup>.

Para la migración transendotelial, en la región venular postcapilar de los vasos sanguíneos, se promueve el rápido reclutamiento de leucocitos por un proceso denominado “activación de células endoteliales”, definido como la adquisición de capacidades proinflamatorias y procoagulantes del endotelio. Este proceso es inducido por mediadores inflamatorios primarios y/o secundarios. Los mediadores primarios son moléculas endógenas, como las alarminas o patrones moleculares asociados a daño (DAMPs), o moléculas exógenas como los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs)<sup>1</sup>. Por otro lado, entre los secundarios se encuentran citocinas inflamatorias, quimiocinas, aminas vasoactivas y eicosanoides, que son mediadores inflamatorios dependientes de la naturaleza de los inductores y sensores involucrados en cada vía inflamatoria. Estos mediadores secundarios son liberados por células residentes de los tejidos (como células epiteliales, macrófagos y células dendríticas) tras el reconocimiento de los inductores primarios a través de los receptores de reconocimiento de patrón (PRRs), entre los que se encuentran los receptores tipo *Toll* (TLRs), receptores tipo NOD (NLRs) o receptores tipo RIG (RLRs)<sup>1, 6</sup>.

### ***Procesos de eliminación de patógenos en el sistema inmune innato***

Los mecanismos del sistema inmune innato que defienden al huésped de la infección se suelen iniciar en forma no específica, esto quiere decir que las células del sistema inmune innato reconocen y responden a patógenos de forma genérica y no confiere inmunidad protectora a largo plazo.

Dentro de estos mecanismos se encuentran: como parte del primer contacto las barreras externas: piel, que consta de dos capas bien definidas que son la epidermis y

la dermis; y membranas mucosas, que incluyen a los epitelios que recubren vías respiratorias, digestivas y urogenitales. Estas barreras anatómicas son más que simples envolturas. También montan defensas bioquímicas activas al sintetizar y desplegar péptidos y proteínas con actividad antimicrobiana.<sup>9</sup>

Las vías digestivas, respiratorias, urogenitales así como la parte expuesta de los ojos están cubiertas de membranas mucosas que constan de una capa epitelial externa y una capa subyacente de tejido conectivo. Muchos patógenos ingresan en el cuerpo a través de estas membranas; a lo cual se oponen mecanismos inespecíficos como la saliva, lágrimas y secreciones mucosas que contienen sustancias antibacterianas, siendo estas las barreras químicas.

La capacidad de la piel y los epitelios de producir una amplia variedad de agentes antimicrobianos es importante, porque problemas de continuidad en la piel a consecuencia de lesiones como heridas, abrasiones o quemaduras, constituyen vías de entrada que podrían ser fácilmente aprovechadas por microorganismos patógenos, o aún de los considerados comensales, si no existieran estos agentes anti-microbianos (también conocidos como defensas bioquímicas).

Tabla 1. Piel y barreras epiteliales contra la infección.

<b>Órgano o tejido</b>	<b>Mecanismos innatos que protegen la piel y epitelios</b>
<b>Piel</b>	Péptidos antimicrobianos, ácidos grasos
<b>Boca y parte superior del tubo digestivo</b>	Enzimas, péptidos antimicrobianos, y desprendimiento de la superficie por flujo direccional del líquido hacia el estómago
<b>Estómago</b>	Bajo pH, enzimas digestivas, péptidos antimicrobianos, flujo de líquido hacia el intestino
<b>Intestino delgado</b>	Enzimas digestivas, péptidos antimicrobianos, flujo de líquido hacia el intestino grueso
<b>Intestino grueso</b>	Competencia de la microbiota intestinal normal con los microorganismos invasores, expulsión de líquido y heces por el recto
<b>Vías respiratorias y pulmones</b>	Barrido de moco por los cilios hacia fuera, expulsión de moco por la tos, macrófagos en alveolos pulmonares

La piel y las capas epiteliales mucosas son protegidas contra la colonización microbiana por una variedad de mecanismos: químicos (enzimas, péptidos antimicrobianos, pH), mecánicos (cilios, flujo de líquido) y celulares (macrófagos alveolares). Modificada de Inmunología de Kuby, 6° Edición, 2007.

### ***Sistemas para la eliminación o contención de bacterias***

Además de las barreras físicas y bioquímica descritas, existen otros mecanismos de la respuesta inmune innata útiles para la contención y/o eliminación de microorganismos (Figura 1).

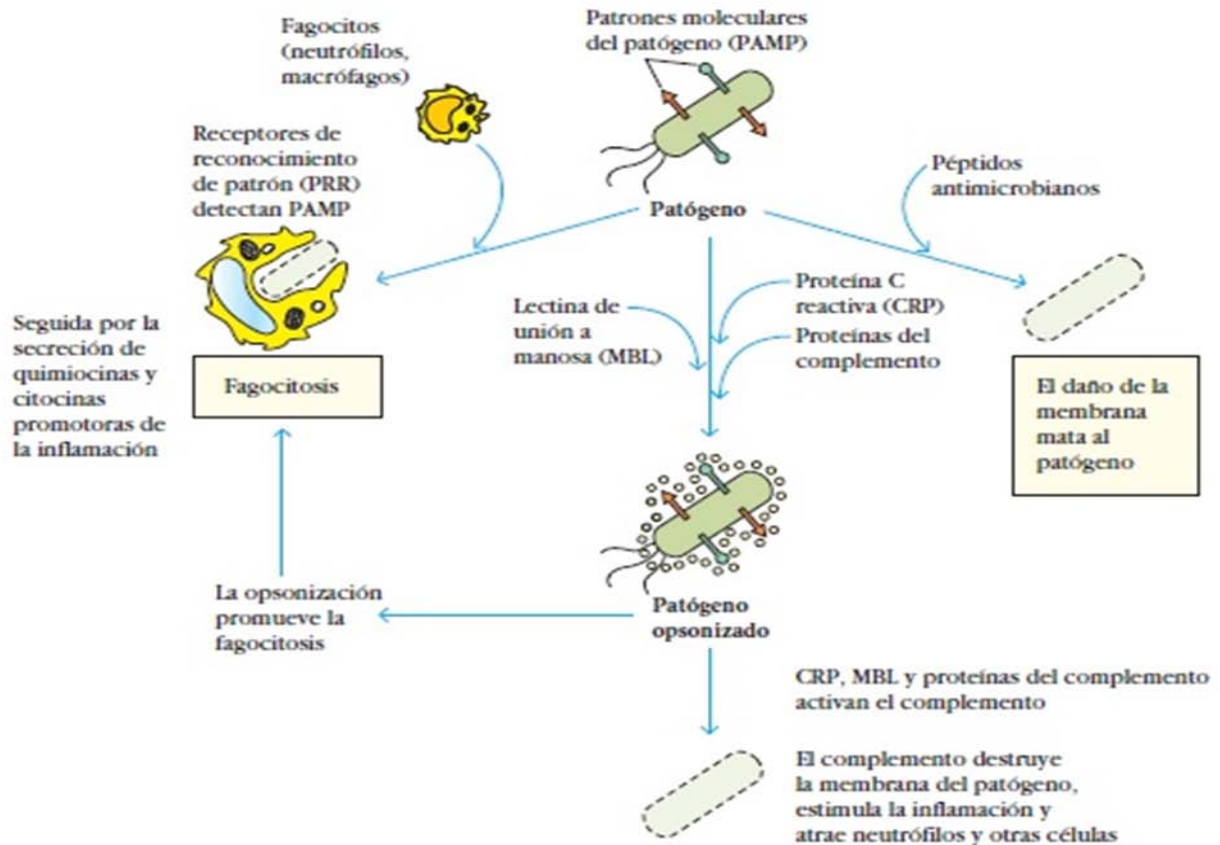


Figura 1. Respuesta inmune innata a la infección. La invasión microbiana pone en acción varios efectores de la inmunidad innata. Modificado de Inmunología de Kuby, 6ª Edición, 2007.

El ingreso de microorganismos a través de lesiones en las barreras epiteliales genera señales inflamatorias y expone al antígeno al ataque de diferentes moléculas y células efectoras. Los microorganismos que son reconocidos por la proteína C reactiva (CRP) o la lectina de unión a manosa (MBL), son capturados por estas moléculas de opsonización y activación del complemento. Algunos patógenos, como los hongos portadores de zimosán, pueden activar directamente el complemento, resultando en lisis u opsonización directa, lo cual marca al patógeno para la fagocitosis por neutrófilos o macrófagos. Durante la acción de estos efectores celulares y moleculares se generan señales inflamatorias adicionales que intensifican la respuesta al atraer más fagocitos y mediadores solubles (CRP, MBL y complemento) desde el torrente sanguíneo hasta el sitio de la infección.<sup>9</sup>

El sistema del complemento es un sistema de aproximadamente 30 proteínas del suero. La mayoría de los componentes del complemento se sintetizan en hígado y su función es facilitar la destrucción de un microorganismo invasor liberando mediadores de la inflamación, opsonizando a los patógenos o mediante lisis del microorganismo o célula blanco<sup>10</sup>.

El sistema del complemento se puede activar mediante tres vías; la vía clásica que inicia con la unión antígeno-anticuerpo (IgM o IgG), la vía alterna la cual es independiente de anticuerpo, genera productos activos similares a los de la vía clásica, pero lo hace sin necesidad de complejos antígeno-anticuerpo para iniciarse. Se activa por componentes de superficie celular extraños al hospedero. Finalmente, la tercera vía es la de las lectinas o MBL, la cual se inicia con la unión de proteínas del hospedero a superficies microbianas. Además de la generación del complejo de ataque a membrana (o MAC), la activación de complemento puede dar lugar a la generación de fragmentos como C3b o C4b, que pueden unirse a las membranas de microorganismos y con ello funcionar como opsoninas, o sea que favorecen la fagocitosis, la cual es un tipo de endocitosis, el termino general para la captación por una célula de material de su ambiente.<sup>9</sup>

Los péptidos antimicrobianos, son proteínas que participan en la respuesta inmune primaria de plantas, insectos y mamíferos. Cuentan con actividad microbicida tanto para organismos Gram positivos y negativos como para microorganismos fúngicos y ciertos virus, neutralizan endotoxinas, actividades quimiotácticas e inmunomoduladoras, inducen angiogénesis y reparación tisular<sup>11</sup>.

Otro mecanismo de defensa es la citotoxicidad mediada por células NK. Las células NK son un tipo de linfocitos granulares grandes, que carecen de los marcadores de linfocitos T y B y que constituyen pues un mecanismo efector celular temprano, antes de que lleguen los linfocitos T. Son activados por IFN- $\alpha$  e IFN- $\beta$  y por IL-12 (producido por macrófagos).<sup>12</sup> La citólisis puede incluir la inducción de apoptosis de las células blanco. La apoptosis, es un tipo de muerte celular caracterizada por el redondeo de la célula, retracción de pseudópodos, reducción del volumen celular, condensación de cromatina, fragmentación nuclear e internalización por los fagocitos residentes.<sup>13</sup> Para inducir la apoptosis se activan "Fas-FasL", las cuales son proteínas de membrana que

al interactuar una con la otra, activan a un complejo enzimático citolítico, denominado caspasas, que inducen a la célula blanco o infectada la apoptosis. Los restos celulares derivados de este proceso se eliminan, como puede ocurrir con microorganismos opsonizados, mediante procesos de internalización conocido como fagocitosis.

### ***Fagocitosis***

La fagocitosis se define como la ingestión de partículas ( $\geq 0.5\mu\text{m}$ ) mediada por receptores, en vacuolas derivadas de la membrana plasmática llamadas fagosomas.<sup>14</sup>

Las células fagocíticas pueden capturar y eliminar microorganismos patógenos o partículas antigénicas. Las células especializadas en fagocitosis incluyen a los neutrófilos y monocitos sanguíneos, así como a los macrófagos tisulares.<sup>9</sup>

Los granulocitos se clasifican en neutrófilos, eosinófilos o basófilos, según su morfología celular y características de tinción. Los neutrófilos y eosinófilos son fagocíticos, no así los basófilos. Los neutrófilos constituyen del 50-70% de los leucocitos circulantes y los eosinófilos del 1-3%, siendo esta la razón por la que nuestra población de mayor interés entre los granulocitos son los neutrófilos.<sup>15</sup>

Los neutrófilos se forman por hematopoyesis en la médula ósea. Se liberan a la sangre periférica y circulan durante 7 a 10 horas antes de migrar a los tejidos. En respuesta a infecciones, la médula ósea libera más neutrófilos de lo usual y estas células suelen ser las primeras en llegar al sitio de inflamación. El incremento transitorio de esta población celular es llamado granulocitosis y se utiliza, lo mismo que la leucocitosis como un indicio de infección en la clínica<sup>16</sup>.

El sistema fagocítico mononuclear comprende monocitos de sangre periférica y macrófagos tisulares. Durante la hematopoyesis en la médula ósea las células progenitoras de granulocitos y monocitos se diferencian en promonocitos, que salen de la médula ósea y pasan a sangre, donde se diferencian en monocitos maduros. Los monocitos circulan en el torrente sanguíneo alrededor de 8 horas, durante las cuales crecen y migran hacia los tejidos diferenciándose en macrófagos específicos de tejido donde se denominan según su localización tisular.<sup>17</sup>

La fagocitosis es una vía dinámica ya que involucra la fusión y fisión de vesículas endocíticas y secretoras y cambios en el pH, lo que resulta en la acidificación progresiva y la digestión de la carga acompañado por un amplio reciclaje de membrana.<sup>14</sup>

En el proceso de fagocitosis el reconocimiento del patógeno o cuerpo extraño está mediado por la unión ligando-receptor que generara señalización para la modificación del citoesqueleto de la célula fagocítica para que esta pueda englobar e internalizar al patógeno y generar así el fagosoma. Como ya se mencionó, este proceso puede ser optimizado por opsoninas como son los productos del complemento c3b y c4b, además de lectinas fijadoras de manosa y de inmunoglobulinas de los isotipos IgG e IgA que se unen a la membrana de bacterias. Los receptores de opsoninas que se expresan en los fagocitos determinan que se incremente la eficiencia en el proceso de reconocimiento de las partículas a fagocitar.

### ***Etapas del proceso de fagocitosis***

Los leucocitos convocados al sitio de lesión, mediante diapédesis, quimiotaxis y adherencia, en inflamación localizada median el proceso de fagocitosis, el cual consta de varias etapas (Figura 2), que son: reconocimiento por receptores, internalización, formación del fagosoma, fusión del fagosoma con el lisosoma, digestión y excreción.



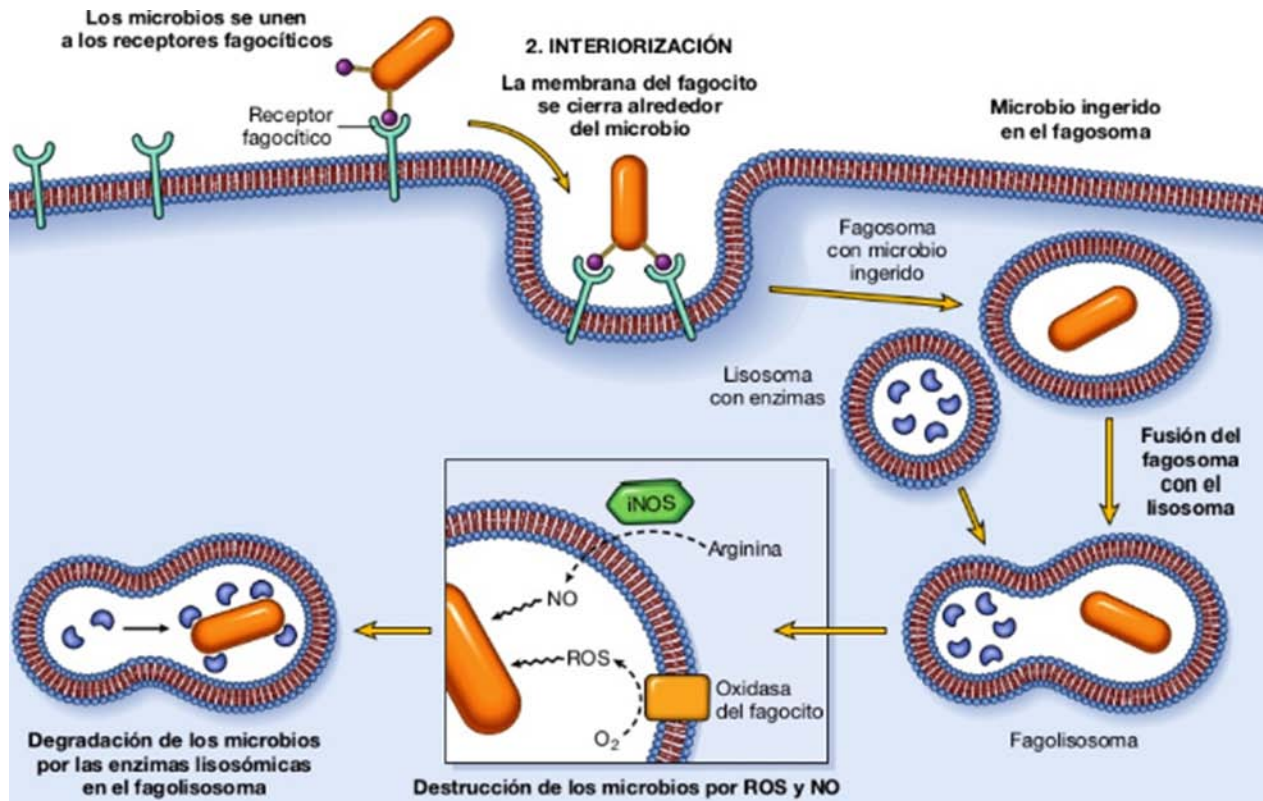


Figura 2. Etapas de la fagocitosis. La fagocitosis consta de varias etapas; reconocimiento de los microorganismos por los receptores fagocíticos como primer paso, internalización (la membrana del fagocito se cierra alrededor del microorganismo), formación del fagosoma, fusión del fagosoma con el lisosoma, digestión y excreción (se realiza mayormente por exocitosis). Fuente: Robins, Patología, 8ª edición, 2010.

- *Reconocimiento por receptores*

Receptor de manosa. Este receptor tiene afinidad por los componentes de manosa presentes en las glucoproteínas y glucolípidos de las paredes celulares de microorganismos<sup>18</sup>.

Receptores Scavenger. Estos receptores se unen directamente a microorganismos y a moléculas de LDL modificadas<sup>19</sup>.

CD14. Es un ligando con preferencia específica al lipopolisacárido presente en ciertas bacterias y está asociado al receptor tipo Toll TLR-4<sup>20</sup>.

Receptores para los fragmentos Fc de los anticuerpos opsonizantes IgG2 e IgG3.<sup>19</sup>

- *Internalización y formación del fagosoma*

La unión a receptores de adherencia promueve señales de comunicación intracelular que resultan en la formación del fagosoma, al rodear por completo al complejo receptor-molécula. Esto puede ocurrir en más de un punto de la membrana celular.

Eventos rápidos de señalización promueven la reorganización del citoesqueleto (mayoritariamente actina) y como consecuencia la extensión de los pseudópodos. A pesar que la mayoría de los modelos de fagocitosis proponen a la membrana plasmática como la principal fuente de membrana para la formación de los fagosomas (proceso de invaginación) se ha demostrado que otros organelos membranosos también contribuyen a este proceso como los endosomas reciclados, que son reclutados a la superficie celular mediante el proceso denominado exocitosis, han sido identificados como potencial fuente de membrana para la formación de los fagosomas<sup>21</sup>. También se ha demostrado que otra importante fuente de membrana que está involucrada en la fagocitosis es el retículo endoplásmico (RE), en un proceso denominado fagocitosis mediada por RE<sup>22</sup>. Existen muchos trabajos en donde se muestra que las proteínas que usualmente están en la membrana plasmática o en los endosomas reciclados y en RE (calreticulina y calnexina) también están presentes en los fagosomas indicando la potencial participación de estas membranas en la fagocitosis<sup>21</sup>.

- *Fusión del fagosoma con el lisosoma*

Luego de su formación, los fagosomas maduran en fagolisosomas mediante una serie de eventos de fusión con endosomas tempranos (EE), endosomas tardíos (LE) y lisosomas (Ly). Este proceso de maduración permite a los fagosomas adquirir propiedades microbicidas y la habilidad de procesar antígenos<sup>23</sup>.

- *Digestión*

Una vez que el fagosoma está en el citoplasma comienza la desintegración del mismo, proceso que se realiza por mecanismos dependientes o independientes de oxígeno. El primero se da tras activarse rutas metabólicas que consumen oxígeno, lo cual produce la liberación de radicales libres del oxígeno, que son tóxicos para los microorganismos.

En los neutrófilos esta función oxidativa esta mediada en gran medida por las oxidasas dependientes de NADPH, estas convierten al oxígeno molecular en oxígeno altamente reactivo que se dismuta para formar peróxido de hidrogeno en presencia de mieloperoxidasa que es una proteína lisosomal presente en gránulos azurófilos de neutrófilo, el peróxido de hidrogeno se combina con iones cloruro para formar acido hipocloroso un potente agente oxidante que se consume casi de inmediato al oxidar aminas, tioles, ácidos nucleicos, proteínas y otras biomoléculas de la materia fagocitada. Otra porción reacciona para formar cloraminas orgánicas que son agentes oxidantes de larga duración; estas acciones de los neutrófilos se manifiestan por un aumento transitorio del consumo de oxígeno a lo que se llama estallido respiratorio (Figura 3)<sup>24</sup>.

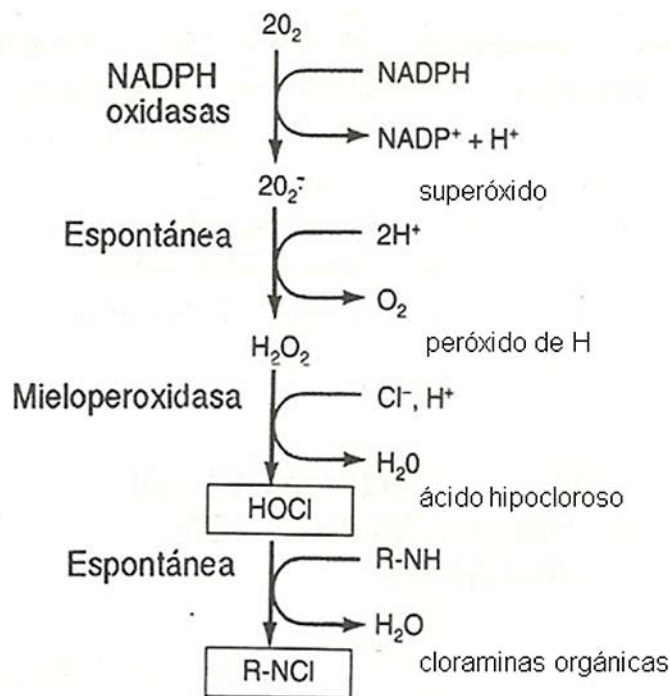


Figura 3. Generación de especies reactivas de oxígeno. Dentro de los confines de los neutrófilos varias enzimas transforman oxígeno molecular en especies altamente reactivas de oxígeno (ROS) que tienen actividad antimicrobiana.<sup>25</sup>

En el segundo caso es donde intervienen los lisosomas, los cuales se unen al fagosoma conformando un fagolisosoma, y liberando enzimas hidrolíticas que destruirán al antígeno. Para el caso de los neutrófilos algunos de los materiales contenidos en sus gránulos son proteínas microbicidas como defensinas,

mieloperoxidasas, lisozima; proteasas como elastasa, colagenasa y gelatinasa, hidrolasas o proteínas como lactoferrina, histaminasa, etc<sup>22</sup>.

La célula también acidifica el fagosoma bombeando activamente iones H<sup>+</sup> a su interior, esto activa la función de muchas enzimas granulosas, con el contenido granular de los neutrófilos también se restringe la incorporación de nutrientes a los microorganismos por ejemplo la lactoferrina que la el hierro y entonces de esta manera se restringe la capacidad del microorganismo para nutrirse<sup>26</sup>.

- *Excreción*

En el proceso de digestión queda una vesícula que contiene desechos (o el mismo antígeno, ya que no siempre puede ser desintegrado). La forma de deshacerse de estos residuos es mediante la exocitosis<sup>22</sup>.

### ***Inflamación sistémica***

La inflamación es una respuesta protectora a cambios extremos en la homeostasis, tales como infección y lesiones<sup>27</sup>; generando señales inflamatorias, incluyendo citocinas inflamatorias, quimiocinas, aminas biogénicas y eicosanoides, que inducen miles de cambios en diversos procesos biológicos, que van desde las respuestas vasculares locales a alteraciones de la temperatura corporal.

#### *Tipos de respuesta inflamatoria*

La respuesta inflamatoria se clasifica de acuerdo a su tiempo de evolución en: a) inflamación aguda, que suele presentarse abruptamente y dura segundos a horas (no más de 15 h); e b) inflamación crónica, que suele desarrollarse paulatinamente y puede durar días a años.

Además de la duración del proceso inflamatorio, se pueden diferenciar a estos procesos por sus características histopatológicas. Así, las preparaciones de tejidos con inflamación aguda muestran infiltración predominante de neutrófilos en las primeras 6 a 24 h, mientras que para las 24 a 48 h las células infiltrantes predominantes son monocitos. Para aquellos tejidos con inflamación crónica, el infiltrado de neutrófilos es escaso y abundante el de linfocitos y macrófagos, los cuales son todavía más

preponderantes en inflamación con formación de granulomas (o granulomatosa), en la cual hay también abundante presencia de fibroblastos organizados alrededor del material caseoso (que puede estar formado por microorganismos y macrófagos).<sup>28</sup>

Otra clasificación de la respuesta inflamatoria se da con base a la extensión del proceso y corresponde a: 1) inflamación local e 2) inflamación sistémica.

La respuesta inflamatoria local es aquella que se inicia por cualquier daño y/o intromisión de microorganismos en un tejido vascularizado. Una vez que las células del tejido (que pueden ser macrófagos, queratinocitos o células epiteliales), sensan a los PAMPs y/o DAMPs se activa la respuesta inflamatoria que aumentará el flujo sanguíneo, permeabilidad vascular y reclutamiento de leucocitos activados hacia el sitio afectado.<sup>29</sup>

Para ello se debe detener el movimiento de leucocitos con el fin de que puedan salir del vaso sanguíneo y migrar a las áreas afectadas. Uno de los mecanismos más importantes es la adherencia celular a través del contacto entre los leucocitos y las células endoteliales que recubren los vasos sanguíneos.<sup>30</sup> Este contacto se lleva a través de diferentes moléculas de superficie celular que permiten, en primer lugar, que los leucocitos hagan “rolling” a lo largo de la capa de células endoteliales y, en segundo lugar, detener el “rolling” y favorecer la migración desde el interior del vaso sanguíneo hacia el tejido dañado.<sup>30,31</sup> Una de las principales moléculas que participan en esta interacción entre leucocitos y células endoteliales es la molécula de adhesión intercelular 1 ó ICAM-1 (por *Intercellular Adhesion Molecule 1*) y la molécula de adhesión celular vascular 1 ó VCAM-1 (por *Vascular Cell Adhesion Molecule 1*), las cuales son glicoproteínas que se inducen por citocinas. ICAM-1 y VCAM-1 se expresan en un número limitado de células, entre ellas se encuentran las células endoteliales.<sup>32,33</sup> Se induce su expresión por citocinas pro-inflamatorias como IL-1, IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ . ICAM-1 tiene como ligando integrinas que se expresan en los leucocitos o LFA-1 (por *Leukocyte Function Associated Molecule-1*) y participa en la adhesión de leucocitos a las células endoteliales activadas. Mientras que VCAM-1 es de las primeras moléculas involucradas en la interacción entre linfocitos y monocitos con células del endotelio y tiene como ligando a la integrina VLA-4 (por *Very Late Antigen-4*).<sup>32, 34</sup>

Idealmente, los leucocitos infiltrantes y las células residentes contendrán a los agentes infecciosos (en caso de que existan) para limitar el daño, eliminarán las células muertas por el daño o respuesta inflamatoria y favorecerán la restitución o remodelación del tejido. Para ello fagocitan, realizan estallido respiratorio, eliminan cuerpos apoptóticos y participan en la remodelación de matriz extracelular<sup>22</sup>.

Todos estos cambios en el tejido median el conjunto de signos y síntomas propios de inflamación localizada, como son: eritema o enrojecimiento (“rubor”), aumento de la temperatura (o “calor”), edema o aumento de volumen (“tumor”) y dolor, a lo que se suma pérdida de la función (lo que constituye la tétrada clásica del cuadro clínico de inflamación localizada).<sup>35</sup>

Por otro lado, la respuesta inflamatoria sistémica corresponde a la extensión de una respuesta inflamatoria localizada que no es contenida o bien se da por la liberación masiva hacia circulación de mediadores inflamatorios ante eventos abruptos como traumatismos o quemaduras extensas. En la respuesta inflamatoria sistémica aguda, además de la activación masiva del endotelio y leucocitos circulantes, también se activan las vías de complemento y cascadas de coagulación <sup>36</sup>.

Dado que la fisiopatología de la inflamación sistémica aguda es diferente a la de la localizada, el cuadro clínico también varía. Se ha descrito que para el diagnóstico del síndrome de respuesta inflamatoria sistémica ó SIRS (por *Systemic Inflammatory Response Syndrome*)<sup>37</sup>, se requiere la presencia de dos o más de los siguientes signos: Fiebre o hipotermia, taquicardia, taquipnea o hipoxia y leucocitosis, leucopenia o bandemia <sup>38,39</sup>.

### **Sepsis**

Si el paciente manifiesta dos o más de los criterios ya mencionados de SIRS y si además se encuentra evidencia de infección, se denomina sepsis (Tabla 2)<sup>40</sup>.

La sepsis es causada tanto por infecciones bacterianas, fúngicas o virales y los sitios más frecuentes en donde se localizan estos focos infecciosos son pulmones, abdomen y vías urinarias. A pesar de que se creía que las bacterias Gram-positivas eran los principales agentes que causan sepsis (52,1%), en la actualidad hay pruebas de que la

sepsis causada por bacterias Gram-negativas ocurre también con alta frecuencia (37,6%)<sup>41</sup> .

De acuerdo a su severidad, se clasifica en sepsis la cual se caracteriza por la presencia de disfunción orgánica o hipo-perfusión tisular; y en choque séptico en donde persiste la hipotensión a pesar del tratamiento médico<sup>30</sup>

*Tabla 2. Sepsis y complicaciones*

<b>Sepsis</b>	<p>Es una afección potencialmente mortal que se produce cuando la respuesta del cuerpo a una infección ataca a sus propios tejidos y órganos</p> <p>Los pacientes con sospecha de infección que son propensos a tener una estancia prolongada en la UCI o morir en el hospital pueden ser rápidamente identificados en la cabecera con qSOFA, es decir, la alteración del estado mental, la presión arterial sistólica <math>\geq 100</math> mmHg, o la frecuencia respiratoria <math>\geq 22</math>/min</p>
<b>Disfunción orgánica</b>	<p>Puede ser identificada como un cambio agudo en la puntuación total SOFA <math>\geq 2</math> puntos como consecuencia de la infección</p> <p>La línea de base de la puntuación SOFA se puede suponer que es cero en pacientes que no se sabe que tienen disfunción de órganos preexistente.</p> <p>Una puntuación <math>\text{SOFA} \geq 2</math> refleja un riesgo de mortalidad global de aproximadamente 10% en la población hospitalaria general con sospecha de infección. Incluso los pacientes con disfunción moderada pueden deteriorarse aún más, haciendo hincapié en la gravedad de esta enfermedad y la necesidad de intervención rápida y adecuada, si no está ya siendo instituido</p>
<b>Shock séptico</b>	<p>Es un subconjunto de la sepsis en el que anomalías a nivel circulatorio, celular o metabólico son lo suficientemente profundas para aumentar sustancialmente la mortalidad</p> <p>Pacientes con shock séptico pueden ser identificados con un constructo clínico de sepsis con hipotensión persistente que requiere vasopresores para mantener MAP <math>\geq 65</math> mmHg y que tiene un nivel de lactato sérico <math>&gt; 2</math> mmol/L (18 mg/dl) a pesar de la reposición de volumen adecuado</p>

Con estos criterios, la mortalidad hospitalaria es de más de 40%

Abreviaturas: MAP, mean arterial pressure (presión arterial media); qSOFA, quick SOFA; SOFA: Sequential [Sepsis-related] Organ Failure Assessment (Evaluación secuencial de falla orgánica (relacionada con sepsis). Modificado de Mervyn Singer, MD ; Clinical Review & Education Special Communication ,2016.



La respuesta inflamatoria sistémica, ya sea o no acompañada de infección se propone que incluye diferentes fases. Para algunos autores la respuesta inmune en sepsis, se desarrolla en dos etapas, una pro y otra anti-inflamatoria, (Figura 4). En este modelo, se propone que durante la fase inicial de la sepsis prevalece la respuesta inflamatoria donde células endoteliales, epiteliales, neutrófilos, macrófagos y linfocitos secretan mediadores pro-inflamatorios como el TNF- $\alpha$  y citocinas (IL- 1 $\beta$ , 6 y 8). Posteriormente y, aparentemente, en respuesta a la fase inflamatoria como parte de los mecanismos de compensación, se desarrolla el Síndrome de Respuesta Anti-inflamatoria Compensatoria o CARS (por *Compensatory Anti-inflammatory Syndrome*), durante el cual se producen mediadores anti-inflamatorios como IL-10, IL-13 y TGF- $\beta$ , y también disminuye la expresión en macrófagos de moléculas del complejo principal de histocompatibilidad tipo II (o HLA-DR por *Human Leukocyte Antigen-DR*)<sup>31</sup>. Cabe mencionar que aunque todavía sin consenso, para algunos autores, una vez que coexisten los mediadores pro y anti-inflamatorios ocurre el llamado Síndrome de Respuesta de Antagonista Mezclada (o MARS por *Mixed Antagonist Response Syndrome*), que se diferenciaría de las fases SIRS y CARS porque se encuentran tanto mediadores pro como anti-inflamatorios en circulación.<sup>42</sup>

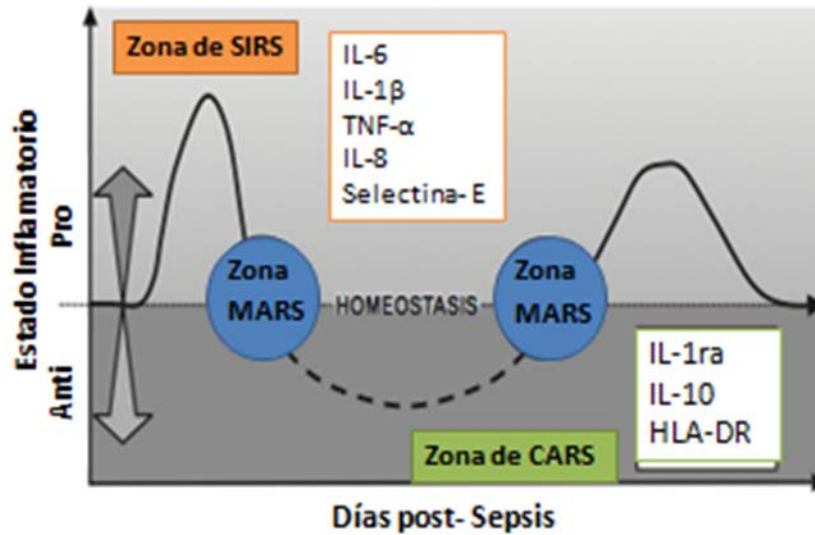


Figura 4. Evolución de la respuesta inflamatoria en sepsis. Durante la sepsis, hay un cambio inmediato y fuerte hacia un estado de hiper-inflamación (SIRS) definido por una liberación excesiva de las citocinas pro-inflamatorias en sangre. Tras el curso del tiempo SIRS disminuye gradualmente y cambia a un estado hipo-inflamatorio (CARS) que se caracteriza por una liberación de citocinas anti-inflamatorias. El período de transición temporal entre SIRS y CARS se define como MARS, que presenta tanto mediadores pro como anti-inflamatorios. (Modificado de Sepsis: Multiple abnormalities, heterogenous responses, and evolving understanding; Iskander; 2013)<sup>42</sup>

Sea CARS o MARS, el estado anti-inflamatorio prevaeciente puede resultar contraproducente para los pacientes. IL-10 es una citocina anti-inflamatoria que inhibe la síntesis de citocinas pro-inflamatorias por parte de los monocitos y disminuye la presentación de antígeno por medio de HLA-DR, como lo sugiere la correlación directa de los niveles séricos de IL-10 con la disminución en la expresión de HLA-DR en monocitos.<sup>43</sup> Además, se reportó que estos niveles elevados de IL-10 en sangre se relacionan con mayor riesgo a desarrollar falla orgánica múltiple en pacientes con choque séptico.<sup>37</sup> En general, se propone que la prevalencia del estado anti-inflamatorio condiciona a los pacientes a un estado de inmunosupresión transitoria, denominada por algunos como “parálisis inmune”<sup>44</sup> durante el cual los leucocitos serían incapaces de responder a PAMPs, lo que se propone da lugar a mayor susceptibilidad a infecciones por agentes oportunistas.

En este ambiente inflamatorio desregulado de SIRS/sepsis en los leucocitos circulantes se han reportado alteraciones tanto en número como en la expresión de diversas moléculas asociadas con activación. Además de la leucocitosis o leucopenia, definida como la disminución del número de leucocitos totales por debajo de 3,000 – 3,500 /mm<sup>3</sup><sup>45</sup>, y que junto con la bandemia (la cual representa incremento de las formas inmaduras de leucocitos en circulación), forman parte de los signos para el diagnóstico de SIRS/sepsis, se incrementan en los leucocitos de estos pacientes varias moléculas de activación.

El receptor TREM-1 (por *Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells-1*), una glicoproteína que se expresa en neutrófilos, monocitos y macrófagos, incrementa su expresión en presencia de bacterias extracelulares, y también *in vitro* en respuesta a 100ng/ml a 1mg/ml de LPS (aislado de *E. coli*). Cabe mencionar que el incremento de TREM-1 de membrana está asociado a procesos inflamatorios sistémicos tanto infecciosos como no infecciosos<sup>46</sup>. En nuestro grupo de trabajo hemos observado que el incremento en la expresión de TREM-1 y la disminución de HLA-DR en monocitos de sangre periférica se relacionan con mal pronóstico en pacientes con sepsis <sup>47</sup>.

### ***Inflamación crónica***

La inflamación crónica se considera de duración prolongada (semanas o meses), en la que se pueden observar, simultáneamente, signos de inflamación activa, de destrucción tisular y reparación. Aunque puede ser la evolución de un cuadro de inflamación aguda, con frecuencia la inflamación crónica se inicia como una respuesta solapada de baja intensidad, y a menudo asintomática<sup>27</sup>. La inflamación crónica se observa en infecciones persistentes producidas por ciertos microorganismos, exposición prolongada a agentes potencialmente tóxicos, exógenos y endógenos y autoinmunidad<sup>48</sup>.

La inflamación crónica se caracteriza por: Infiltración de células mononucleares, como macrófagos, linfocitos y células plasmáticas, que refleja reacción persistente a la lesión, destrucción tisular, reparación con proliferación de vasos de pequeño calibre (angiogénesis) y en especial con fibrosis<sup>49</sup>.

Es importante diferenciar la inflamación aguda de la inflamación crónica, lo cual se hace tomando en cuenta distintos criterios que se muestran a continuación:

*Tabla 3. Diferencias entre Inflamación aguda y crónica.*

<b>Aguda</b>	<b>Inflamación</b>	<b>Crónica</b>
Temprano	<b>Inicio</b>	Posterior
Minutos a días	<b>Duración</b>	Semanas a años
Neutrófilos	<b>Células implicadas</b>	Macrófagos
No	<b>Proliferación de vasos</b>	Si
No	<b>Induce cicatrización</b>	Si

Modificado de Okin, Evolution of Inflammatory Diseases, 2012.

Recientemente se describió a la obesidad como un tipo de inflamación sistémica, crónica y de bajo grado<sup>50</sup>.

### ***Obesidad e inflamación***

De acuerdo a la OMS, se define a la obesidad como una acumulación anormal o excesiva de grasa que puede ser perjudicial para la salud. El índice de masa corporal (IMC) es un indicador simple de la relación entre el peso y la talla que se utiliza frecuentemente para identificar el sobrepeso y la obesidad en adultos. Se calcula dividiendo el peso de una persona en kilos por el cuadrado de su talla en metros (kg/m<sup>2</sup>). Un IMC igual o superior a 30 determina obesidad<sup>51</sup>.

La obesidad es un problema muy importante a nivel mundial que ha aumentado rápidamente, alcanzando características de pandemia. En los últimos años se ha observado que los pacientes obesos presentan un estado inflamatorio crónico de bajo grado como una consecuencia del incremento en la masa del tejido adiposo, que lleva a un aumento en la producción de mediadores proinflamatorios que son conjuntamente

estimulados por señales de origen exógeno y/o endógeno<sup>52</sup>. El tejido adiposo contiene fibroblastos, preadipocitos, adipocitos y macrófagos; estos últimos contribuyen de manera importante al proceso inflamatorio sistémico con la producción de mediadores proinflamatorios. Así, existe una asociación íntima, altamente coordinada, entre las vías inflamatorias y las metabólicas; destaca la coincidencia en las funciones de los macrófagos y los adipocitos en la obesidad<sup>53</sup>.

El exceso de energía se almacena en los adipocitos, los cuales aumentan en tamaño y/o en número. Este desequilibrio es el resultado de la combinación de varios factores fisiológicos, metabólicos, y genéticos. Lo anterior se traduce en un incremento en el peso corporal, que es diferente para cada persona<sup>54</sup>.

Con la aparición de la obesidad se presentan alteraciones en la respuesta inmunitaria ya que se genera un proceso inflamatorio que suele ser crónico y de bajo grado, el cual también está presente con otras enfermedades degenerativas asociadas, tales como diabetes tipo 2 (DT2), hipertensión, dislipidemias, enfermedades cardíacas, etc.<sup>53</sup>. Esta condición crónica de inflamación se ha relacionado también con la generación de resistencia a la insulina.<sup>55</sup>

Para combatir infecciones, el organismo depende de su capacidad innata para reparar el daño y almacenar energía hasta que se requiera. Los sistemas metabólico e inmune son requerimientos básicos, íntimamente ligados, e interdependientes. Muchas hormonas, citocinas, proteínas de señalización, factores de transcripción y lípidos interaccionan tanto en el sistema inmune, como en el metabólico.<sup>56</sup> En este sentido, el soporte metabólico juega un papel muy importante, ya que puede modificar la capacidad inmunitaria del organismo para combatir infecciones en la respuesta inflamatoria. A su vez, la respuesta inflamatoria modifica el metabolismo del organismo, favoreciendo o suprimiendo algunas vías, como es el caso de la vía de señalización de la insulina. La combinación de la respuesta inmune con un balance metabólico adecuado es benéfica para el mantenimiento de la homeostasis. Sin embargo, puede volverse ineficiente bajo condiciones de alteración metabólica, como en la obesidad.<sup>57</sup> Existen evidencias que apoyan la asociación entre el metabolismo y la inmunidad; el mantener un peso saludable conduce a un equilibrio inmunitario; por el contrario, con la

desnutrición se favorece la inmunosupresión, mientras que en la obesidad se genera una inflamación crónica.<sup>56</sup>

### ***Respuesta inmune innata y obesidad***

Como ya se mencionó, la obesidad presenta un fenómeno de inflamación de bajo grado en el que participan una red de células y moléculas del sistema inmune innato, el más antiguo y conservado filogenéticamente.<sup>58</sup>

Los TLR juegan un papel importante en el reconocimiento específico de componentes microbianos de patógenos, entre ellos bacterias, hongos, virus y protozoarios. El receptor tipo Toll-2 (TLR-2) reconoce lipopéptidos y lipoproteínas de bacterias Gram-positivas, así como LPS de algunas no-enterobacterias como *Helicobacter pylori*. Cabe mencionar que el TLR-2 puede formar dímeros heterofílicos con otros TLRs, como TLR6/TLR2, que reconoce lipopéptidos diacilados, y TLR1/TLR2 que reconoce lipopéptidos triacilados, ampliando de esta manera su espectro de reconocimiento antigénico<sup>59</sup>.

Los TLRs activan rutas de señalización comunes que culminan con la translocación del factor de transcripción nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B), el cual es una proteína clave en la cascada inflamatoria.<sup>59</sup> El proceso inflamatorio es promovido entonces por los TLRs a través de la producción de citocinas como el factor de necrosis tumoral tipo alfa (TNF- $\alpha$ ), interleucina-6 (IL-6), e interleucina-1 beta (IL1- $\beta$ ). Aunque los TLRs se expresan en su mayoría en células del linaje hematopoyético, un creciente número de estudios reporta su expresión en otros tipos celulares, como el tejido adiposo, y en particular, en los adipocitos.<sup>60</sup>

En pacientes con obesidad y DT2, la activación de citocinas proinflamatorias correlaciona estrechamente con el NF $\kappa$ B. Los adipocitos secretan adiponectina, cuyas propiedades antiinflamatorias son ejecutadas a través de su acción sobre el NF- $\kappa$ B y, por otro lado, los niveles de adiponectina correlacionan de manera inversa en pacientes con obesidad y DT2.<sup>61</sup> En un trabajo se observó que, en modelos murinos de obesidad inducida con una dieta alta en grasas, hay sobreexpresión del inhibidor de la cinasa kappa-B (IKK $\beta$ ) de NF- $\kappa$ B en TA, lo que resulta en una elevada producción de citocinas inflamatorias y en el desarrollo de diabetes.<sup>61</sup> En contraste, los hepatocitos de ratones

knockout (KO) para IKK $\beta$  muestran una disminución de citocinas proinflamatorias, por lo que estos ratones no desarrollan resistencia hepática a la insulina y a la glucosa como los ratones con obesidad inducida mediante una dieta alta en grasas.<sup>62</sup>

El origen de los estímulos que persisten durante la inflamación de bajo grado presente en la obesidad no es del todo conocido. Sin embargo, se sabe que la obesidad, la DT2 y el síndrome metabólico se caracterizan por un aumento sistémico en los niveles de ácidos grasos. En otro trabajo se encontró que en cultivo de tejido adiposo humano, la expresión de TLR-2/TL-R4 es inducida mediante la estimulación con LPS y Pam3SCK4 (agonista de TLR), lo cual activa la translocación nuclear de NF- $\kappa$ B y la síntesis de citocinas proinflamatorias. Así, los depósitos de grasa contribuyen de manera importante a mantener un estado inflamatorio crónico mediante la síntesis y elaboración de citocinas a través de los TLRs.

En la obesidad, la respuesta antiinflamatoria puede ser insuficiente para contrarrestar la actividad inflamatoria, ya que en esta patología el estado de inflamación es crónico, aunque de bajo grado. Así, mientras que en una primera fase predominan los mediadores de efecto proinflamatorio, en fases posteriores predominan mediadores antiinflamatorios. Es decir, la acción de las citocinas depende del momento de su liberación, del lugar en el que actúan, de la presencia de otros elementos competitivos o sinérgicos, de la densidad de sus receptores y de la capacidad de respuesta de ese tejido a cada citocina<sup>63</sup>.

Los adipocitos estimulados por señales de origen infeccioso o inflamatorio secretan proteínas de fase aguda y mediadores de inflamación. Entre los factores de inflamación expresados en los adipocitos se incluyen TNF- $\alpha$ , IL-6, inhibidor del activador del plasminógeno (PAI-1), proteína quimioatrayente de monocitos-1 (MCP1), IL-1 $\beta$ , IL-8, 10, 15, factor inhibidor de leucemia (LIF), factor de crecimiento del hepatocito (HGF), apolipoproteína A3 (SAA3), factor inhibitorio de la migración de macrófagos (MIMF), moduladores inflamatorios potentes como leptina, adiponectina y resistina, así como la CRP.<sup>63, 64</sup>

La asociación entre obesidad e inflamación se confirma con el hecho de que después de un “bypass” gástrico en pacientes con obesidad mórbida, la reducción de peso

observada en estos pacientes se asocia con una disminución en los niveles de CRP e IL-6. Asimismo, en estos pacientes se observa una mejora en la sensibilidad a la insulina.<sup>65</sup>

Las citocinas sintetizadas en el tejido adiposo, llamadas adipocinas, intervienen en la inflamación y sus niveles se encuentran modificados en la obesidad. Por consiguiente, la obesidad podría favorecer o alterar la evolución de los procesos inflamatorios. La respuesta inflamatoria en la obesidad es de bajo grado y progresa muy lentamente, por lo que incrementa el riesgo de dañar múltiples sistemas, incluyendo a aquellos involucrados en la homeostasis de la glucosa<sup>66</sup>.

El tejido adiposo, además de adipocitos, contiene fibroblastos, preadipocitos y macrófagos, los cuales también residen en este tejido. Los macrófagos son contribuyentes importantes en el proceso inflamatorio sistémico general. Estos han sido implicados, también, en el desarrollo y mantenimiento de la inflamación inducida por la obesidad y contribuyen con la secreción de muchas moléculas proinflamatorias secretadas en el tejido adiposo. Existe una asociación íntima, altamente coordinada, entre las vías inflamatorias y las metabólicas, destacando la coincidencia entre la función de los macrófagos y los adipocitos en la obesidad.<sup>57</sup> Además, bajo ciertas circunstancias (situaciones inflamatorias), los preadipocitos pueden presentar propiedades fagocíticas y antimicrobianas, con la capacidad de diferenciarse en macrófagos en un medio ambiente propicio, lo que sugiere un papel inmunológico potencial de estos preadipocitos.<sup>57</sup> También se ha podido documentar que los macrófagos y los adipocitos aumentan su interacción durante la obesidad. Lo anterior se relaciona con la génesis de la obesidad y la fuerte relación que tiene con los procesos inflamatorios, mismos que ocurren de forma simultánea en el tejido adiposo y en los macrófagos para promover resistencia a la insulina<sup>53</sup>.

### ***Mecanismos de señalización implicados en la inflamación y la obesidad***

Parece posible que la respuesta inflamatoria se inicie en los adipocitos, que es el primer tipo celular involucrado en la obesidad, y posteriormente haya un reclutamiento de macrófagos, con lo que se agrava el estado inflamatorio. Un mecanismo, al parecer de suma importancia, se refiere a la activación de las vías inflamatorias debidas a estrés



en el retículo endoplásmico. La obesidad genera condiciones que incrementan la demanda en el retículo endoplásmico y sobrecargan su capacidad funcional.<sup>67</sup> Esto es particularmente importante en el caso del TA, el cual experimenta cambios severos en su arquitectura, incrementando la síntesis de proteínas y de lípidos, perturbando los nutrientes intracelulares y el flujo de energía.

Un segundo mecanismo que puede ser relevante al inicio de la inflamación en la obesidad es el estrés oxidativo. El incremento en la captura de glucosa por las células endoteliales del tejido adiposo en condiciones de hiperglucemia causa un exceso de especies reactivas de oxígeno en las mitocondrias, lo cual condiciona daño oxidativo y activa señales de inflamación dentro de la célula endotelial.<sup>68</sup> El daño endotelial mencionado causa quimiotaxis de macrófagos y exagera aún más la inflamación local. La hiperglucemia también estimula la generación de especies reactivas de oxígeno en los adipocitos, con lo cual se incrementa la producción de citocinas proinflamatorias.<sup>69</sup>

El mecanismo propuesto es el siguiente: al aumentar la ingesta de energía, la síntesis de lípidos se hace más grande y, por consiguiente, se da mayor acumulación de grasa en los adipocitos y aumenta el número de estas células; esto trae como consecuencia la falta de oxígeno en los adipocitos más lejanos a la zona de vascularización, lo que conduce a un estrés en el retículo endoplásmico por falta de oxígeno, llamado estrés hipóxico. Este estrés genera radicales libres y daño oxidativo, el cual culminará con muerte celular por necrosis. El proceso trae consigo mecanismos de alerta de daño, entre los que destaca la secreción de citocinas proinflamatorias por los adipocitos vecinos y por los macrófagos reclutados en respuesta a la señal de alerta, estableciendo con ello el perfil inflamatorio típico de la obesidad<sup>70</sup>.

### ***Fagocitosis en respuesta inflamatoria***

Las respuestas inmunitarias deficientes son el resultado de alteraciones de la inmunidad específica o de la inmunidad innata. Esta última está mediada principalmente por los fagocitos y el complemento que constituyen la primera línea de defensa frente a organismos infecciosos, aunque también participan activamente en las fases efectoras de la inmunidad específica<sup>71</sup>.

Las alteraciones fagocíticas representan un punto importante en la disfunción del sistema inmune. Para que el fenómeno ocurra es conveniente que los antígenos se encuentren opsonizados; por lo tanto, la reducción en las concentraciones de estos pueden significar un impedimento para que la fagocitosis se cumple exitosamente. Empleando técnicas específicas como citometría de flujo, se puede evidenciar una baja en la actividad fagocítica en el periodo inmediato que sigue a la instalación de la infección pero únicamente contra algunas bacterias en particular. Luego de la sepsis, cada uno de los componentes que participan en los mecanismos que terminan en la lisis bacteriana resultan afectados de manera diversa, tales alteraciones podrían formar parte de la disfunción en el metabolismo energético celular. Estas alteraciones se ven favorecidas por la imposibilidad de fagocitar debidamente en función de los cambios en los mecanismos de opsonización y, esencialmente, la muerte intracelular se encuentra disminuida por la alteración del metabolismo celular del oxígeno<sup>72</sup>.

En la obesidad humana y animal las concentraciones de leptina plasmáticas están aumentadas en relación con el grado de adiposidad e hiperinsulinemia, disminuyendo o aumentando según varíen los depósitos grasos. Otras importantes acciones fisiológicas de la leptina descritas hasta el momento son la estimulación inmunológica por medio de la modulación de la fagocitosis y producción de citocinas desde los macrófagos, estimulación de la hematopoyesis y de la angiogénesis<sup>73</sup>.

### **Planteamiento del Problema**

En pacientes con inflamación sistémica no se resuelven de manera correcta los procesos infecciosos, aunque se sabe que tienen menores capacidades de eliminación. En el papel de la fagocitosis no está claro si existen diferencias en el grado de compromiso de la función fagocítica y/o el mecanismo involucrado entre los procesos de inflamación aguda y crónica.

### **Justificación**

Una de las principales causas de morbi-mortalidad en las unidades de cuidados intensivos de todo el mundo se relaciona con las infecciones agregadas en pacientes

con SIRS o sepsis. Entre los factores de riesgo para este tipo de complicaciones se encuentran enfermedades crónicas degenerativas como diabetes, cardiopatías, enfermedad pulmonar obstructiva y obesidad. Se propone que el estado subyacente inflamatorio puede redireccionar los procesos de migración celular, estallido respiratorio y fagocitosis en estos pacientes, lo que explicaría esta predisposición a infecciones.

### **Hipótesis**

En pacientes con inflamación sistémica, tanto aguda como crónica habrá menor capacidad endofagocítica respecto a sujetos sanos, afectándose de igual manera a la población de neutrófilos y monocitos.

### **Objetivo General**

Evaluar el número y la capacidad fagocítica en células mieloides circulantes de pacientes con inflamación sistémica aguda y crónica.

### **Objetivos Particulares**

- Cuantificar leucocitos en sujetos sanos, con sepsis o con obesidad.
- Determinar el porcentaje de neutrófilos y monocitos pH Green+ en sujetos sanos, con sepsis o con obesidad.
- Determinar la capacidad endofagocítica de células mieloides obtenidas de sangre periférica de sujetos sanos, con sepsis o con obesidad.
- Establecer la correlación entre la capacidad endofagocítica, el número y tipo de células mieloides circulantes de sujetos sanos, con sepsis o con obesidad.

## **Materiales y Métodos**

### *Selección de pacientes*

En el Hospital de Especialidades de CMN “Siglo XXI”, se verificó, de acuerdo al diagnóstico de sepsis u obesidad el cumplimiento de los criterios de inclusión. Se obtuvo la firma de consentimiento informado (Anexo 1) de acuerdo a lo establecido en el protocolo con registro: R-2013-3601-229.

### *Obtención de muestra sanguínea*

Previo obtención del consentimiento informado (Anexo 1) de pacientes con sepsis, obesidad, o sanos, se colectaron mediante punción de vena braquial, tres mL de sangre periférica en tubos con heparina de litio como anticoagulante. Se cuantificaron los leucocitos totales mediante biometría hemática.

### *Preparación de pHrodo Bioparticles*

Se reconstituyó el vial que contiene bacteria liofilizada (pHrodo Bioparticles en su versión pH Green) con 2.2mL de Buffer B (component B), y alicuotó en tubos ependorf (50µL) en alícuotas de trabajo. Se almacenó a -20°C evitando ciclos de congelación-descongelación. Se descongeló para realizar el ensayo, vortexeó por 1 minuto y mantuvo en hielo aproximadamente 10 minutos antes de usarse.

Las muestras se colocaron en hielo por 10 minutos antes de realizar el ensayo, para inducir a las células a entrar en un estado de reposo para la internalización bacteriana.

A cuatro tubos de citometría, dos controles positivos (4°C y 37°C con 10µL de *E. coli* pHGreen) y dos controles negativos (4°C y 37°C sin *E. coli* pHGreen), se adicionaron 50µL de sangre total.

Se colocó un control positivo y un control negativo en hielo, y un control positivo y un control negativo a 37°C por 15 minutos. Para cada experimento, después de 15 minutos de incubación, se colocaron los tubos en hielo. Se adicionaron 50µL de “Lysis Buffer A” (Component A) a todos los tubos; se vortexeó brevemente e incubó a temperatura ambiente por 5 minutos. Se adicionaron 500µL de Buffer B a las muestras, se vortexeó brevemente, e incubó a temperatura ambiente por 5 minutos, centrifugó 350xg por 5

minutos a temperatura ambiente. Se decantó el sobrenadante y resuspendió el botón celular en 500µL de buffer de lavado (Component C). Se repitió la centrifugación, decantó el sobrenadante y resuspendió en el volumen remanente.

Se adicionó el mix de anticuerpos. Incubó 30-45 min a 4°C en oscuridad. Se adicionó 1mL de PBS, centrifugó 350xg por 5 minutos, decantó y adquirieron las muestras en el citómetro de flujo (FACS Aria IIu, Becton Dickinson; San Francisco, CA)

*Identificación de leucocitos.*

Mediante inmunofenotipificación analizada por citometría de flujo, se identificaron las poblaciones de monocitos y neutrófilos que internalizaron y/o destruyeron bacteria mediante el uso de anticuerpos monoclonales. (Tabla 4)

*Tabla 4. Anticuerpos utilizados para identificación de leucocitos mieloides circulantes.*

**Mezcla de anticuerpos**

<b>Anticuerpo</b>	<b>Fluorocromo</b>	<b>Marca</b>	<b>Volumen (µL)</b>	<b>Catalogo</b>	<b>Clona</b>
<b>CD45</b>	Pacific Orange	Invitrogen	2.0	MHCD4530	HI30
<b>CD14</b>	PE-Cy7	Biologend	1.0	301814	M5E2
<b>CD16</b>	APC-Cy7	Biologend	1.0	302018	3G8

El volumen de anticuerpos corresponde a 50µL de sangre total/ 250000 leucocitos.

Se realizó el análisis multiparamétrico de las poblaciones leucocitarias empleando el programa de análisis Infinicyt versión 1.5. (Cytognos, Euroflow, España) de acuerdo al algoritmo de análisis ilustrado en la figura 5.

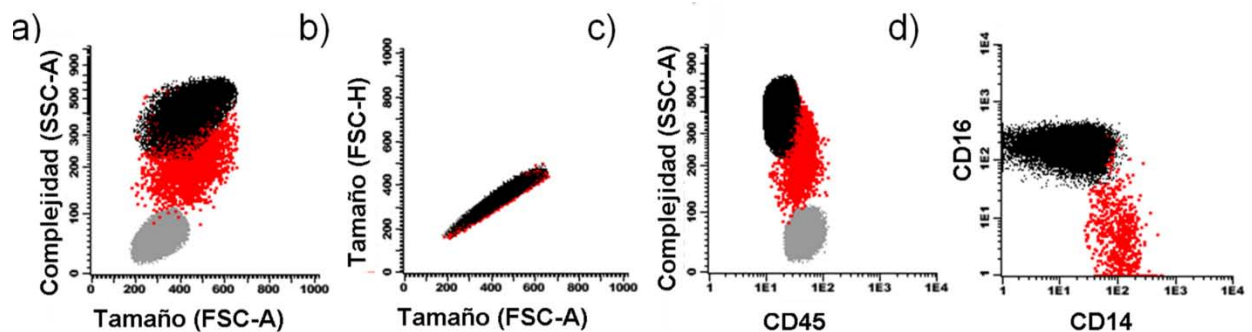


Figura 5. Algoritmo para la Identificación de células mieloides. Mediante citometría de flujo se evidencian: a) leucocitos totales de acuerdo a tamaño (FSC) y complejidad (SSC); que sean b) eventos sencillos (FSC-H vs FSC-A); c) CD45+ leucocitos y d) CD14+ (monocitos) o CD16+ (neutrófilos).

Se identificaron las poblaciones leucocitarias con el algoritmo de identificación (Figura 5); el cual consta de 4 graficas o “plots”: FSC-tamaño(FSC-A) vs SSC-complejidad (SSC-A), que permite seleccionar a los eventos con tamaño y complejidad de células viables; el grafico de FSC-tamaño área (FSC-A) vs FSC-tamaño altura (FSC-H), que permite distinguir que se trate de los eventos o células que fueron analizadas individualmente (singuletes) por el citómetro de flujo; el grafico de SSC-complejidad (SSC-A) vs expresión de CD45, que permite discriminar a los leucocitos de eritrocitos remanentes, así como para la identificación de leucocitos de acuerdo a la expresión diferencial de CD45 (linfocitos, monocitos y neutrófilos, ordenados de mayor a menor índice de expresión); finalmente, el gráfico de expresión de CD16 vs expresión de CD14, que permite visualizar claramente las células CD16+ y CD14+ correspondientes a granulocitos y monocitos respectivamente. Cabe mencionar que cada uno de los gráficos se visualizó al mismo tiempo y se les asignó el mismo valor para la toma de decisiones, por lo que la identificación de leucocitos, se basó en los 7 parámetros simultáneamente.

### *Evaluación de endofagocitosis*

Se evaluó la capacidad endofagocítica de monocitos y neutrófilos circulantes usando el pHrodoBioparticlesPhagocytosis Kit en su versión pH Green y mediante el kit pHRodo (Life technologies,inc) se identificaron las células endocíticas así como su capacidad de eliminación bacteriana.

El pHrodo BioParticles (pH Green) son E. coli inactivadas no opsonizadas, que son partículas altamente sensibles, fluorescentes para la detección de la ingestión fagocítica. Mide la actividad fagocítica basado en la acidificación de partículas a medida que se ingieren. Para lograr esto, las partículas se conjugan al colorante pH Green, reactivo fluorescente que aumenta dramáticamente en la fluorescencia mientras el pH de su entorno se vuelve más ácido (Figura 6)

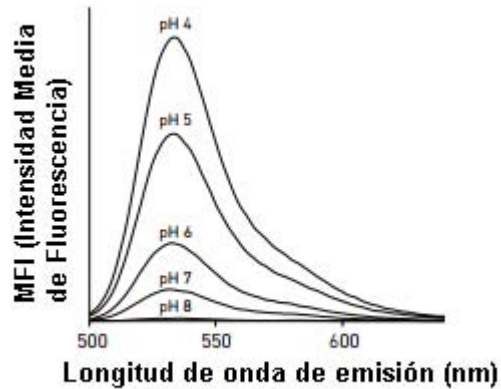


Figura 6. Espectro de emisión de fluorescencia de la molécula pHrodo™ Green BioParticles®.

## Resultados

Se realizó la recolección de muestras de un total de 5 pacientes con sepsis y 5 pacientes con obesidad grado III. El grupo de voluntarios sanos corresponde a 5 sujetos. Las características demográficas y clínicas de cada grupo analizado se muestran en la tabla 5.

Tabla 5. Características demográficas y clínicas de los sujetos de estudio.

	Pacientes con sepsis (n=5)	Pacientes con obesidad (n=5)	Valores de referencia
<b>Edad</b>	41±12	40.8±3	NA
<b>Género (F:M)</b>	3:2	1:4	NA
<b>FC (latidos/min)</b>	92±20	ND	60-90
<b>FR</b> (respiraciones/min)	22±4	ND	12-20
<b>Temperatura (°C)</b>	37.6±1.2	ND	36-37.5
<b>Peso</b>	ND	147.2±27.3	NA
<b>Talla</b>	ND	1.73±0.1	NA
<b>IMC</b>	ND	48.9±6.5	18.5-24.9
<b>Leucocitos circulantes (10<sup>3</sup>/μL)</b>	14.6±4.6	8.29±1.4	4.5-11.0

FC: Frecuencia cardiaca, FR: Frecuencia respiratoria, IMC: índice de masa corporal, ND: No determinado, NA: No aplica.

En la figura 7 se observan los número absolutos de los principales leucocitos circulantes. En los pacientes con sepsis, encontramos una disminución significativa del número de linfocitos comparados con los pacientes con obesidad (810.7±7 vs 2260±4; p<0.005); aunque no se alcanzaron diferencias estadísticamente significativas, también tienden a ser menores los valores de linfocitos de pacientes con sepsis respecto a sujetos sanos (810.7±7 vs 1584±5). El número de monocitos fue muy similar en los tres grupos analizados (sanos 254.3±1; sepsis 342.7±2 y obesidad 420±1). En pacientes con sepsis hay granulocitosis (sepsis 10965±5 vs sanos 5163±1; p<0.05). La disminución de granulocitos es pacientes con sepsis fue todavía mayor respecto a sujetos con obesidad (p<0.005).



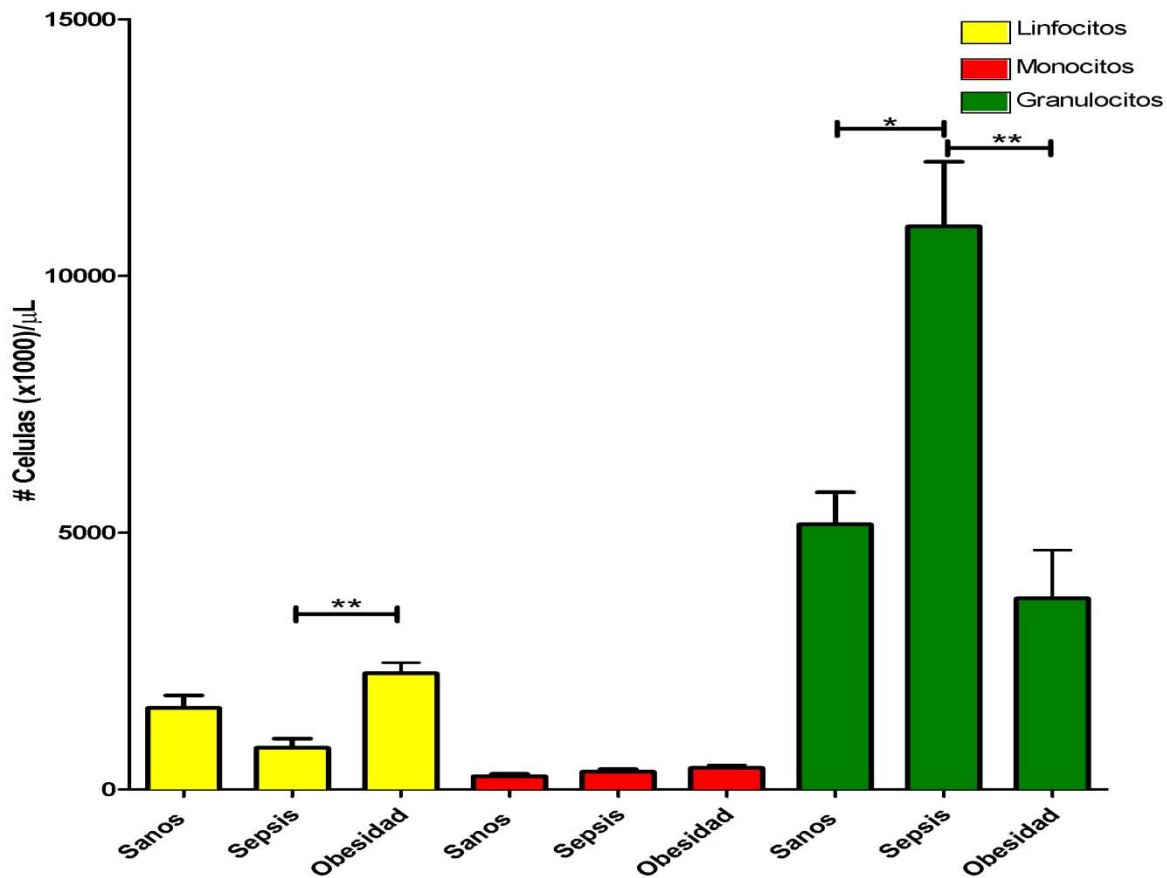


Figura 7. Los pacientes con sepsis presentan granulocitosis ( $>6.35 \times 10^6$  cel/mL). Se muestra el número absoluto de linfocitos (■), monocitos (■) y granulocitos (■) circulantes en sujetos sanos, pacientes con sepsis o con obesidad. Kruskal-Wallis, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.005$ .

Una vez identificados los leucocitos, se procedió a la determinación de la frecuencia de células mieloides capaces de internalizar bacterias, utilizando para ello el marcador pHGreen. Como se observa en la figura 8, no existe diferencia significativa en las frecuencias de neutrófilos pHGreen+ (sanos  $73 \pm 16\%$ , pacientes con sepsis  $80 \pm 21\%$  y pacientes con obesidad  $86 \pm 10\%$ ,  $p = 0.3104$ ) y monocitos pH Green+ entre los grupos de estudio (sanos  $69 \pm 17\%$ , pacientes con sepsis  $77 \pm 14\%$  y pacientes con obesidad  $82 \pm 6\%$ ,  $p > 0.05$ ).

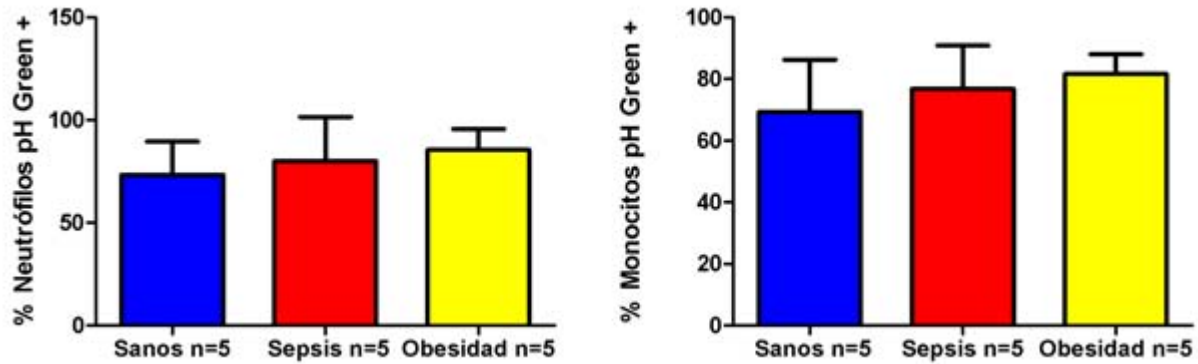


Figura 8. Los neutrófilos y monocitos de pacientes con inflamación sistémica aguda y crónica conservan su capacidad de internalización. Las frecuencias de neutrófilos y monocitos circulantes pH Green+ son las mismas entre sujetos sanos y con inflamación aguda o crónica. Kruskal-Wallis,  $p= 0.3104$ .

Además de la internalización, el proceso de fagocitosis incluye la eliminación bacteriana, lo que se evaluó al determinar el incremento en la intensidad media de fluorescencia (Fold Increase MIF) del control a 37°C comparado con la autofluorescencia (AF) para pH Green, que se da por el cambio de pH. Se evidenció la disminución significativa en la capacidad de eliminación bacteriana de los neutrófilos de los pacientes tanto con inflamación sistémica aguda (sepsis) como crónica (obesidad) (sanos  $42\pm 11$  vs sepsis  $19\pm 5$  vs pacientes con obesidad  $19\pm 4$  MIF pH Green,  $p < 0.05$ ). Para el caso de los monocitos solo se observa una disminución significativa en la capacidad de eliminación bacteriana en pacientes con inflamación sistémica aguda (sepsis), aunque la tendencia es a también disminuir en los sujetos obesos (sanos  $33\pm 9$  vs sepsis  $20\pm 4$ ,  $p < 0.05$ ; vs obesidad  $20\pm 1$ ,  $p > 0.05$ ) (Figura 9).

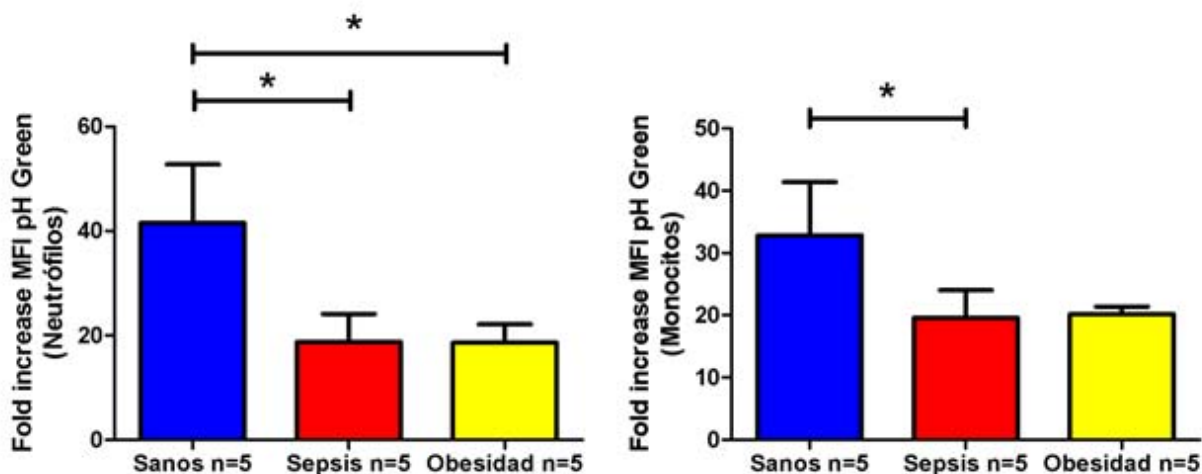


Figura 9. En pacientes con inflamación sistémica, aguda y crónica, disminuye la capacidad de eliminación bacteriana de células mieloides circulantes. Al evaluar las veces que se incrementó la intensidad media de fluorescencia (MFI) del marcador de pH Green, se pudo evidenciar que es significativamente menor el incremento en neutrófilos de sujetos con inflamación sepsis y obesos respecto a sujetos sanos. En monocitos disminuye la también esta capacidad de eliminación bacteriana, significativamente en pacientes con sepsis y con tendencia en pacientes con obesidad. Kruskal-Wallis, \*P<0.05.

Al calcular el índice de fagocitosis, que relaciona que tanto se modifica el incremento en la MFI pH Green respecto a la frecuencia de las células positivas a este marcador, fue todavía más evidente que , en comparación con sujetos sanos, en neutrófilos (sanos  $41 \pm 5$ , pacientes con sepsis  $11 \pm 10$  y pacientes con obesidad  $28 \pm 3$ ) y monocitos (sanos  $31 \pm 7$ , pacientes con sepsis  $9 \pm 8$  y pacientes con obesidad  $25 \pm 4$ ), de sujetos con sepsis es significativamente menor la capacidad de eliminación por célula ( $p < 0.005$ ); en cambio para sujetos con obesidad, tanto en neutrófilos como en monocitos, tiende a disminuir , aunque no es estadísticamente significativo (Figura 10).

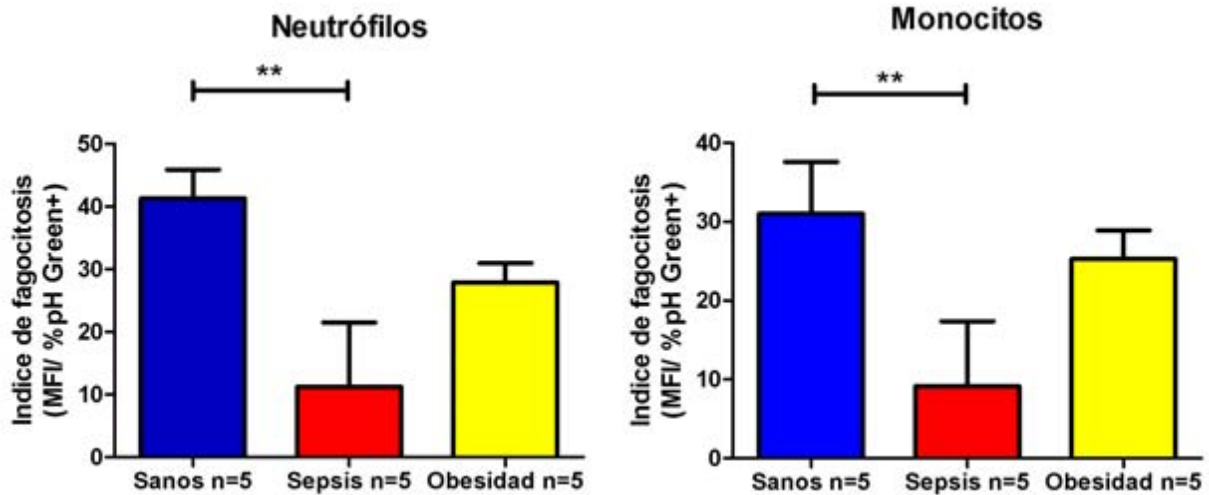


Figura 10. Neutrófilos y monocitos de pacientes con sepsis presentan menor índice fagocítico. Se muestra el índice fagocítico, que es la media de fluorescencia para pH Green entre el porcentaje de células pH Green+, para sujetos sanos, pacientes con sepsis y pacientes con obesidad. Kruskal-Wallis, \*\*P<0.005

La disminución de la capacidad de eliminación bacteriana, puede estar asociada a una disminución en la expresión de moléculas como CD16, que corresponde al receptor de baja afinidad (o FcγRIII) para la fracción cristalizable de los anticuerpos IgG. Encontramos que la expresión de este CD16 no es significativamente diferente respecto a los sujetos sanos, ni en neutrófilos (sanos  $2611 \pm 9$  vs pacientes con sepsis  $1031 \pm 9$  vs pacientes con obesidad  $3436 \pm 1$ ), ni en monocitos (sanos  $=338 \pm 2$  vs pacientes con sepsis  $=226 \pm 2$  vs pacientes con obesidad  $=522 \pm 3$ ). Sin embargo, entre los pacientes, encontramos una disminución significativa en la expresión de CD16 en los neutrófilos de los sujetos con sepsis en comparación con los obesos ( $P= 0.0140$ ) (Figura 11).

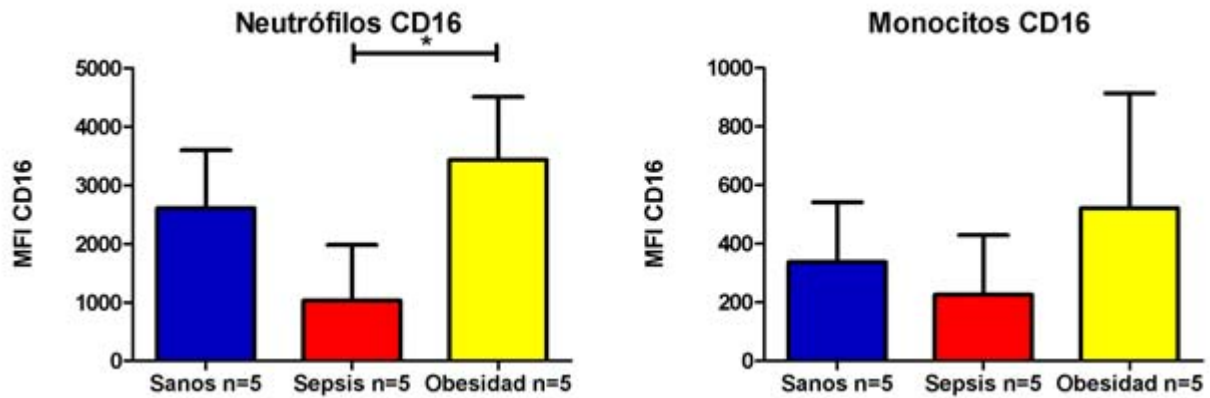


Figura 11. La expresión de CD16 en neutrófilos de pacientes con sepsis es menor comparada con la expresión en pacientes con obesidad. Se muestra la intensidad media de fluorescencia de CD16 para sujetos sanos, pacientes con sepsis y pacientes con obesidad. Kruskal-Wallis,  $p=0.0140$ .

Dado que encontramos que la capacidad de eliminación de la bacteria y la expresión de CD16 es diferente entre sujetos con sepsis y obesidad, decidimos verificar si existía correlación entre la expresión de CD16 y la capacidad de eliminación de bacterias en los neutrófilos (que fue la población celular en la que obtuvimos diferencias significativas, más que en monocitos), aplicando la prueba estadística de correlación bivariada rho de Spearman (Figura 12 a y b). No encontramos diferencia significativa en la correlación de la expresión de CD16 y capacidad fagocítica ni en sujetos sanos ni en pacientes con inflamación sistémica; sin embargo en pacientes con sepsis se observa una clara tendencia que indica que a mayor expresión de CD16, aumenta la capacidad fagocítica. Ahora bien, si se analizan todos los grupos en una sola grafica (Figura 12c) se observa que hay diferencia significativa con correlación positiva; lo que nos indica que a menor expresión de CD16 habría menor capacidad de eliminación bacteriana.

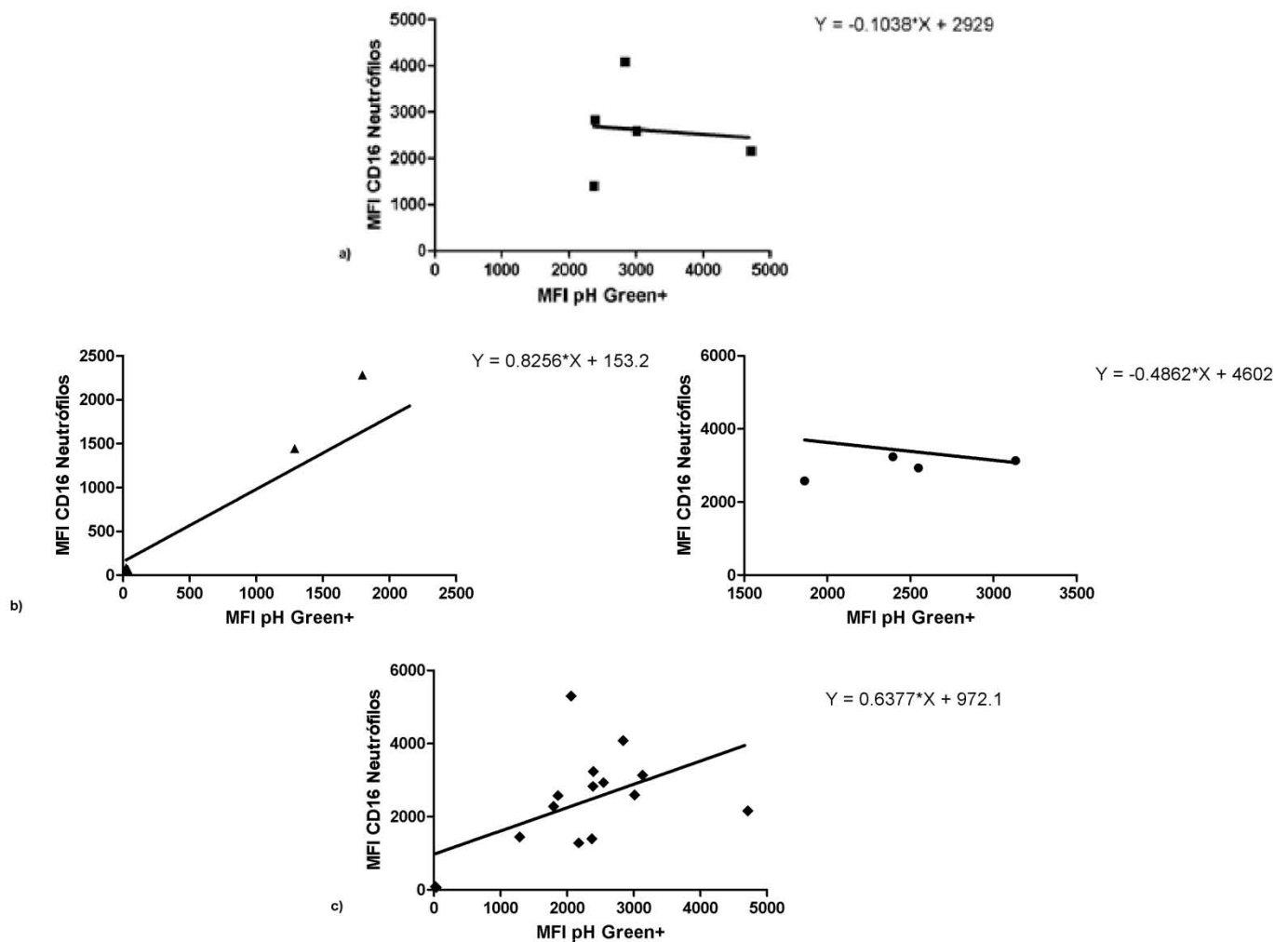


Figura 12. La expresión de CD16 incrementa la capacidad fagocítica. Con los valores de expresión de CD16 (evaluado por la intensidad media de fluorescencia-MFI) y la intensidad media de fluorescencia de pH Green en neutrófilos, se realizó la prueba Rho de Spearman en: a) sujetos sanos (■), b) pacientes con sepsis (▲) y pacientes con obesidad (●) y c) todos los sujetos del estudio (◆) (n=15). NS: no significativo, (correlación positiva,  $\rho = 0.5500$  y  $P = 0.0337$ ).

## Discusión

Como se esperaba, al formar parte de los datos cardinales para el diagnóstico de SIRS, solo en los pacientes con sepsis, los valores de frecuencia cardíaca, respiratoria y temperatura se encuentran por encima de los valores de referencia<sup>38</sup>. En esos casos también se realiza un examen de sangre en busca de un número anormal de leucocitos,

un signo común en sepsis<sup>30</sup> coincidiendo con los números elevados de leucocitos circulantes presentes en nuestros pacientes (Tabla 5).

Los pacientes con obesidad se clasifican en diferentes grados de acuerdo al IMC; un IMC entre 25 y 29.9 es considerado sobrepeso y cualquier valor sobre 30 es obesidad.<sup>74</sup> La OMS clasifica la obesidad de la siguiente manera: un IMC de 30-34.9 es obesidad clase I, de 35-39.9 es obesidad clase II y de 40 o mayor es obesidad clase III, grave (o mórbida)<sup>51</sup>, por lo que de acuerdo al promedio de IMC obtenido en los pacientes incluidos, estos corresponden a obesidad grado III.

Observamos que los sujetos control (sanos) presentan números normales de leucocitos en circulación (de acuerdo a las cifras de referencia  $4.0-11.0 \times 10^3$  cel/ $\mu$ L)<sup>75,76</sup>. En comparación con estos sujetos sanos, así como aquellos con obesidad, los sujetos con sepsis presentan granulocitosis (mayor a  $6.35 \times 10^3$  cel/ $\mu$ L). Interesantemente, aunque no con diferencias significativas con los sujetos sanos, los sujetos con sepsis presentan significativamente menor cantidad de linfocitos en circulación respecto a sujetos con obesidad (Figura 7). Estos resultados coinciden con reportes existentes de cuentas linfocitarias menores a 1340 cel/mL (valores de referencia: 1300-4000 cel/ml) en pacientes con sepsis abdominal<sup>77</sup> lo que se debe a que en infecciones graves los leucocitos, en especial los linfocitos disminuyen en circulación al combatir dicha infección. Esta disminución se puede deber al incremento de células reclutadas hacia los tejidos, como en obesidad, donde al examinar el tejido adiposo de pacientes con obesidad se ha encontrado que está lleno de células mononucleares<sup>29</sup>; o bien, al incrementarse las tasas de apoptosis de linfocitos<sup>78</sup>, lo cual se propone que contribuye directamente con el estado de inmunosupresión que en sepsis se asocia con incrementos en IL-10 y tasas de mortalidad elevadas en modelos murinos<sup>79</sup>.

La capacidad de internalización, como ya se mencionó, la evaluamos con el porcentaje de células mieloides pH Green+ (Figura 8), sin observar diferencias significativas entre ninguno de los tres grupos de estudio. Dado que pH Green es el marcador que identifica a la bacteria; esta determinación se realizó a 37°C contra un control positivo a 4°C, que descarta la posibilidad de que la bacteria se esté uniendo inespecíficamente a la membrana celular ya que los porcentajes de células pH Green+ en este control no

van más allá del 10% debido a que la temperatura tan baja inhibe el movimiento del citoesqueleto abatiendo casi por completo la internalización de la bacteria. Esto nos llevó a desarrollar la pregunta sobre si la capacidad fagocítica aumenta o disminuye en proceso de inflamación sistémica ya que existen reportes contradictorios algunos estableciendo que la capacidad fagocítica disminuye<sup>80</sup>, mientras que otros establecen que se conserva<sup>81</sup>.

Al no observar un cambio en la capacidad de internalización, se evaluó la capacidad de eliminación mediante el cambio en la intensidad media de fluorescencia del control positivo a 37°C con respecto a la autofluorescencia tanto para neutrófilos como para monocitos de los tres grupos de estudio (Figura 9). El fluorocromo acoplado a la bacteria permite medir la fagocitosis basándose en la acidificación de partículas a medida que se ingieren, este reactivo aumenta su fluorescencia mientras el pH de su entorno se vuelve más ácido (Figura 6), el cual en este caso correspondería a la acidificación del fagolisosoma dentro del cual se lleva a cabo la destrucción del microorganismo. Observamos que es menor el incremento de fluorescencia de pH Green en neutrófilos y monocitos de pacientes con inflamación sistémica aguda lo cual coincidiría con reportes previos que establecen que en sepsis esta disminución se puede asociar con mayor prevalencia de neutrófilos inmaduros<sup>82</sup>, o bien envejecimiento de las células, primordialmente polimorfonucleares, como se observa en modelos de sepsis en ratones de edad avanzada, donde, aunque no se modifiquen las frecuencias de células mieloides, sí disminuyen estas capacidades de eliminación bacteriana<sup>83</sup>. Estos resultados coinciden con lo reportado por Danikas, de actividad fagocítica disminuida de neutrófilos durante las primeras 24 horas posteriores a la admisión de pacientes con sepsis era de mal pronóstico<sup>80</sup>. Esta reducción en la actividad fagocítica de los neutrófilos puede representar un estado de inactivación de neutrófilos similar a la descrita para los monocitos durante la respuesta antiinflamatoria compensatoria.<sup>42</sup>

En el caso de obesidad, neutrófilos de pacientes con inflamación sistémica crónica disminuye la capacidad de eliminación bacteriana si lo que se evalúa es el incremento de la MFI, pero cuando al calcular el índice de fagocitosis (Figura 10), observamos que esta disminución en la capacidad fagocítica es significativa solo para los sujetos con



sepsis y no así para los sujetos obesos. Esto coincide con resultados como los reportados por Tottier y col, que al analizar pacientes con obesidad grado III, donde también evaluaron la capacidad de internalización y fagocitosis de *E. Coli*, observaron que los niveles generales del mismo no presenta diferencias significativas con respecto a neutrófilos de sujetos sanos<sup>84</sup>.

Existen diversas causas que afectan la fagocitosis y por las cuales esta no se lleva a cabo de manera eficiente. Una de estas causas es que las células reclutadas al sitio de inflamación sean inmaduras, lo que hace que cambie, entre otras cosas, el contenido de sus gránulos; existen reportes que relacionan la baja expresión de CD16 con neutrófilos inmaduros por lo que evaluamos la expresión de este marcador en neutrófilos y monocitos de sujetos sanos, pacientes con sepsis y pacientes con obesidad (Figura 11) observando que la expresión de CD16 en neutrófilos de pacientes con sepsis disminuye de manera significativa; estos resultados coinciden con lo reportado por Drifte y colaboradores, cuyo modelo empleando neutrófilos aislados a partir de sangre periférica de pacientes con sepsis, reclutados 24 horas después de su admisión en la UCI, e incubados con *E. coli* fluorescente es comparable con el nuestro<sup>85</sup>. Esta disminución de CD16 en neutrófilos, puede relacionarse con una función reguladora, al disminuir el estado de activación de la célula como ya se ha reportado para otros receptores Fc<sup>86, 87</sup>. Interesantemente, no observamos cambios significativos en la expresión de CD16 en monocitos, tal como lo sugerían trabajos previos, donde se reportan incrementos de la población de monocitos no clásicos que se supone tienen un potencial inflamatorio<sup>88</sup>.

La disminución en la expresión de CD16, se ha relacionado con disminución en la eliminación de algunos agentes patógenos extracelulares<sup>80</sup>. Como se observa en los resultados al analizar de manera individual cada uno de los grupos de estudio no se alcanza a observar una diferencia significativa, pero si una marcada tendencia a correlacionar de manera positiva la expresión de CD16 con la capacidad fagocítica en pacientes con sepsis (Figura 12 a y b). Como se esperaba, observamos una correlación positiva entre la expresión de CD16 en neutrófilos y la capacidad de fagocitosis al analizar de manera conjunta los datos de los tres grupos de estudio (Figura 12c) lo que

sugiere que a mayor expresión de CD16 habría una mayor actividad fagocítica, esto coincide con reportes que muestran una disminución en las funciones del sistema inmune innato de neutrófilos inmaduros, los cuales tendrían una baja expresión de CD16<sup>86</sup>. Adicionalmente, los neutrófilos inmaduros son capaces de mediar fagocitosis a través de la producción de especies reactivas de oxígeno, aunque de manera menos eficiente comparado con los neutrófilos maduros, lo que se asocia con la expresión disminuida de los receptores para moléculas bacterianas tales como CD14 en neutrófilos inmaduros que además, migran de manera menos eficiente que los granulocitos maduros<sup>81</sup>.

## Conclusión

Solo en los pacientes con inflamación sistémica aguda como sepsis, pero no en los de inflamación crónica de bajo grado, obesos, se encuentra menor capacidad fagocítica de los neutrófilos.

## Referencias

1. Medzhitov, R. Inflammation 2010: new adventures of an old flame. *Cell* **140**, 771-776 (2010).
2. Serhan, C.N. & Savill, J. Resolution of inflammation: the beginning programs the end. *Nature immunology* **6**, 1191-1197 (2005).
3. Woollard, K.J. & Geissmann, F. Monocytes in atherosclerosis: subsets and functions. *Nature reviews. Cardiology* **7**, 77-86 (2010).
4. Dorffel, Y. *et al.* Preactivated peripheral blood monocytes in patients with essential hypertension. *Hypertension* **34**, 113-117 (1999).
5. Wiegand, G., Selleng, K., Grundling, M. & Jack, R.S. Gene expression pattern in human monocytes as a surrogate marker for systemic inflammatory response syndrome (SIRS). *Mol Med* **5**, 192-202 (1999).
6. Pober, J.S. & Sessa, W.C. Evolving functions of endothelial cells in inflammation. *Nature reviews. Immunology* **7**, 803-815 (2007).
7. Seguin, R., Biernacki, K., Rotondo, R.L., Prat, A. & Antel, J.P. Regulation and functional effects of monocyte migration across human brain-derived endothelial cells. *Journal of neuropathology and experimental neurology* **62**, 412-419 (2003).
8. Williams, M.R., Sakurai, Y., Zughaier, S.M., Eskin, S.G. & McIntire, L.V. Transmigration across activated endothelium induces transcriptional changes, inhibits apoptosis, and decreases antimicrobial protein expression in human monocytes. *Journal of leukocyte biology* **86**, 1331-1343 (2009).
9. Thomas J. Kindt, R.A.G., Barbara A. Osborne in *Inmunología de Kuby*. (ed. McGraw-Hill)2007).

10. Kelly, K.J., Liu, Y., Zhang, J. & Dominguez, J.H. Renal C3 complement component: feed forward to diabetic kidney disease. *American journal of nephrology* **41**, 48-56 (2015).
11. Bahar, A.A. & Ren, D. Antimicrobial peptides. *Pharmaceuticals (Basel)* **6**, 1543-1575 (2013).
12. Cacalano, N.A. Regulation of Natural Killer Cell Function by STAT3. *Frontiers in immunology* **7**, 128 (2016).
13. Kroemer, G. *et al.* Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell death and differentiation* **16**, 3-11 (2009).
14. Gordon, S. Phagocytosis: An Immunobiologic Process. *Immunity* **44**, 463-475 (2016).
15. Hirsch, J.G. Immunity to infectious diseases: review of some concepts of Metchnikoff. *Bacteriological reviews* **23**, 48-60 (1959).
16. Jung, J., Buisman, S. & de Haan, G. Hematopoiesis during development, aging and disease. *Experimental hematology* (2016).
17. Xiang, G.A. *et al.* Dynamic changes of mononuclear phagocytes in circulating, pulmonary alveolar and interstitial compartments in a mouse model of experimental silicosis. *Inhalation toxicology*, 1-10 (2016).
18. Vigerust, D.J., Vick, S. & Shepherd, V.L. Stable Expression and Characterization of an Optimized Mannose Receptor. *Journal of clinical & cellular immunology* **6** (2015).
19. Medzhitov, R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature* **449**, 819-826 (2007).
20. Kawai, T. & Akira, S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nature immunology* **11**, 373-384 (2010).
21. Greenberg, S. & Grinstein, S. Phagocytosis and innate immunity. *Current opinion in immunology* **14**, 136-145 (2002).
22. Arce-Paredes, O.R.-E.y.P. Fagocitosis mecanismos y consecuencias. Primera parte. *BIOQUIMIA* **28**, 30 (2003).
23. Desjardins, M. ER-mediated phagocytosis: a new membrane for new functions. *Nature reviews. Immunology* **3**, 280-291 (2003).
24. Vernon, P.J. & Tang, D. Eat-me: autophagy, phagocytosis, and reactive oxygen species signaling. *Antioxidants & redox signaling* **18**, 677-691 (2013).
25. Chatgililoglu, C. *et al.* Free radicals in chemical biology: from chemical behavior to biomarker development. *Journal of visualized experiments : JoVE* (2013).
26. Nordenfelt, P. & Tapper, H. Phagosome dynamics during phagocytosis by neutrophils. *Journal of leukocyte biology* **90**, 271-284 (2011).
27. Kotas, M.E. & Medzhitov, R. Homeostasis, inflammation, and disease susceptibility. *Cell* **160**, 816-827 (2015).
28. Introduction to basic pathology. *Introduction to basic pathology*.
29. Ryan, G.B. & Majno, G. Acute inflammation. A review. *The American journal of pathology* **86**, 183-276 (1977).
30. Nduka, O.O. & Parrillo, J.E. The pathophysiology of septic shock. *Critical care nursing clinics of North America* **23**, 41-66 (2011).
31. Ward, N.S., Casserly, B. & Ayala, A. The compensatory anti-inflammatory response syndrome (CARS) in critically ill patients. *Clinics in chest medicine* **29**, 617-625, viii (2008).
32. Meager, A. Cytokine regulation of cellular adhesion molecule expression in inflammation. *Cytokine & growth factor reviews* **10**, 27-39 (1999).
33. Pober, J.S. Warner-Lambert/Parke-Davis award lecture. Cytokine-mediated activation of vascular endothelium. Physiology and pathology. *The American journal of pathology* **133**, 426-433 (1988).

34. Ghosh, S. & Panaccione, R. Anti-adhesion molecule therapy for inflammatory bowel disease. *Therapeutic advances in gastroenterology* **3**, 239-258 (2010).
35. Takeuchi, O. & Akira, S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* **140**, 805-820 (2010).
36. Schlag, G. & Redl, H. Mediators of injury and inflammation. *World journal of surgery* **20**, 406-410 (1996).
37. Klosterhalfen, B. & Bhardwaj, R.S. Septic shock. *General pharmacology* **31**, 25-32 (1998).
38. Nystrom, P.O. The systemic inflammatory response syndrome: definitions and aetiology. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* **41 Suppl A**, 1-7 (1998).
39. Bone, R.C. *et al.* Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest* **101**, 1644-1655 (1992).
40. Riedemann, N.C., Guo, R.F. & Ward, P.A. The enigma of sepsis. *The Journal of clinical investigation* **112**, 460-467 (2003).
41. Martin, G.S., Mannino, D.M., Eaton, S. & Moss, M. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *The New England journal of medicine* **348**, 1546-1554 (2003).
42. Iskander, K.N. *et al.* Sepsis: multiple abnormalities, heterogeneous responses, and evolving understanding. *Physiological reviews* **93**, 1247-1288 (2013).
43. Friedman, G. *et al.* Blood interleukin 10 levels parallel the severity of septic shock. *Journal of critical care* **12**, 183-187 (1997).
44. Wang, T.S. & Deng, J.C. Molecular and cellular aspects of sepsis-induced immunosuppression. *J Mol Med (Berl)* **86**, 495-506 (2008).
45. Simioni, J.A., Heimovski, F. & Skare, T.L. On lupus, vitamin D and leukopenia. *Revista brasileira de reumatologia* **56**, 206-211 (2016).
46. Ferat-Osorio, E. *et al.* Triggering receptor expressed on myeloid cells-1 expression on monocytes is associated with inflammation but not with infection in acute pancreatitis. *Crit Care* **13**, R69 (2009).
47. Gonzalez-Roldan, N. *et al.* Expression of triggering receptor on myeloid cell 1 and histocompatibility complex molecules in sepsis and major abdominal surgery. *World journal of gastroenterology* **11**, 7473-7479 (2005).
48. Okin, D. & Medzhitov, R. Evolution of inflammatory diseases. *Current biology : CB* **22**, R733-740 (2012).
49. Kanda, H. *et al.* MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. *The Journal of clinical investigation* **116**, 1494-1505 (2006).
50. Medzhitov, R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* **454**, 428-435 (2008).
51. Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation. *World Health Organization technical report series* **894**, i-xii, 1-253 (2000).
52. Pi-Sunyer, F.X. The obesity epidemic: pathophysiology and consequences of obesity. *Obesity research* **10 Suppl 2**, 97S-104S (2002).
53. Berg, A.H. & Scherer, P.E. Adipose tissue, inflammation, and cardiovascular disease. *Circulation research* **96**, 939-949 (2005).
54. Fantuzzi, G. Adipose tissue, adipokines, and inflammation. *The Journal of allergy and clinical immunology* **115**, 911-919; quiz 920 (2005).
55. Yudkin, J.S. Adipose tissue, insulin action and vascular disease: inflammatory signals. *International journal of obesity and related metabolic disorders : journal of the International Association for the Study of Obesity* **27 Suppl 3**, S25-28 (2003).

56. Khovidhunkit, W. *et al.* Effects of infection and inflammation on lipid and lipoprotein metabolism: mechanisms and consequences to the host. *Journal of lipid research* **45**, 1169-1196 (2004).
57. Wellen, K.E. & Hotamisligil, G.S. Inflammation, stress, and diabetes. *The Journal of clinical investigation* **115**, 1111-1119 (2005).
58. Medzhitov, R. & Janeway, C.A., Jr. An ancient system of host defense. *Current opinion in immunology* **10**, 12-15 (1998).
59. Barton, G.M. & Medzhitov, R. Toll-like receptor signaling pathways. *Science* **300**, 1524-1525 (2003).
60. Murakami, K., Bujo, H., Unoki, H. & Saito, Y. High fat intake induces a population of adipocytes to co-express TLR2 and TNFalpha in mice with insulin resistance. *Biochemical and biophysical research communications* **354**, 727-734 (2007).
61. Creely, S.J. *et al.* Lipopolysaccharide activates an innate immune system response in human adipose tissue in obesity and type 2 diabetes. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* **292**, E740-747 (2007).
62. Arkan, M.C. *et al.* IKK-beta links inflammation to obesity-induced insulin resistance. *Nature medicine* **11**, 191-198 (2005).
63. Rajala, M.W. & Scherer, P.E. Minireview: The adipocyte--at the crossroads of energy homeostasis, inflammation, and atherosclerosis. *Endocrinology* **144**, 3765-3773 (2003).
64. Yamagishi, S., Nakamura, K., Jinnouchi, Y., Takenaka, K. & Imaizumi, T. Molecular mechanisms for vascular injury in the metabolic syndrome. *Drugs under experimental and clinical research* **31**, 123-129 (2005).
65. Kopp, H.P. *et al.* Impact of weight loss on inflammatory proteins and their association with the insulin resistance syndrome in morbidly obese patients. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **23**, 1042-1047 (2003).
66. Axelsson, J., Heimbürger, O., Lindholm, B. & Stenvinkel, P. Adipose tissue and its relation to inflammation: the role of adipokines. *Journal of renal nutrition : the official journal of the Council on Renal Nutrition of the National Kidney Foundation* **15**, 131-136 (2005).
67. Nakatani, Y. *et al.* Involvement of endoplasmic reticulum stress in insulin resistance and diabetes. *The Journal of biological chemistry* **280**, 847-851 (2005).
68. Lowell, B.B. & Shulman, G.I. Mitochondrial dysfunction and type 2 diabetes. *Science* **307**, 384-387 (2005).
69. Lin, Y. *et al.* The hyperglycemia-induced inflammatory response in adipocytes: the role of reactive oxygen species. *The Journal of biological chemistry* **280**, 4617-4626 (2005).
70. Calabro, P. *et al.* Adipose tissue-mediated inflammation: the missing link between obesity and cardiovascular disease? *Internal and emergency medicine* **4**, 25-34 (2009).
71. Imhof, B.A. & Dunon, D. Basic mechanism of leukocyte migration. *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et métabolisme* **29**, 614-621 (1997).
72. Bonilla, F.A. & Geha, R.S. 12. Primary immunodeficiency diseases. *The Journal of allergy and clinical immunology* **111**, S571-581 (2003).
73. Hwang, C.S., Loftus, T.M., Mandrup, S. & Lane, M.D. Adipocyte differentiation and leptin expression. *Annual review of cell and developmental biology* **13**, 231-259 (1997).
74. Fact sheets from the Surgeon General's Call to Action to Prevent and Decrease Overweight and Obesity. *The West Virginia medical journal* **98**, 234-243 (2002).
75. Santagostino, A. *et al.* An Italian national multicenter study for the definition of reference ranges for normal values of peripheral blood lymphocyte subsets in healthy adults. *Haematologica* **84**, 499-504 (1999).

76. Tsang, C.W. *et al.* Hematological indices in an older population sample: derivation of healthy reference values. *Clinical chemistry* **44**, 96-101 (1998).
77. Liu, X. *et al.* Prognostic Significance of Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio in Patients with Sepsis: A Prospective Observational Study. *Mediators of inflammation* **2016**, 8191254 (2016).
78. Exline, M.C. *et al.* Microvesicular caspase-1 mediates lymphocyte apoptosis in sepsis. *PLoS one* **9**, e90968 (2014).
79. Ward, P.A. Immunosuppression in sepsis. *Jama* **306**, 2618-2619 (2011).
80. Danikas, D.D., Karakantza, M., Theodorou, G.L., Sakellaropoulos, G.C. & Gogos, C.A. Prognostic value of phagocytic activity of neutrophils and monocytes in sepsis. Correlation to CD64 and CD14 antigen expression. *Clinical and experimental immunology* **154**, 87-97 (2008).
81. Santos, S.S. *et al.* Modulation of monocytes in septic patients: preserved phagocytic activity, increased ROS and NO generation, and decreased production of inflammatory cytokines. *Intensive care medicine experimental* **4**, 5 (2016).
82. Demaret, J. *et al.* Marked alterations of neutrophil functions during sepsis-induced immunosuppression. *Journal of leukocyte biology* **98**, 1081-1090 (2015).
83. Nacionales, D.C. *et al.* Aged mice are unable to mount an effective myeloid response to sepsis. *J Immunol* **192**, 612-622 (2014).
84. Trottier, M.D., Naaz, A., Kacynski, K., Yenumula, P.R. & Fraker, P.J. Functional capacity of neutrophils from class III obese patients. *Obesity (Silver Spring)* **20**, 1057-1065 (2012).
85. Drifte, G., Dunn-Siegrist, I., Tissieres, P. & Pugin, J. Innate immune functions of immature neutrophils in patients with sepsis and severe systemic inflammatory response syndrome. *Critical care medicine* **41**, 820-832 (2013).
86. Pasquier, B. *et al.* Identification of Fc $\alpha$ RI as an inhibitory receptor that controls inflammation: dual role of Fc $\gamma$ ITAM. *Immunity* **22**, 31-42 (2005).
87. Watanabe, T. *et al.* Negative regulation of inflammatory responses by immunoglobulin A receptor (Fc $\alpha$ RI) inhibits the development of Toll-like receptor-9 signalling-accelerated glomerulonephritis. *Clinical and experimental immunology* **166**, 235-250 (2011).
88. Belge, K.U. *et al.* The proinflammatory CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>DR<sup>++</sup> monocytes are a major source of TNF. *J Immunol* **168**, 3536-3542 (2002).

## Anexo 1. Carta de consentimiento informado.



**Lugar y Fecha:** Servicio Gastrocirugía, Hospital de Especialidades CMN SXXI, Ciudad de México,      a      del mes      año     

Por medio de la presente acepto participar en el protocolo de investigación titulado:  
"Evaluación de un panel biomarcador para la caracterización de pacientes con SIRS/sepsis"

Registrado ante el Comité Local de Investigación en Salud o La Comisión Nacional de Investigación Científica con el Número: \_\_\_\_\_

El objetivo del Estudio es:

Evaluar la capacidad del panel biomarcador para diferenciar entre pacientes con SIRS o sepsis.

Se me ha explicado que mi participación consistirá en:

Si decido participar ocurrirá lo siguiente:

a) Se le explicará claramente en qué consiste su participación y se le preguntará si acepta de forma voluntaria formar parte del estudio

b) Toma de muestras biológicas. Tomaremos una muestra de sangre venosa de uno de sus brazos, aproximadamente 1 cucharadita de su sangre, para realizarle algunos estudios de laboratorio. Nos tardaremos aproximadamente 10 minutos o menos en tomarle la muestra de sangre. Los estudios que le realizaremos incluyen: caracterización de subpoblaciones de monocitos, linfocitos neutrófilos y células NK así como la expresión de marcadores de activación en la superficie celular de estos tipos celulares.

Declaro que se me ha informado ampliamente sobre los posibles riesgos, inconvenientes, molestias y beneficios derivados de la participación de mi familiar o representado en el estudio, que son los siguientes: