



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

***“Caracterización de agregados leucocitarios en sangre
periférica de pacientes con sepsis”***

TESIS

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

PRESENTA

MA. TERESA GUTIÉRREZ PONCE



Ciudad de México.

2016



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis 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: **CONSTANTINO III ROBERTO LÓPEZ MACÍAS**
VOCAL: PROFESOR: **LUZ MARÍA MORA VELANDIA**
SECRETARIO: PROFESOR: **LOURDES ANDREA ARRIAGA PIZANO**
1er. SUPLENTE: PROFESOR: **LUIS ANGEL FLORES MEJÍA**
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 ÁNGEL FLORES MEJÍA

(Nombre y firma)

SUSTENTANTE: MA. TERESA GUTIÉRREZ PONCE

(Nombre y firma)

ÍNDICE

ABREVIATURAS	III
RESUMEN	1
MARCO TEÓRICO	2
<i>Leucocitos</i>	2
<i>Anormalidades de los leucocitos</i>	8
<i>Inflamación</i>	9
<i>Inflamación sistémica (SIRS/sepsis)</i>	11
<i>Agregados leucocitarios en sepsis</i>	12
<i>Agregados en otras enfermedades inflamatorias</i>	14
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	15
JUSTIFICACIÓN	15
HIPÓTESIS	16
OBJETIVO GENERAL	16
OBJETIVOS PARTICULARES	16
MATERIALES Y MÉTODOS	16
<i>Criterios de Inclusión</i>	16
<i>Criterios de Exclusión</i>	17
<i>Criterios de Eliminación</i>	17
<i>Obtención de la muestra</i>	18
<i>Inmunofenotipo de sangre periférica</i>	18
<i>Identificación y caracterización de agregados leucocitarios</i>	19
<i>Identificación de leucocitos por microscopía de campo claro</i>	20

<i>Análisis estadístico</i>	21
RESULTADOS	21
DISCUSIÓN	29
CONCLUSIÓN	33
REFERENCIAS	34
ANEXO 1	37
ANEXO 2	41

ABREVIATURAS

AF	Autofluorescencia
APACHE	Acute Physiology and Chronic Health Evaluation
APC Cy7	Allophycocyanin Cyanine 7
CD	Cluster of Differentiation / Grupo de diferenciación
DAMPs	Damage Associated Molecular Patterns / Patrones moleculares asociados a daño
DC	Dendritic Cell / Célula Dendrítica
DNA	Deoxyribonucleic acid / Acido Desoxiribonucleico
dsDNA	Doble strand Deoxyribonucleic acid / Acido Desoxiribonucleico de doble cadena
FC	Frecuencia Cardiaca
FR	Frecuencia Respiratoria
FSC	Forward Scatter / Detector frontal
G-CSF	Granulocyte Colony Stimulating Factor / Factor estimulante de colonias de granulocitos
GM-CSF	Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor / Factor

estimulante de colonias de monocitos y granulocitos

HMGB-1	High Mobility Group Box-1 / Proteína del Grupo de Alta Movilidad de Caja 1
HSP	Heat Shock Protein / Proteína de choque térmico
ICAM	Intercelular adhesion molecule / Molécula de adhesión intercelular
IL	Interleukin / Interleucina
LPS	Lipopolisacárido
MIF	Macrophage Migration Inhibitory Factor / Factor Inhibitorio de la Migración de Macrófagos
MOF	Multiple Organ Failure / Falla Orgánica Múltiple
MPO	Mieloperoxidasa
NK	Natural Killer
PAM	Presión Arterial Media
PAMPs	Patogen Associated Molecular Patterns / Patrones moleculares asociados a patógenos
PBS	Phosphate Buffer Solution / Solución Amortiguadora de Fosfatos
PE Cy7	Phycoerythrin Cyanine 7
PMN	Polimorfonucleares
PSGL-1	P-selectin glycoprotein ligand-1
RNA	Ribonucleic acid / Acido Ribonucleico
ROS	Reactive Oxygen Species / Especies Reactivas de Oxígeno
rpm	revoluciones por minuto
SCA	Sickle Cell Anemia / Anemia de Células Falciformes
SIRS	Systemic Inflammatory Response Syndrome / Síndrome de respuesta inflamatoria sistémica
SOFA	Sequential Organ Failure Assesment / Evaluación Secuencial de la Falla Orgánica
SSC	Side Scatter / Detector lateral
TGF-β	Transforming growth factor beta / Factor de crecimiento transformante beta
TLR	Toll like receptor / Receptor tipo <i>Toll</i>

TNF	Tumor necrosis factor / Factor de necrosis tumoral
UCI	Unidad de Cuidados Intensivos
UFC	Unidades Formadoras de Colonias

Resumen

En los procesos inflamatorios sistémicos agudos y severos, como lo es la sepsis, se dan cambios indeseables en sangre debido al incremento en la activación de sistemas que favorecen la agregación de eritrocitos y leucocitos, como son las cascadas de coagulación y activación endotelial. Al analizar muestras de pacientes con sepsis mediante citometría de flujo, claramente se incrementa la proporción de agregados celulares, que se visualizan al incrementarse el valor integral de tamaño o FCS-A sin incrementarse el valor pico o FSC-H. Sin embargo, se desconoce si estos agregados celulares son una constante en el proceso inflamatorio sistémico que además tendrá implicaciones funcionales. Para caracterizar estos agregados celulares, nuestro objetivo fue determinar, por citometría de flujo y microscopía de campo claro, el tipo de leucocitos que forman estos agregados. Analizamos tres muestras de pacientes con diagnóstico de sepsis y tres de voluntarios sanos. Cada muestra fue procesada de acuerdo al protocolo de inmunofenotipificación por citometría de flujo. Se utilizó el protocolo de preparación y tinción de Wright para la observación de los agregados por microscopía de campo claro.

A partir del total de eventos analizados por citometría de flujo observamos que hay significativamente mayor proporción de agregados en las muestras de pacientes sépticos, en comparación con voluntarios sanos (sépticos= 20.6 ± 11 vs sanos= 6.7 ± 1.4 %, <0.05). De esta zona de agregados, se verificó el tipo de marcadores, siendo los más abundantes CD16 (sepsis= 89.9 ± 2.9 ; sano= 78.2 ± 8.4), lo que sugiere que están formados por neutrófilos y CD14 (sepsis= 4.6 ± 4.8 sano= 11.7 ± 1.3 %), sugiriendo que también se encuentran monocitos en la composición de agregados. En los pacientes con sepsis y no así en sujetos sanos, en la zona de agregados encontramos tanto CD14 como CD16, que nos llevó a pensar en la posible interacción entre monocitos y neutrófilos (séptico: 3.9 ± 2.2 %). Para dilucidar lo anterior, se visualizaron microscopía de campo claro, muestras de sangre periférica de sujetos con sepsis, observándose que predominan las interacciones neutrófilo-neutrófilo y neutrófilo-linfocito y rara vez se encuentra la asociación de monocitos. En conclusión, las células mieloides son las principales implicadas en la formación de agregados en las muestras de sangre periférica de pacientes con sepsis que, además de potenciales implicaciones

funcionales, podrían también enmascarar su frecuencia en las muestras de estos pacientes.

Marco Teórico

Los leucocitos habitualmente se encuentran individualmente en suspensión en el tejido sanguíneo y la linfa. Sin embargo existen procesos patológicos, como estados de hipercoagulación e inflamación, que pueden incrementar la adhesividad de estos leucocitos no solo por moléculas expresadas en las células endoteliales, sino también en otros leucocitos¹. Esto y/o la activación plaquetaria y/o formación de Trampas Extracelulares de Neutrófilos (NETs; *Neutrophil Extracellular Traps*) por parte de neutrófilos pueden llevar a la formación de cúmulos o cadenas de leucocitos que en los análisis de citometría de flujo se localizarían en la denominada zona de agregados^{2, 3}.

Leucocitos

Todas las células sanguíneas se originan a partir de la diferenciación de la célula madre, es decir, un progenitor común indiferenciado, totipotencial y autorregenerativo (CD34+); esta puede diferenciarse hacia diferentes precursores pluripotenciales o unidades formadoras de colonias (UFC), los cuales producen glóbulos rojos (eritrocitos), glóbulos blancos (leucocitos) y plaquetas. Las células progenitoras y sus precursores son estimulados por varios mensajeros químicos que pueden ser hormonas, y una gran variedad de interleucinas y factores estimulantes de colonias de granulocitos (G-CSF; *Granulocyte Colony Stimulating Factor*) y de granulocitos-macrófagos (GM-CSF; *Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor*). La interleucina 3 (IL-3) estimula la formación de UFC-GM y favorece la proliferación de todo tipo de células de estirpe mieloide; la IL-2, la formación de los linfocitos T cooperadores; la IL-4, la diferenciación de basófilos y linfocitos B, y la IL-11, la formación de plaquetas⁴.

Para la evaluación de la morfología celular existen distintas metodologías, de las cuales una de las más comunes es por microscopía con la preparación de frotis, el cual se

procesa con colorantes (“tinción”) para identificar las células. La tinción de Wright es la utilizada con mayor frecuencia para frotis de sangre periférica o médula ósea (para ambos tipos de muestras se utiliza eosina y azul de metileno, con resultados policrómicos).

Las células se fijan sobre el portaobjetos con el metanol en el que se diluye el colorante; las reacciones de los colorantes dependen del pH: el azul de metileno es básico, por lo que marca azul a los componentes celulares ácidos (ej. RNA); la eosina es ácida, por lo que marca de rojo los componentes básicos (ej. hemoglobina o gránulos eosinófilos).⁵

Un frotis de sangre periférica con este tipo de tinción de Wright debe tener las siguientes características: los eritrocitos deben observarse de color rosa a salmón; los núcleos de azul oscuro a violeta; los gránulos citoplasmáticos de los neutrófilos de color lila; los gránulos de los basófilos de color azul oscuro a negro; los gránulos de los eosinófilos de color rojo a anaranjado.

La evaluación de la morfología de los leucocitos se usa para describir si las células por tamaño, forma y color son normales o anómalas⁶. Lo habitual es observar: neutrófilos en banda (Fig.1), neutrófilos segmentados (Fig.2), linfocitos (Fig.3), monocitos (Fig.4), eosinófilos (Fig.5), basófilos (Fig.6), y macrófagos(Fig.7). Sus características en condiciones normales se describen a continuación:

- *Neutrófilo:*
 - En banda
 - Tamaño: 10 – 15µm
 - Núcleo: Forma de C o S.
 - Cromatina: grumos gruesos (segmentos condensados).
 - Citoplasma: azul pálido – rosa
 - Gránulos: Azurófilos (Primarios); grandes, contienen mieloperoxidasa (MPO).
- Escasos

Específicos (Secundarios): pequeños, contienen diversas enzimas, activadores del complemento y otros péptidos antimicrobianos.

Abundantes

Valor de referencia en sangre periférica (adultos): 0 - 5%; 0 – 0.6 x10⁹ células/L.

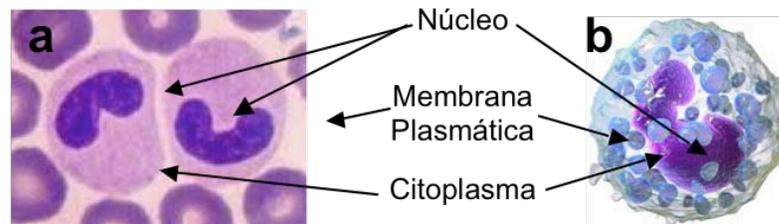


Figura 1. Neutrófilo en banda; a) microscopía de campo claro, Tinción de Wright, y b) caricatura de un neutrófilo inmaduro o “en banda” en el que se observa un núcleo continuo sin “adelgazamientos”. Modificado de Terese Winslow; Medical and Scientific Illustration; Atlas de Morfología Celular, Alteraciones y Enfermedades Relacionadas, Manacero.

- Segmentado

Tamaño: 10 – 15µm

Núcleo: 2 – 5 lóbulos conectados por filamentos delgados.

Cromatina: grumos gruesos (segmentos condensados).

Citoplasma: azul pálido – rosa

Gránulos: Azurófilos (Primarios), inusuales

Específicos (Secundarios), abundantes.

Terciarios: un tipo contiene fosfatasas y otro tipo contiene metaloproteinasas.

Valor de referencia en sangre periférica (adultos): 50 – 70%; 2.3 – 8.1 x10⁹ células/L.

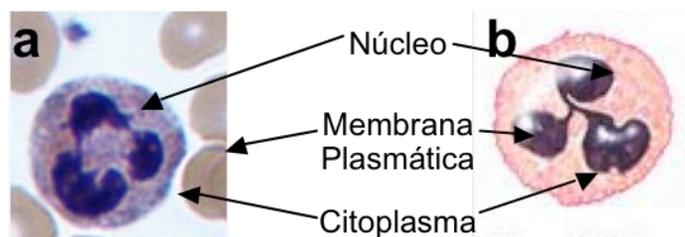


Figura 2. Neutrófilo segmentado; a) microscopía de campo claro, Tinción de Wright, y b) caricatura de un neutrófilo maduro o “segmentado” en el que se observa un núcleo lobulado, conectado por filamentos delgados. Modificado de Terese Winslow; Medical and Scientific Illustration; Atlas de Hematología Clínica, Carr, Rodak.

- **Linfocitos:**

Tamaño: 7 – 18µm

Núcleo: Redondo a oval; puede ser ligeramente dentado; en ocasiones se observa nucléolo.

Cromatina: condensada a intensamente condensada.

Citoplasma: escaso, azul claro

Gránulos: Azurófilos, escasos

Valor de referencia en sangre periférica (adultos): 20 - 40%; 0.8 - 4.8 x10⁹ células/L.

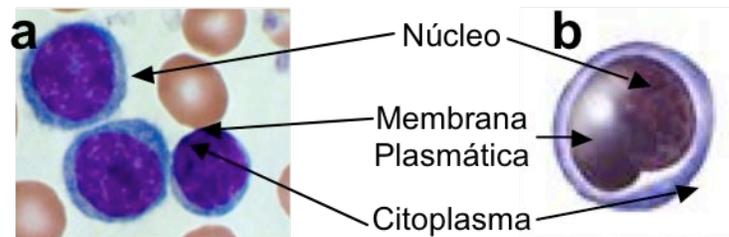


Figura 3. Linfocito; a) microscopía de campo claro, Tinción de Wright, y b) caricatura de un linfocito en que se observa un núcleo prominente y citoplasma escaso. Modificado de Terese Winslow, *Medical and Scientific Illustration*; Atlas de Hematología Clínica, Carr, Rodak.

- **Monocitos:**

Tamaño: 12 – 20µm

Núcleo: Puede ser redondo, en herradura o arriñonado.

Cromatina: laxa.

Citoplasma: gris azulado; puede tener pseudópodos y vacuolas numerosas o ausentes.

Gránulos: Lisosomales pequeños teñidos en rosa y vacuolas citoplásmicas que le confieren un aspecto en vidrio esmerilado.

Valor de referencia en sangre periférica (adultos): 3 - 11%; 1.5 – 1.3 x10⁹ células/L.

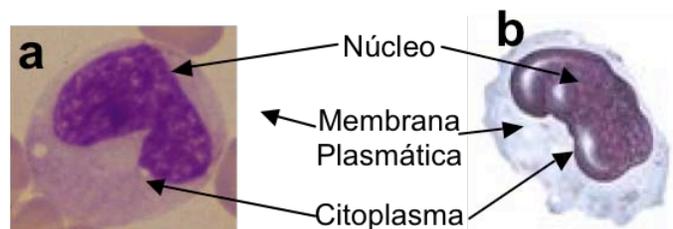


Figura 4. Monocito; a) *microscopía de campo claro, Tinción de Wright,* y b) *caricatura de un monocito en el que se observa un núcleo “arriñonado”.* Modificado de Terese Winslow, *Medical and Scientific Illustration;* *Atlas de Morfología Celular, Alteraciones y Enfermedades Relacionadas, Manacero.*

- **Eosinófilos:**

Tamaño: 12 - 17µm

Núcleo: 2 – 3 lóbulos conectados por filamentos delgados.

Cromatina: grumos gruesos (segmentos condensados).

Citoplasma: rosa; puede presentar bordes irregulares.

Gránulos: Azurófilos (Primarios), inusuales

 Específicos (Secundarios), abundantes, rojos a anaranjados

Valor de referencia en sangre periférica (adultos): 0 - 5%; 0 - 0.4 x10⁹ células/L.

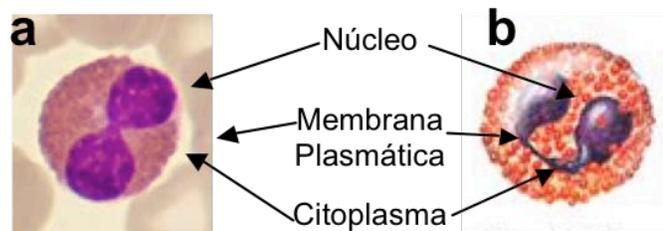


Figura 5. Eosinófilo; a) *microscopía de campo claro, Tinción de Wright,* y b) *caricatura de un eosinófilo en el que se observa un núcleo bilobulado, conectado por un filamento y en el citoplasma gran cantidad de gránulos acidófilos.* Modificado de Terese Winslow, *Medical and Scientific Illustration;* *Atlas de Morfología Celular, Alteraciones y Enfermedades Relacionadas, Manacero.*

- **Basófilos:**

Tamaño: 10 – 14µm

Núcleo: 2 – 5 lóbulos conectados por filamentos delgados.

Cromatina: grumos gruesos (segmentos condensados).

Citoplasma: violeta a incoloro

Gránulos: Azurófilos (Primarios), inusuales

 Específicos (Secundarios), variable en número con distribución irregular; pueden ocultar el núcleo o desprenderse durante la tinción, que da el aspecto de áreas vacías en el citoplasma.

Valor de referencia en sangre periférica (adultos): 0 - 1%; 0 – 0.1 x10⁹ células/L.

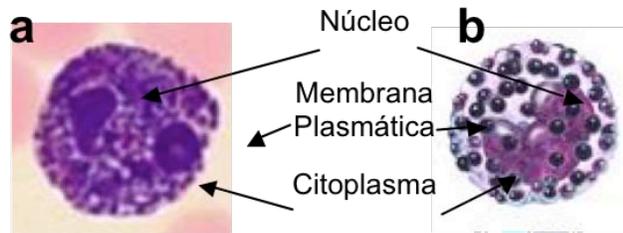


Figura 6. Basófilo; a) microscopía de campo claro, Tinción de Wright, y b) caricatura de un basófilo en el que se observa un núcleo lobulado, y en el citoplasma gran cantidad de gránulos basófilos. Modificado de Terese Winslow, *Medical and Scientific Illustration*; *Atlas de Hematología Clínica*, Carr, Rodak.

- **Macrófago:**

Tamaño: 15 - 30µm

Núcleo: arriñonado (identadura pequeña).

Cromatina: laxa

Citoplasma: fusiforme o estrellado, acidófilo.

Gránulos: Lisosomas, vacuolas de inclusión, fagosomas, fagolisosomas; dependiendo de su grado de activación.

Valor de referencia en sangre periférica (adultos): No se encuentra en sangre, pero en procesos infecciosos severos puede encontrarse^{6, 7}.

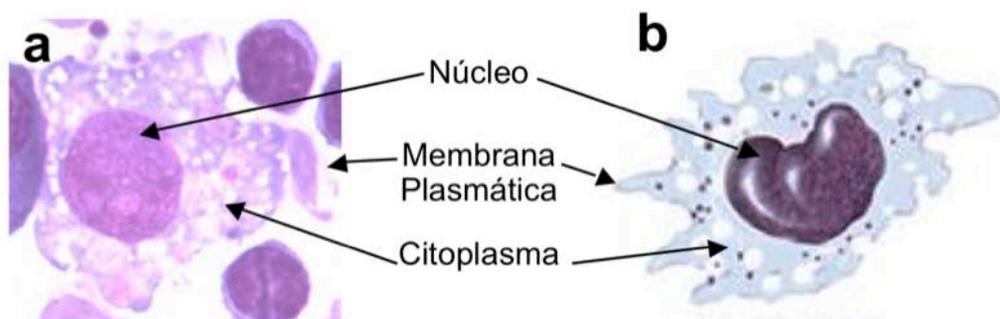


Figura 7. Macrófago; a) microscopía de campo claro, Tinción de Wright, y b) caricatura de un macrófago en el que se observa un núcleo arriñonado, y un citoplasma irregular con pseudópodos. Modificado de Terese Winslow, *Medical and Scientific Illustration*; *Bloodline, Image Atlas Categorical Index*.

Anormalidades de los leucocitos

Al estudiar las variaciones de los leucocitos, debemos tener en cuenta: los cambios que se presentan en su número; la población que afecta su aumento o disminución; y las características morfológicas particulares de cada una de ellas.

Tabla 1. Alteraciones cuantitativas de leucocitos

<i>Alteración</i>	<i>Nombre</i>	<i>Valores (célulasx10⁸/dL)</i>
<i>Disminución</i>	Leucocitosis	> 11.0
	Neutrofilia	> 7.0
	Linfocitosis	> 4.8
	Monocitosis	> 0.8
	Eosinofilia	> 0.45
	Basofilia	> 0.2
<i>Aumento</i>	Leucopenia	< 4.0
	Neutropenia	< 1.8
	Linfopenia	< 1.0
	Monocitopenia	< 0.1

La leucocitosis inflamatoria-infecciosa es la más frecuente y puede generarse por bacterias, virus y parásitos. En infecciones bacterianas se desarrolla reacción leucemoide, caracterizada por leucocitosis; se presenta en procesos infecciosos graves, pues involucra células de la fase medular en etapa de proliferación (promielocitos, mielocitos) y de maduración (metamielocitos y bandas), pareciéndose al cuadro hemático de una leucemia mielocítica crónica: debido a estos procesos observamos neutrofilia⁴.

En enfermedades infecciosas puede presentarse también linfocitosis, que se acompaña por cambios morfológicos en los linfocitos de periferia, debido a mayor producción de RNA para la generación de interleucinas o anticuerpos, lo que le confiere carácter hiperbasófilo al citoplasma (total o periférica). Así mismo, en infecciones crónicas o en el proceso de resolución de procesos infecciosos, ocurre monocitosis, la cual se nota acompañada por linfocitosis y eosinofilia⁸.

En procesos tóxicos podemos encontrar alteraciones citoplasmáticas en neutrófilos como la presencia de cuerpos de Döhle (inclusiones redondeadas basófilas únicas o múltiples que se depositan en la periferia de las células), pequeñas inclusiones citoplasmáticas color azulado y vacuolización. También pueden presentarse alteraciones nucleares en los procesos infecciosos como lo es la pseudo-anomalía Pelger Hüet o Pelger Hüet adquirido, la cual es la forma no hereditaria y se caracteriza por la hiposegmentación de neutrófilos, aunque algunos pueden presentar segmentación normal⁹.

En varias situaciones, entre ellas infecciones víricas, no víricas, intoxicaciones por plomo y barbitúricos se encuentran linfocitos atípicos (también llamados linfocitos reactivos, variante, plasmacitoide, células de Turk, virocito); son aquellas células con cambios en el núcleo, el cual aumenta de tamaño, puede haber presencia de nucleolos, es generalmente excéntrico y con alteración de la condensación de la cromatina; su citoplasma se hace más abundante, intensamente basófilo (síntesis activa de DNA y RNA; citoplasma es rico en ribosomas agregados), vacuolado y con pequeñas protusiones; a veces presenta halo perinuclear (formación de retículo endoplásmico y aparato de Golgi bien definido)^{9, 10}.

Inflamación

La inflamación es una respuesta de tejidos vascularizados ante el daño producido por un agente de naturaleza microbiológica, química o física para asegurar la eliminación del estímulo, así como del proceso de reparación del tejido dañado. En el caso de inflamación localizada, esta caracterizada por cinco datos clásicos: enrojecimiento,

hinchazón, calor, dolor y pérdida de la función, lo cual refleja aumento de la permeabilidad del endotelio vascular. En su mayoría es la inmunidad innata la que contribuye al proceso inflamatorio mediado por infección microbiana o daño tisular, pero es crucial para la activación y regulación de la respuesta inmune adaptativa, ya que de su desarrollo depende la eliminación de agentes infecciosos o detritus celulares y la restitución del tejido^{11,12}.

El proceso inflamatorio involucra la microvasculatura del tejido afectado y principalmente vénulas postcapilares, donde se da la extravasación de leucocitos circulantes, atraídos por gradientes de quimiocinas y citocinas. Estímulos inflamatorios activan a las células de endotelio vascular para que expresen moléculas de adhesión y quimiocinas, que interactúan con los leucocitos circulantes para promover su adhesión al endotelio y atraviesen las paredes vasculares hacia el tejido.¹³

Los iniciales promotores de la inflamación estéril son: daño de tejidos y muerte celular (como en procesos patológicos como isquemia, arterosclerosis, gota y Alzheimer); la muerte de células estimula una respuesta inflamatoria mediante la liberación de patrones moleculares asociados a daño (DAMPs; damage-associated molecular patterns), en los cuales los mejor caracterizados se incluyen HMGB-1 (high-mobility group box 1 protein), proteínas de choque térmico (HSPs, por sus siglas en inglés), dsDNA, ácido úrico, entre otros. Por otro lado en procesos infecciosos, componentes microbianos o patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs, *Patogen Associated Molecular Patterns*) como LPS, DNA y RNA de origen bacteriano o viral, flagelina y peptidoglicana son reconocidos por Receptores Tipo Toll (TLRs; *Toll-like receptors*), que están expresados en macrófagos, células dendríticas (DCs) y células no presentadoras; el reconocimiento de estas moléculas estimula el rápido flujo de neutrófilos y tardíamente de monocitos hacia el tejido lesionado, los cuales activan el estallido respiratorio y la fagocitosis, lo que ayuda a controlar la diseminación de microorganismos y/o depurar detritus celulares.^{13,14}

La respuesta inflamatoria se acompaña de citocinas proinflamatorias, las cuales regulan muerte celular, modifican permeabilidad del endotelio vascular, reclutan células al sitio de inflamación e inducen producción de proteínas de fase aguda¹⁴. Una vez que se ha contenido el daño, es necesario contener la respuesta inflamatoria, con la finalidad de

evitar el daño excesivo al tejido^{15, 16}. La resolución de la inflamación es iniciada por la expresión de enzimas que promueven la síntesis de mediadores anti-inflamatorios los cuales reducen la infiltración de neutrófilos y la permeabilidad vascular; promueven la infiltración de monocitos circulantes a tejido, los cuales se transforman en macrófagos y junto con células residentes, fagocitan células apoptóticas; favorecen la síntesis de citocinas anti-inflamatorias (TGF- β e IL-10) e incrementan la salida de células fagocíticas a través de los vasos linfáticos¹⁷.

En caso de que el daño no pueda ser contenido, el proceso inflamatorio se extiende, volviéndose sistémica, donde mediadores pro-inflamatorios, como TNF- α , IL-1 β , MIF (macrophage migration inhibitory factor) y HMGB-1 son liberados a la circulación¹⁸. En estos estados patológicos donde fallan los mecanismos de contención de la inflamación, se da pie a la activación de diversos tipos celulares, la inducción de fiebre, la síntesis de proteínas de fase aguda por el hígado y la activación tanto del endotelio como de las cascadas de la coagulación y del complemento¹⁹. La activación endotelial excesiva incrementa la permeabilidad vascular y la infiltración celular, causando edema y limitando la oxigenación de los tejidos; mientras que la activación de las cascadas de coagulación, junto con monocitos activados contribuyen al desarrollo de aterosclerosis²⁰, hipertensión arterial y síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS)²¹.

Inflamación sistémica (SIRS/sepsis)

El síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS) se presenta como un proceso de constante progresión que, de no limitarse, culmina en el desarrollo de falla orgánica múltiple (MOF) y finalmente en la muerte del paciente. Para el diagnóstico del síndrome de SIRS, se requiere la presencia de dos o más de los siguientes signos clínicos: inflamación sistémica, incluyen cambios en la temperatura corporal, taquicardia, leucocitosis/leucopenia o alteración en el ritmo respiratorio, y se presentan de igual forma en pacientes con un proceso infeccioso subyacente que en pacientes sin una base infecciosa²².

SIRS se propone, es el resultado de la activación del sistema inmune innato a nivel sistémico (puede desencadenarlo: trauma, quemaduras, isquemia, y/o reperfusiones). Sepsis se define como sospecha o documentación de infección, combinada con dos o más anormalidades en temperatura corporal, ritmo cardíaco, ritmo respiratorio o conteo leucocitario; en adición, los pacientes que presenten disfunción orgánica (incluyendo cardiovascular, renal, hepático o neurológico) se clasifican como “sepsis severa”, y aquellos con disfunción cardiovascular sin respuesta a fluidos corresponden a “choque séptico”²³.

La regulación del sistema inmune es crucial para mantener el balance entre la repuesta protectora y la que ataca el tejido, sin embargo, tanto en SIRS como en sepsis existe una pérdida en éste balance, provocando que coexistan lo mismo hiperactividad e hipoactividad de diferentes componentes de la respuesta inflamatoria e inmune. Al inicio del establecimiento de sepsis, células endoteliales, epiteliales, y del sistema inmune producen mediadores proinflamatorios (TNF- α , IL-6, IL-8); la concentración de proteínas de fase aguda aumenta y se activa la cascada de complemento. Las células fagocíticas responden a quimioatrayentes, liberando enzimas granulares y produciendo especies reactivas de oxígeno (ROS), y la expresión de moléculas de adhesión en células endoteliales aumenta el reclutamiento de leucocitos al tejido. Así también son activados los sistemas de coagulación y fibrinolítico.

Por su parte, en la fase tardía, se producen mediadores anti-inflamatorios (IL-10, IL-13) para contrarrestar los efectos proinflamatorios de la fase inicial. De esta forma, mientras la sepsis progresa, neutrófilos y macrófagos reducen su actividad fagocítica, quimiotaxis y producción de citocinas; de esta forma varias funciones innatas son comprometidas, llevando a un sistema de defensa hiporeactivo²⁴.

Agregados leucocitarios en sepsis

Como ya se mencionó, la sepsis es un síndrome hiperdinámico caracterizado por cambios indeseables en el tejido sanguíneo debidos, entre otros, a la agregación de eritrocitos y leucocitos. El incremento en la agregación de estas células es debido al

aumento en la concentración de proteínas de adhesión, así como de la activación celular²⁵. Estos cambios incluyen aumento de eritrocitos y neutrófilos agregados, eritrocitos dañados y polimorfonucleares (PMN) deformados, aumento en adherencia PMN-células endoteliales, y aumento en la viscosidad del plasma. En pacientes con sepsis y choque séptico disminuye la capacidad de deformabilidad de eritrocitos (debidos a cambios en propiedades de la membrana) y de PMNs; esta disminución en la deformabilidad y aumento en la formación de agregados, provoca así mismo una disminución en filtración de PMNs y causa obstrucción microvascular²⁶. Se ha observado que existen anomalías en la función plaquetaria en sujetos con falla orgánica múltiple y sepsis; la activación de plaquetas y la liberación de mediadores tiene implicaciones en la activación y agregación de PMNs, así también, PMNs activados aumentan la respuesta de plaquetas a estímulos, y de manera relevante, las plaquetas se adhieren a PMNs aumentando la agregación de los mismos y mediando el reclutamiento de leucocitos hacia el sitio de daño o infección²⁷.

Una de las moléculas que tienen un papel central en la interacción de plaquetas, leucocitos y células endoteliales es P-selectina (CD62P; contenida en gránulos α de plaquetas) y su ligando PSGL-1 (P-selectin ligand). P-selectina es expresada en la de plaquetas activadas, y PSGL-1 se expresa en monocitos, neutrófilos, eosinófilos y progenitores hematopoyéticos; dado que P-selectina une plaquetas y leucocitos, se le considera un mediador para la formación de agregados plaqueta-leucocito²⁸.

La unión inicial de plaquetas a leucocitos se da por la interacción de P-selectina a PSGL-1 de leucocitos, seguido por estabilización mediada por CD11b/CD18 (Integrina α M/Integrina β 2; Mac-1) de leucocitos y GPIIb/IIIa de plaquetas o por ICAM-2 de plaquetas a CD11a/CD18 de leucocitos (Fig.9)^{27, 29}. Los neutrófilos que se encuentran en agregados con plaquetas, muestran actividad fagocítica aumentada y producen mayor cantidad de especies reactivas de oxígeno (ROS); y monocitos presentes en agregados monocito-plaqueta parecen inducir cambio hacia fenotipo pro-inflamatorio CD14^{high} CD16⁺, además, estas interacciones entre monocitos, neutrófilos y plaquetas, activan la cascada de coagulación (actividad pro-coagulante y promoción de inflamación)¹⁴.

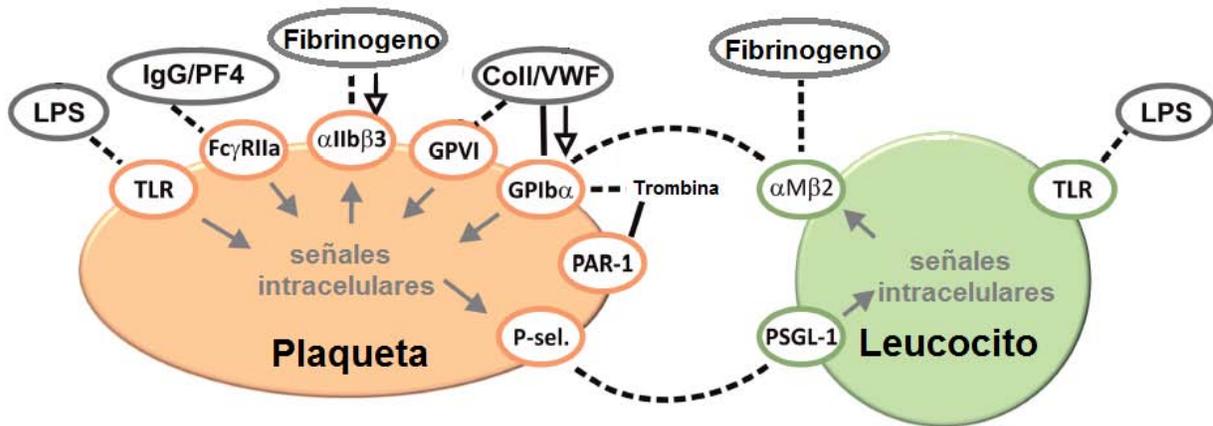


Figura 9. Interacciones entre plaquetas y leucocitos. (Modificado de Andrews, 2014). Interacciones mediadas predominantemente por P-selectina/PSGL-1 y GPIb α / α M β 2.

Sin embargo, la tendencia a formar agregados difiere entre subpoblaciones leucocitarias, siendo los monocitos los más propensos y linfocitos los menos. Se ha encontrado que en procesos inflamatorios y trombóticos, en humanos, los linfocitos implicados en agregados linfocito-plaqueta constituyen alrededor del 3% de los circulantes y así mismo, la activación plaquetaria aumenta ligeramente la agregación de linfocitos T (desde 3% a 7%), y eleva marcadamente los agregados plaqueta-NK (desde 3% a 12%). Se sabe también que la agregación se da preferentemente en células grandes (tamaño de monocito); sin embargo, la capacidad de unión a plaquetas de los linfocitos (a través de P-selectina), es menor a la de monocitos y granulocitos; aun cuando aumenta en células T de memoria (2 veces mayor que en células T naive)³⁰.

Agregados en otras enfermedades inflamatorias

En anemia de células falciformes (SCA; *sickle cell anemia*) se han reportado antes agregados de células mononucleares-eritrocitos y plaquetas-eritrocitos en circulación; más recientemente se ha encontrado que la formación de agregados neutrófilo-eritrocito aumenta significativamente en pacientes con SCA. También se ha indicado la participación de la integrina Mac-1 en agregados neutrófilo-eritrocito; estas integrinas pueden existir en estados de baja o alta afinidad, y basándose en datos, es probable que cambios en la afinidad y avidéz, más que de expresión, sean los responsables del

incremento de agregados heterocelulares reportados en SCA. Así mismo se ha demostrado la participación de ICAM-4 (integrina expresada en eritrocitos maduros) en la formación de estos agregados, así como la participación de plaquetas activadas en la formación del 20% de ellos, las cuales forman un puente entre neutrófilos y eritrocitos en la mayoría de los agregados³¹.

En psoriasis se ha demostrado también que los pacientes presentan incremento en agregados de monocitos en circulación; esta agregación puede ocurrir en presencia o ausencia de plaquetas. Los monocitos pueden formar pares monocito-monocito y monocito-linfocito, siendo predominantes los formados por un monocito clásico (CD14++CD16-) unido ya sea a otro monocito clásico, a un monocito intermedio (CD14++CD16+), o a un linfocito. Los monocitos de pacientes con psoriasis expresan niveles de integrina β_2 ligeramente incrementados; y se sugiere que las células formando pares en circulación, regulan de manera positiva moléculas de adhesión que potencian la adhesión celular y que así mismo incrementan el riesgo de comorbilidades cardiovasculares³².

Planteamiento del Problema

Es claro que los leucocitos tienden a agregarse en los procesos de SIRS/sepsis. Los leucocitos más abundantes, como neutrófilos, así como los monocitos, son células implicadas en la formación de estos agregados en otras enfermedades inflamatorias. Sin embargo para SIRS/sepsis se desconoce la identidad de las células que conforman estos agregados y las potenciales consecuencias funcionales de su formación, así como el efecto que esto tiene en las proporciones y conteos de leucocitos en sangre periférica de los pacientes.

Justificación

En el proceso de sepsis los pacientes se encuentran en estados de activación endotelial, de complemento, de cascadas de coagulación y de leucocitos, todo lo cual contribuye a que en circulación se favorezca la agregación celular, sin embargo, en los

reportes de frecuencia de leucocitos en circulación de los pacientes, estos agregados no se toman en cuenta. El analizarlos y definir tanto estrategias para su correcto estudio e inclusión en los reportes, como la exploración de la capacidad funcional de estas células puede ser de importancia dentro de fisiopatologías complejas, como lo es la sepsis.

Hipótesis

En los pacientes con sepsis los agregados leucocitarios en circulación están primordialmente formados por células de estirpe mieloide.

Objetivo General

Identificar el tipo de células que forman parte de los agregados leucocitarios en sangre periférica de sujetos con sepsis.

Objetivos Particulares

- Determinar la proporción de agregados en sangre periférica en sujetos con sepsis y voluntarios sanos.
- Identificar en la zona de agregados leucocitarios marcadores correspondientes a monocitos, linfocitos T y neutrófilos.
- Establecer el tipo de agregados que se encuentran en pacientes con sepsis y sujetos sanos.

Materiales y Métodos

Diseño del estudio

Estudio longitudinal, prospectivo y observacional.

Universo de trabajo

Se incluyeron pacientes adultos ingresados en la Unidad de Cuidados Intensivos (UCI) del Hospital de Especialidades de Centro Médico Nacional “Siglo XXI” del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) con diagnóstico de sepsis de reciente inicio.

Criterios de Inclusión

- Pacientes ingresados en la UCI con diagnóstico de sepsis.
- Pacientes de sexo masculino y femenino.
- Pacientes de entre 18 y 60 años de edad.
- Pacientes que otorguen consentimiento informado por escrito. En caso de incapacidad para firmar la hoja de consentimiento, se solicitó el consentimiento a sus familiares o a su representante legal.

Criterios de Exclusión

- Pacientes cuyos familiares o ellos mismos rechazaron participar en el estudio.
- Pacientes con inmunodeficiencias o inmunocompromiso como los portadores de VIH, hepatitis B, hepatitis C o enfermedades autoinmunes.
- Embarazo.
- Pacientes con expediente clínico incompleto.

Criterios de Eliminación

- Pacientes cuyas muestras sanguíneas no fueron factibles de procesar por situaciones inherentes a la toma y/o procesamiento de la misma.
- Pacientes que decidan retirarse voluntariamente del estudio.

Aspectos éticos

Para la realización del presente protocolo se solicitó la aprobación del Comité Nacional de Investigación Científica del IMSS (No. de Registro R-2013-3601-229). Se considera que los pacientes incluidos en este estudio estuvieron expuestos a un riesgo mayor al mínimo, por lo que se solicitó la firma de una carta de consentimiento informado antes de iniciar el estudio (Anexo1 y 2).

Los procedimientos propuestos estuvieron de acuerdo con las normas éticas, el Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud y con la declaración de Helsinki de 1975 y sus enmiendas^{33, 34}, así como los códigos y normas internacionales vigentes para las buenas prácticas de investigación clínica en el momento. Se respetaron cabalmente los principios contenidos en el Código de Nuremberg, el Informe de Belmont³⁵ y la declaración de Helsinki, así como en sus enmiendas.

Obtención de la muestra

Dado que la obtención de la muestra de sangre periférica representa un riesgo mínimo, se pidió la firma de consentimiento informado (Anexo 1) a voluntarios sanos o pacientes con diagnóstico de sepsis que cumplieran con los criterios de inclusión. En tubos que contenían citrato de sodio como anticoagulante se colocaron 5-6 mL de sangre periférica que se recuperó a partir del catéter venoso central (pacientes con sepsis) o de punción de vena braquial (sujetos sanos).

Inmunofenotipo de sangre periférica

De las muestras recuperadas, se realizó la lisis de los eritrocitos de una alícuota de 100 μ L de sangre periférica con 600 μ L de solución de lisis (NH_4Cl 0.15M) 1x, con la cual se incubó por 10 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó a 528 x g (1500rpm) por 5 minutos, se decantó, y se resuspendió con 100 μ L de PBS 1x. Se etiquetaron dos tubos para cada muestra (autofluorescencia 'AF', inmunofenotipo 'T'); se agregó la mezcla de anticuerpos (Tabla 2.) en el tubo de tinción (T) y se añadieron 50 μ L de la suspensión

celular en cada tubo (AF, T); se incubaron 15 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Posteriormente se agregaron 250µL de solución de lisis y fijado 1x (BD FACS™ Lysing Solution Cat. 349202) a cada tubo, se incubaron por 10 minutos a temperatura ambiente en oscuridad y finalmente se lavaron con 1000 µL PBS y se almacenaron a 4°C hasta adquisición. Se adquirieron al menos cinco mil eventos correspondientes a la población de leucocitos utilizando un citómetro FACS Aria (BD® Biosciences) equipado con tres láser y un juego de filtros adecuados para la detección de los fluorocromos utilizados. El análisis multiparamétrico se realizó empleando el programa Infinicyt® (Cytognos, Euroflow, España).

Tabla 2. Panel de anticuerpos para establecer el inmunofenotipo leucocitario

<i>Anticuerpo</i>	<i>Fluorocromo</i>	<i>Volumen (µL)</i>	<i>Marca</i>	<i>Clona</i>
<i>CD45</i>	Pacific Orange	0.5	Invitrogen	HI30
<i>CD3</i>	Pacific Blue	0.5	BioLegend	HIT3a
<i>CD14</i>	PE Cy7	0.5	BioLegend	M5E2
<i>CD16</i>	APC Cy7	1.0	BioLegend	3G8

Nota: Se usaron para cada tubo 50 µL de suspensión celular con una concentración de ~200 mil células.

Identificación y caracterización de agregados leucocitarios.

Para la identificación y caracterización de las poblaciones leucocitarias que conforman los agregados en cada uno de los sujetos estudiados, se utilizó un algoritmo de análisis de datos de citometría de flujo utilizando el programa Infinicyt, que incluía mediante gráficas de puntos (“dot-plots”) la visualización de diferentes parámetros. Como se puede ver en la Figura 10, para seleccionar a los eventos o células agregadas, se utilizó una gráfica de FSC-A (señal área del parámetro tamaño) vs FSC-H (señal pico del parámetro tamaño); además se utilizó una gráfica de tamaño (FSC-A) vs complejidad (SSC-A) para identificar a las células completas y potencialmente viables (población “células”); y una gráfica de la expresión CD45 (CD45-A) vs complejidad (SSC-A), para discriminar a los leucocitos de los eritrocitos remanentes (Fig. 10a).

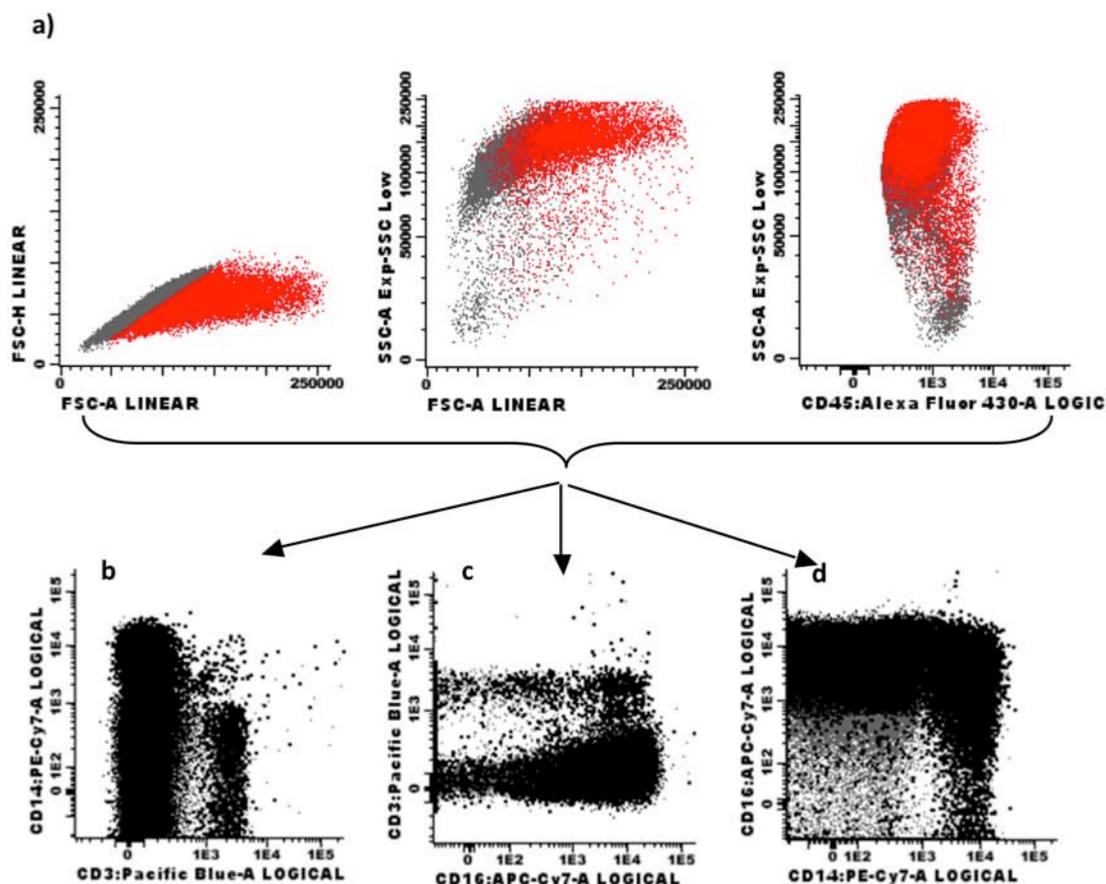


Figura 10. Algoritmo de identificación y caracterización de agregados leucocitarios. a) Utilizando las señales área (A) y pico (H) para el parámetro tamaño (FSC) se genera la gráfica que permite selección de eventos agregados. Con la visualización del patrón de tamaño (FSC) vs complejidad (SSC) y la expresión diferencial de CD45, se obtiene la población de leucocitos totales. b) Se proyectaron los agregados antes seleccionados y se proyectaron en gráficos con los marcadores de identificación de linfocitos T (CD3), monocitos (CD14) y neutrófilos (CD16).

Identificación de leucocitos por microscopía de campo claro

Se añadieron 600 μ L de solución de lisis (NH_4Cl 0.15M) 1x a 100 μ L de sangre periférica con la cual se incubó por 10 minutos a temperatura ambiente; se centrifugó a 528 x g (1500rpm) por 5 minutos y se decantó. Posteriormente se añadieron de nuevo 600 μ L de solución de lisis 1x, se incubó 10 minutos, se centrifugó a 528 x g por 5 minutos y se decantó. Se resuspendió el concentrado celular con 100 μ L de PBS y se realizó frotis en citocentrífuga (Aerospray[®] slide stainer, Wescor); se dejó secar y se tiñó con colorante de Wright (1 minuto con colorante, 3 minutos con agua desionizada); se

lavó con agua corriente, se eliminó el exceso de agua y se dejó secar para observarlo al microscopio (Leitz Laborlux s).

Análisis estadístico

Una vez determinadas las frecuencias de agregados, se aplicó la prueba de U de Mann Whitney para establecer si existen diferencias en las frecuencias entre los grupos de pacientes con sepsis y sujetos sanos. Se empleó el software GraphPad Prism v6.01 (La Jolla, CA, USA).

Resultados

Se realizó la recolección de muestras y datos clínicos de: 8 pacientes adultos con diagnóstico de sepsis, y 6 adultos sanos. Las características demográficas y clínicas de los pacientes se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Características demográficas y clínicas de los sujetos incluidos en el estudio

	<i>Sanos</i> (n=6)	<i>Sépticos</i> (n=8)
<i>Edad</i>	31±11	57±18
<i>Género F:M</i>	3:3	3:5
<i>FC (latidos/min)</i>	75±9	85±24
<i>FR (respiraciones/min)</i>	16±3	17±4
<i>Temperatura (°C)</i>	36	36±1
<i>PAM</i>	84±9	86±19
<i>APACHE II</i>	NA	19±12
<i>SOFA</i>	NA	10±6
<i>Sobrevivientes</i>	NA	7

NA: No Aplica. APACHE: Acute physiology and chronic health evaluation, SOFA: Sequential Organ Failure Assessment. FC: Frecuencia Cardiaca, FR: Frecuencia Respiratoria, PAM: Presión Arterial Media.

La Tabla 4 muestra algunos de los resultados de los análisis de laboratorio clínico recabados (biometría hemática) y de importancia para la valoración de los pacientes.

Tabla 4. Resultados de Biometría Hemática de los sujetos incluidos en el estudio.

	Sanos (n=6)	Sépticos (n=8)
Hemoglobina (g/dL)	16±2	10.44±2.34
Hematocrito (%)	49±7	31.05±6.76
Leucocitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	6.40±1.71	18.12±16.52
Neutrófilos ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	3.66±1.00	16.64±13.66
Linfocitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	1.99±0.66	1.00±0.70
Monocitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	0.48±0.14	1.38±2.13
Plaquetas ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	240±72	238±160

Los datos son expresados como la media \pm SD.

Posteriormente se trataron las muestras de sanos y sépticos de acuerdo al protocolo de “inmunofenotipo de sangre periférica” para así identificar y caracterizar las células individuales y los agregados leucocitarios, siguiendo la estrategia mostrada en la figura 10.

Después de aplicar la estrategia se observa un aumento en los eventos localizados en la zona de agregados, que se caracterizan por un 000aumento en el valor área, sin aumentar el valor pico del parámetro tamaño (FSC-A y FSC-H respectivamente). Se observa también que dichos eventos en el gráfico de tamaño vs complejidad se encuentran ampliamente distribuidos lo que ocasiona que frecuentemente algunos de éstos pueden confundirse con eventos individuales en este gráfico.

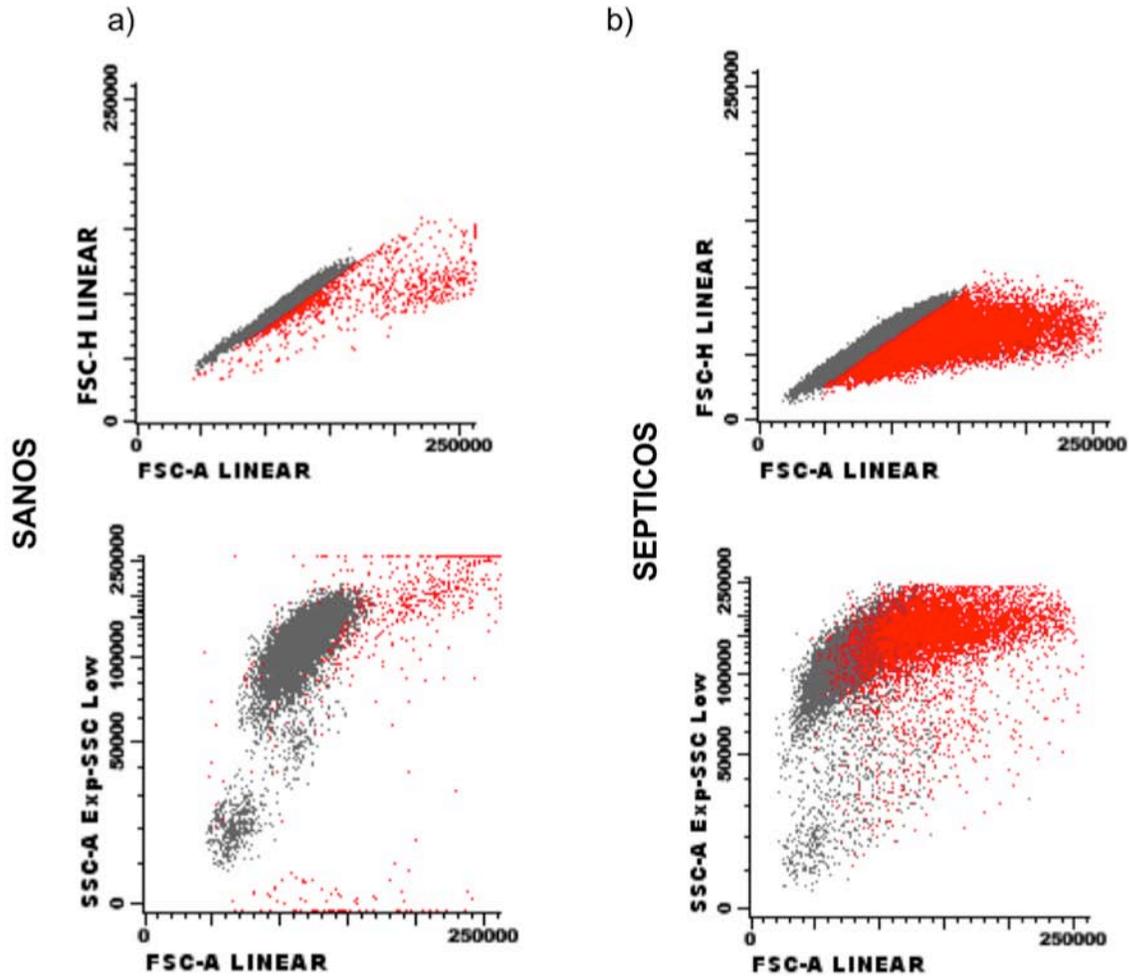


Figura 11. En pacientes con sepsis hay mayor cantidad de agregados. Se seleccionaron los eventos agregados e individuales, de los cuales se desplegaron gráficos FSC (tamaño) vs SSC (complejidad). a) En las muestras de sujetos sanos, son escasos los agregados que se visualizan, diferente de los sujetos con sepsis b), en los que se observa gran cantidad de eventos agregados. Se muestran gráficos representativos de dos sujetos, uno sano y uno con sepsis.

A partir de la selección de los agregados con la estrategia mencionada en materiales y métodos (Figura 10) en gráficos de puntos, se determinaron las frecuencias de células individuales y de agregados presentes tanto en sujetos sanos como en sujetos con sepsis, los cuales se muestran en la figura 12.

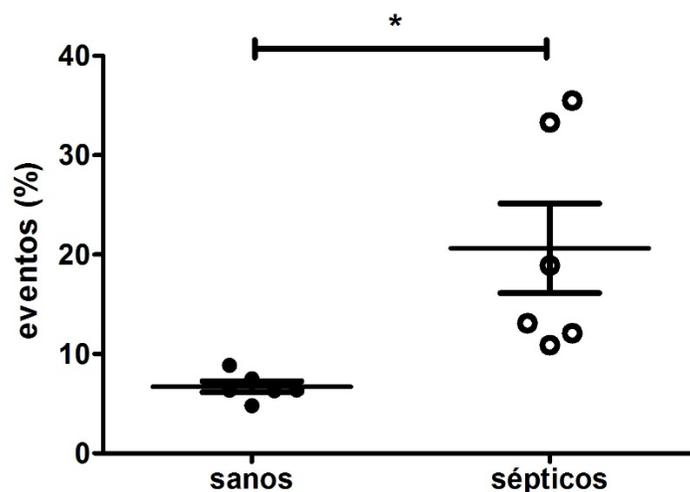


Figura 12. En pacientes con sepsis el porcentaje de agregados es significativamente mayor que en sanos. Se muestran los porcentajes de agregados en circulación de sujetos sanos (●, n=6) y sujetos con sepsis (○, n=6). Las barras en cada columna representan la media del grupo. Prueba estadística U de Mann-Whitney (* P<0.05).

De la zona de agregados, delimitada anteriormente en el gráfico FSC-A vs FSC-H, y utilizando marcadores de superficie se realizó la caracterización de leucocitos que se encuentran estructurando los agregados para evidenciar las células que se encuentran formándolos primordialmente (Tabla 5).

Tabla 5. Los neutrófilos son las células que primordialmente componen a los agregados leucocitarios en pacientes con sepsis.

MARCADORES	SANOS		SÉPTICOS		U Mann-Whitney
	% del total de agregados		% del total de agregados		
CD3-14-16+	78.17 ± 8.35	89.90 ± 2.87	ns		
CD3+14+16+	0.63 ± 0.25	0.23 ± 0.12	ns		
CD3+14-16+	3.37 ± 2.90	0.83 ± 0.31	ns		
CD3+14-16-	3.63 ± 3.35	0.37 ± 0.38	ns		
CD3-14+16-	11.73 ± 1.29	4.57 ± 4.80	ns		
CD3-14+16+	2.17 ± 1.54	3.87 ± 2.22	ns		
CD3+14+16-	0.30 ± 0.10	0.17 ± 0.15	ns		

Se muestra la media de los porcentajes de los agregados con los marcadores correspondientes ± la desviación estándar del grupo de sanos (n=3) y de pacientes con sepsis (n=3). Prueba estadística U de Mann-Whitney, p<0.05; ns=No significativa.

A partir del total de agregados, tanto en sujetos con sepsis como sanos, observamos que el marcador CD16 es el que se encuentra primordialmente presente hasta 89.9% de los casos, con ausencia de CD3 y CD14, lo cual sugiere que dichos agregados están compuestos principalmente de neutrófilos o células NK, que son los tipos celulares que expresan ampliamente dicho marcador. Los siguientes agregados más frecuentes, tanto en sujetos sanos como en pacientes sépticos son los que incluyen a CD14, es decir agregados que contienen monocitos.

Para corroborar la composición de los agregados, nos apoyamos de la técnica de microscopía de campo claro, para lo que se realizó un frotis de sangre periférica para ambos grupos como se describe en material y métodos.

En los resultados de las imágenes de microscopía se hace evidente el aumento en el número de agregados en sujetos con sepsis, así como del tamaño de estos agregados al estar conformados por un mayor número de células; fenómeno que no se observa en los sujetos sanos (Figura 13, 14 y Tabla 6).

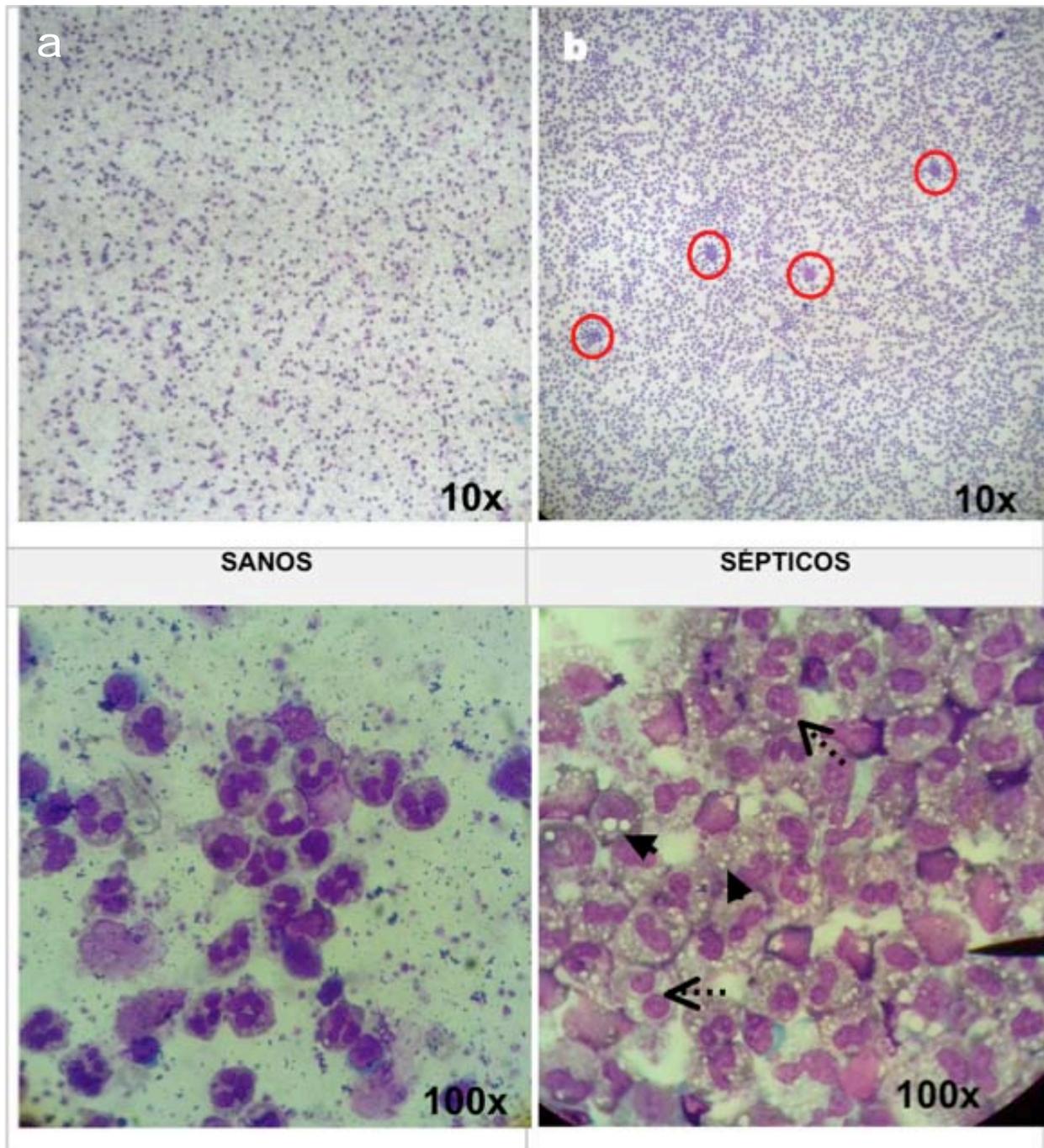


Figura 13. La cantidad de agregados y número de células que los conforman, aumenta en sujetos con sepsis. Se muestran imágenes de microscopía; en sujetos sanos a) la cantidad y tamaño de agregados (circulados en rojo) es menor a los observados en sujetos con sepsis b). En sujetos con sepsis, los neutrófilos presentan gran número vesículas (flechas), así como pseudo-pelger (flechas punteadas). Imágenes representativas de un sujeto sano y uno con sepsis.

Tabla 6. En pacientes con sepsis, el número de agregados y de células/agregado, es mayor comparado con sujetos sanos.

	Sanos (n=3)	Sépticos (n=4)	U de Mann-Whitney
No. de agregados	1±1	8±4	P=0.0571
Células/Agregado	9±4	47±22	P=0.0571

Se muestra la media del número de agregados, y del número de células/agregado ± la desviación estándar del grupo de sanos (n=3) y de pacientes con sepsis (n=4). Prueba estadística U de Mann-Whitney, P<0.05.

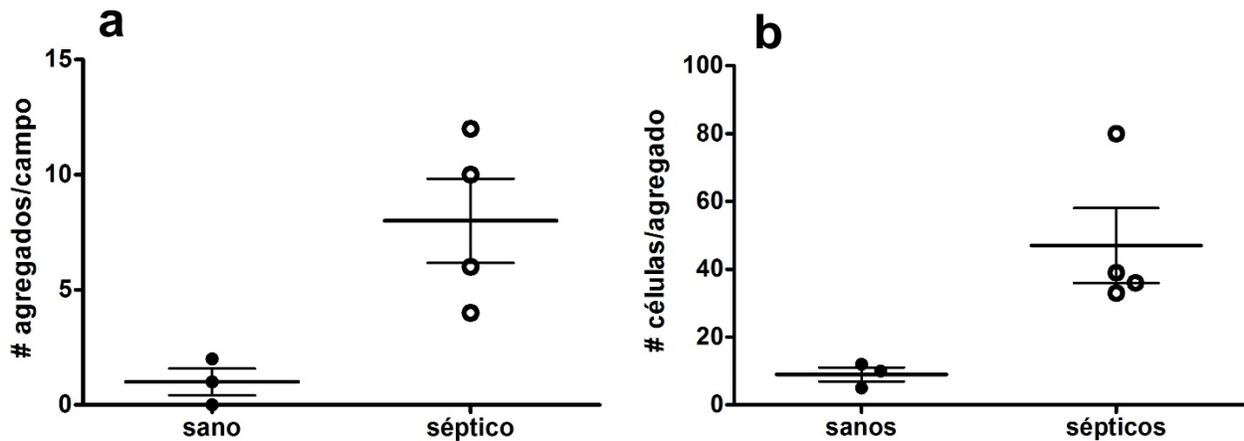


Figura 14. En pacientes con sepsis se incrementa el número de agregados. En los análisis por microscopía, se observa mayor cantidad de agregados en pacientes (a; $p=0.0571$); así mismo, estos agregados incrementan su tamaño al ser conformados por mayor número de células (b; $p=0.0571$). Se muestra el número de agregados en circulación de sujetos sanos (●, n=3) y sujetos con sepsis (○, n=6). Las barras en cada columna representan la media del grupo. Prueba estadística U de Mann-Whitney, P<0.05.

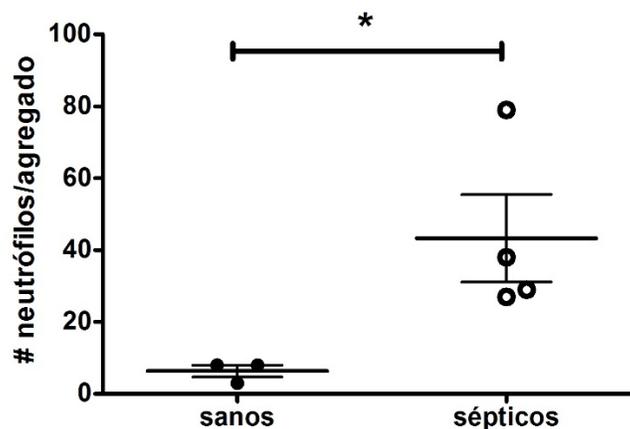


Figura 15. Los neutrófilos, son los principales componentes de los agregados. La cantidad de neutrófilos en agregados de sujetos con sepsis, aumenta considerablemente en comparación con sujetos sanos. Se muestra el número de neutrófilos presentes en agregados de sujetos sanos (●, n=3) y sujetos con sepsis (○, n=6). Las barras en cada columna representan la media del grupo. Prueba estadística U de Mann-Whitney, P<0.05.

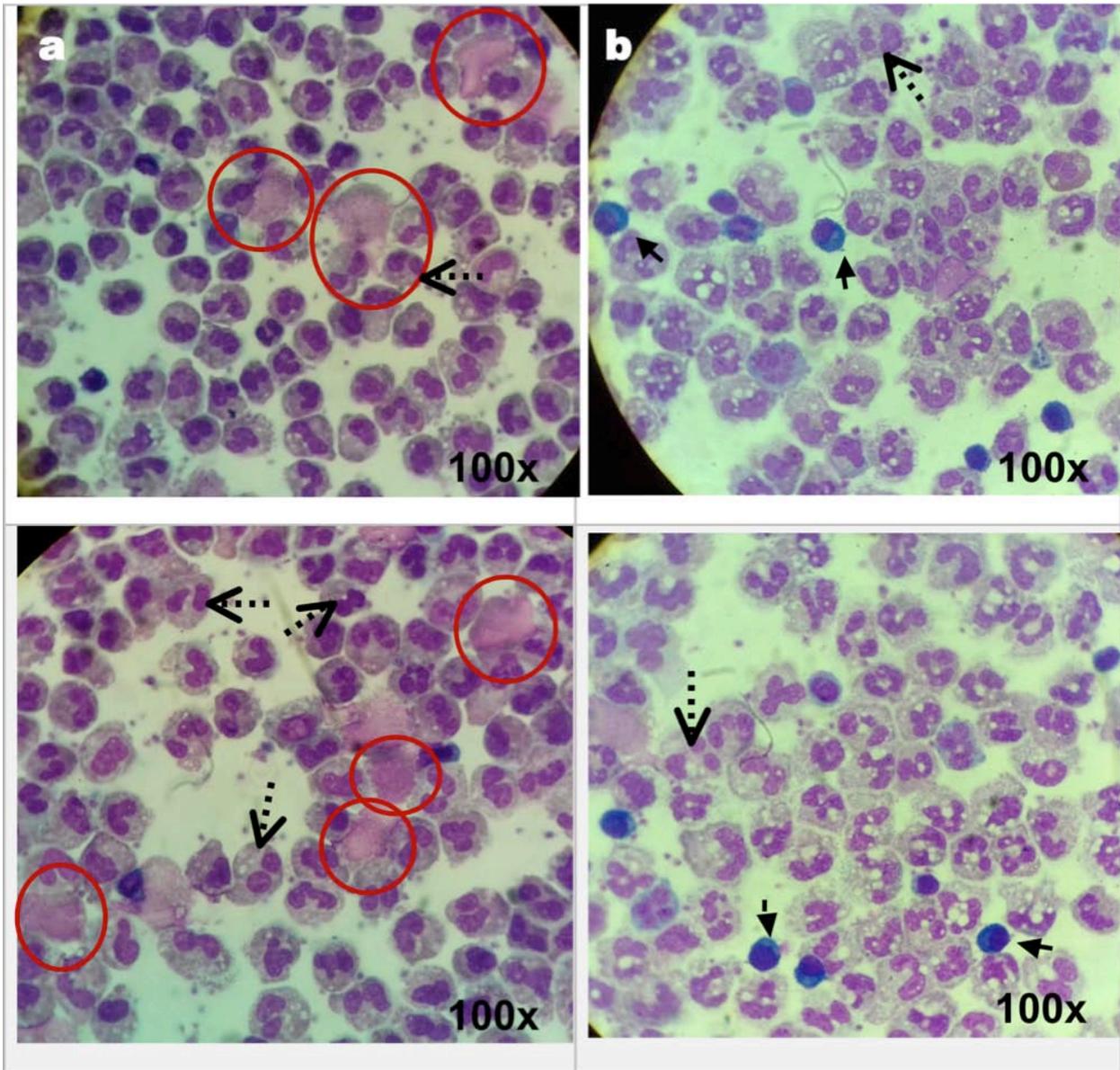


Figura 16. En sepsis los agregados se dan alrededor de células grandes, mononucleares y hay gran número de células plasmáticas. Se observan células grandes en el centro de los agregados (circuladas en rojo) y la presencia de células de morfología plasmática (flechas), así como varios eventos pseudo-pelger (flechas punteadas).

Observamos que los agregados presentes en sujetos con sepsis son formados por un mayor número de células sobre las cuales predominan los neutrófilos ya que son células que presentan un núcleo multilobulado, con granulación que no tiene afinidad por colorantes ácidos o básicos en particular; también se observa que los monocitos

alcanzan a visualizarse en pocas ocasiones, tanto en sujetos sanos como en sujetos con sepsis.

Importantemente las imágenes de agregados en los sujetos con sepsis muestran la presencia de células grandes mononucleares, de citoplasma amplio, pálido, con núcleo grande y de contornos irregulares, alrededor de las cuales se agregan en mayor medida los neutrófilos y algunos monocitos; de igual forma observamos que en pacientes existe un número considerable de células con morfología alargada, con núcleo excéntrico y una zona pálida perinuclear; parecidas a las células plasmáticas (linfocitos plasmacitoides), así como la manifestación de la anomalía pseudo-pelger.

Discusión

A nivel mundial, la sepsis constituye una de las primeras causas de morbi-mortalidad hospitalaria, reportándose 18 millones de casos al año^{36, 37}. Se estima que, aún en países altamente industrializados con unidades de cuidados intensivos que monitorizan constantemente a los pacientes, más de la mitad de todos los pacientes sépticos desarrollarán sepsis severa y un cuarto de ellos choque séptico. Esto eleva la tasa de mortalidad del 14.8% en las primeras 48 horas de la enfermedad³⁸ hasta 30-35% en casos de sepsis grave y 50% en choque séptico³⁹. Lo que convierte ésta patología en un problema de salud a nivel mundial, en la cual conocer las alteraciones que sufren los leucocitos de sangre periférica es de suma importancia para poder realizar un diagnóstico rápido y preciso, basado en el entendimiento de la fisiopatología y de todos los procesos implicados en ella, siendo que uno con uno se conectan para finalmente evidenciar los signos, síntomas y respuestas característicos de ella.

El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar un proceso que es típico en muestras de sangre periférica de sujetos con sepsis y choque séptico, como lo es la agregación de las células del tejido sanguíneo^{40, 41}.

Como ya se ha descrito antes, en procesos inflamatorios existe una interacción célula-célula aumentada debido al incremento en la expresión de moléculas de adhesión en la

superficie celular y plaquetaria, así como su presencia de manera soluble⁴²; de igual forma la activación de la cascada de coagulación es un inductor esencial del proceso de agregación, ya que las plaquetas, son iniciadoras e intermediarias de las interacciones celulares, siendo que muchas veces las encontramos formando puentes entre células⁴³.

De los sujetos incluidos en el estudio, se obtuvieron datos demográficos y signos vitales; aun cuando los pacientes presentan signos vitales dentro de los valores de referencia, es en los datos de la biometría hemática donde se encuentra disminución en el porcentaje de eritrocitos, aumento en número de leucocitos; así mismo los pacientes que presentan hipotensión ($PAM \leq 70\text{mmHg}$)⁴⁴, corresponden al grupo de sujetos con choque séptico.

Específicamente los sujetos con sepsis y choque séptico de este trabajo, presentan leucocitosis, debido a un aumento en el número de neutrófilos primordialmente (neutrofilia); también se encuentran valores elevados de monocitos (monocitosis) y en algunos casos encontramos disminución de linfocitos (linfopenia); otro dato importante es el cambio en los valores plaquetarios (Tabla 4).

Para la evaluación de las muestras se llevaron a cabo protocolos relacionados con citometría de flujo, mediante la cual obtuvimos también, valores totales y frecuencias de leucocitos y sus poblaciones, identificados por medio de gráficos de tamaño (FSC) vs complejidad (SSC) y la expresión de marcadores específicos. (Figura 10)

Mediante el análisis de estos datos obtenidos por citometría observamos que en pacientes con sepsis existe una mayor cantidad de agregados (Figura 11), los cuales característicamente se presentan en el gráfico FSC-A (tamaño-área) vs FSC-H (tamaño-pico) al aumentarse el valor área de este parámetro. Este efecto sucede cuando dos o más células pasan juntas frente al detector; el valor pico no aumenta debido a que las células tienen un diámetro constante (no aumentan su tamaño), así la señal pico se da cuando la parte central de la célula es detectada, sin embargo el valor área aumenta porque apenas la primer célula sale de la zona de detección, la siguiente es detectada, por lo que el pulso creado es continuo, creando gráficamente dos campanas de Gauss unidas, por lo que el valor del área bajo la curva es mayor⁴⁵.

Estos agregados al desplegarse en una gráfica de tamaño vs complejidad se disponen dentro de la zona de leucocitos o desplazadas hacia la derecha pero aun siguiendo el patrón de distribución leucocitaria, lo que usualmente dificulta la detección de los eventos individuales, sobre todo en muestras de sujetos con sepsis por el incremento en la frecuencia de los eventos agregados.

Esta frecuencia es significativamente mayor que en sanos (Figura 12), con una $p < 0.05$, indicando que la formación de los agregados es un proceso típico de los pacientes con sepsis y/o choque séptico. Posteriormente se caracterizaron las células que se encontraban formando los agregados por medio de la expresión de CD3, CD14 y CD16. Se determinó el tipo de células que se encuentran en ellos, usando gráficos de CD3 vs CD 14, CD16 vs CD3, y CD14 vs CD 16; a partir de ellos encontramos que los neutrófilos son las células que primordialmente componen a los agregados leucocitarios (CD3-14-16+); este fenómeno se observa en ambos grupos, lo que se explica debido a que los neutrófilos son las células del sistema inmune más abundantes en sangre periférica (Tabla 5), aunque la expresión de CD16 puede deberse también a la presencia de células NK, NKT o monocitos no clásicos.

El siguiente tipo de agregados que predominan son los formados por monocitos (CD3-14+16-) y por último los conformados por monocitos y neutrófilos (CD3-14+16+); de forma distintiva en sujetos sanos encontramos la presencia de agregados formados por linfocitos y monocitos (CD3+14-16+), así como de los formados por linfocitos únicamente (CD3+14-16-); este tipo de agregados en sujetos con sepsis son escasos, lo que puede deberse a la linfopenia que desarrollan los pacientes⁴⁶; aun así, no se encontró significancia entre la frecuencia de las subpoblaciones de sujetos sanos y sujetos con sepsis debido a la cantidad de sujetos de estudio en cada grupo, así como la distribución heterogénea de los datos de cada uno.

Anteriormente se sabía que las plaquetas se unen al activarse a monocitos y neutrófilos mediante ligandos específicos como P- selectina (CD62P), el cual esta expresado en la superficie de plaquetas⁴⁷, sin embargo monocitos y neutrófilos podrían unirse también a plaquetas no activadas, con una menor afinidad y de manera independiente a la expresión de P-selectina⁴⁸, lo que explicaría la aparición de agregados leucocitarios en muestras de sujetos sanos; por el lado contrario, la mayoría de los linfocitos no se unen

a plaquetas. Estas interacciones plaqueta-leucocito exacerbaban la activación de neutrófilos, así como el cambio hacia fenotipo pro-inflamatorio de monocitos (monocitos intermedios), que a su vez, aumentan la capacidad de estas células para interactuar o adherirse⁴⁹.

Para comprobar lo observado por citometría de flujo, hicimos uso de microscopía mediante el protocolo descrito en materiales y métodos para visualizar los agregados, y determinar mediante morfología, las células que los componen.

Primero se realizó conteo por campo de los agregados para ambos grupos y posteriormente se determinó el número de células que se encontraban estructurando los agregados (Figura 13), a partir de lo cual observamos que la cantidad de agregados y número de células que conforman los agregados, aumenta en sujetos con sepsis. Al analizar los frotis a través del objetivo 10x, los agregados de sujetos con sepsis fueron fácilmente identificados debido al gran tamaño que estos presentan; por otro lado, al analizarlos mediante el objetivo de inmersión (100x) podemos decir que el tamaño de los agregados es directamente proporcional a la cantidad de células en ellos.

En las muestras de sujetos con sepsis se observó también que la mayor parte de los neutrófilos presentan marcada vacuolización, que puede deberse a la liberación de citocinas o así mismo a la intoxicación que sufren estos pacientes al tener una terapia de antibióticos variada⁵⁰; de igual forma observamos en neutrófilos de pacientes, la manifestación de pseudo-pelger, que trata de una anomalía en la segmentación del núcleo de granulocitos pero que no implica problemas funcionales de la célula y que se debe a la rápida diferenciación y maduración de la serie granulocítica por la alta demanda que se presenta en los procesos infecciosos para la resolución del mismo⁵¹.

En cuanto a los conteos por campo de número de agregados y células por agregado, se realizaron análisis estadísticos (Tabla 6, Figura 14) los cuales nos dicen que, efectivamente, en pacientes con sepsis, el número de agregados y de células/agregado, es mayor comparado con sujetos sanos. En este caso no existe una diferencia significativa entre los dos grupos debido al pequeño número de sujetos involucrados en el estudio, sin embargo el valor de p se encuentra en el límite para poder considerar los resultados con significancia entre ellos⁵².

También determinamos por morfología, la población de células predominantes en los agregados (Figura 15), a partir de lo cual elucidamos que son los neutrófilos los principales componentes de los agregados, lo cual correlaciona con la neutrofilia manifiesta de los pacientes, y que habríamos observado en trabajos previos⁵³.

Por otro lado, la etiología del proceso infeccioso no siempre se conoce, por lo existen así mismo diferencias entre pacientes, las cuales a su vez pueden estar relacionadas con las comorbilidades que pueda presentar cada uno de ellos⁵⁴. Observamos en algunas muestras de sujetos sépticos, que había presencia de células grandes, mononucleares alrededor de las cuales se forman los agregados; de igual forma se observó en un paciente la presencia de gran número de células de morfología plasmacitoide (Figura 16). Las características morfológicas de la figura 16 sugieren que se trata de macrófagos, aunque no se puede descartar que se trate de células de estadios de maduración previos, como promielocitos, mielocitos o metamielocitos. En cuanto a la figura 16.b, su morfología es compatible con la descrita para células plasmáticas, comparadas con las que se observa en médula ósea⁵⁵. En el compartimento de médula ósea, estas células plasmáticas son linfocitos atípicos, que se relacionan con un proceso de división celular incompleto por parte de células plasmáticas, debido a un fuerte estímulo antigénico, lo cual sugiere que se puede distribuir a médula ósea el agente infeccioso o bien que podrían estar infiltrando a médula ósea estas células, como se ha observado que puede ocurrir en procesos neoplásicos⁵⁶.

Conclusión

La formación de agregados leucocitarios en pacientes con sepsis requiere de la participación de células mieloides.

Referencias

1. Karpman, D. *et al.* Complement Interactions with Blood Cells, Endothelial Cells and Microvesicles in Thrombotic and Inflammatory Conditions. *Advances in experimental medicine and biology* **865**, 19-42 (2015).
2. Zawrotniak, M. & Rapala-Kozik, M. Neutrophil extracellular traps (NETs) - formation and implications. *Acta biochimica Polonica* **60**, 277-284 (2013).
3. Schlickeiser, S., Streitz, M. & Sawitzki, B. Standardized Multi-Color Flow Cytometry and Computational Biomarker Discovery. *Methods Mol Biol* **1371**, 225-238 (2016).
4. Manascero, A.R. *Hematología herramienta para el diagnóstico: atlas de morfología celular, alteraciones y enfermedades relacionadas*, Vol. 1. (Pontificia Universidad Javeriana. Biblioteca Central, 2003).
5. Saavedra, J.S. *Texto Atlas de Histología Biología Celular y Tisular*. (Mc. Graw Hill, 2012).
6. Carr., J.H. & Rodak, B.F. *Atlas de Hematología Clínica*, Edn. 3a. (Editorial Médica Panamericana, 2009).
7. Naranjo, C.B. *Atlas de Hematología. Células Sanguíneas*, Edn. 2a. (UCM, 2008).
8. Knowles, D.M. Neoplastic Hematopathology, in, Edn. 2nd 915-927 (Lippincott Williams & Wilkins, 2001).
9. d'Onofrio, G. & Zini, G. *Morphology of Blood Disorders*, Edn. 2a. (Wiley Blackwell, 2015).
10. Bruce A. Chabner; Thomas J. Lynch, J. & Longo., D.L. *Harrison. Manual de Oncología*. (Mc Graw Hill, 2009).
11. Takeuchi, O. & Akira, S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* **140**, 805-820 (2010).
12. Medzhitov, R. Inflammation 2010: new adventures of an old flame. *Cell* **140**, 771-776 (2010).
13. Chen, C.J. *et al.* Identification of a key pathway required for the sterile inflammatory response triggered by dying cells. *Nature medicine* **13**, 851-856 (2007).
14. Thomas, M.R. & Storey, R.F. The role of platelets in inflammation. *Thrombosis and haemostasis* **114**, 449-458 (2015).
15. Soehnlein, O. & Lindbom, L. Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation. *Nature reviews. Immunology* **10**, 427-439 (2010).
16. Serhan, C.N., Chiang, N. & Van Dyke, T.E. Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. *Nature reviews. Immunology* **8**, 349-361 (2008).
17. Serhan, C.N. & Savill, J. Resolution of inflammation: the beginning programs the end. *Nature immunology* **6**, 1191-1197 (2005).
18. Bannenberg, G.L. *et al.* Molecular circuits of resolution: formation and actions of resolvins and protectins. *J Immunol* **174**, 4345-4355 (2005).
19. Gruys, E., Toussaint, M.J., Niewold, T.A. & Koopmans, S.J. Acute phase reaction and acute phase proteins. *Journal of Zhejiang University. Science. B* **6**, 1045-1056 (2005).
20. 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).
21. Schouten, M., Wiersinga, W.J., Levi, M. & van der Poll, T. Inflammation, endothelium, and coagulation in sepsis. *Journal of leukocyte biology* **83**, 536-545 (2008).
22. J, D.M. Síndrome de respuesta inflamatoria sistémica. Aspectos fisiopatológicos. *Revista de la Asociación Mexicana de Medicina Crítica y Terapia Interna* **23**, 225-233 (2009).
23. Deutschman, C.S. & Tracey, K.J. Sepsis: current dogma and new perspectives. *Immunity* **40**, 463-475 (2014).

24. Hoesel, L.M., Gao, H. & Ward, P.A. New insights into cellular mechanisms during sepsis. *Immunologic research* **34**, 133-141 (2006).
25. Berliner, A.S. *et al.* Combined leukocyte and erythrocyte aggregation in the peripheral venous blood during sepsis. An indication of commonly shared adhesive protein(s). *International journal of clinical & laboratory research* **30**, 27-31 (2000).
26. Yodice, P.C., Astiz, M.E., Kurian, B.M., Lin, R.Y. & Rackow, E.C. Neutrophil rheologic changes in septic shock. *American journal of respiratory and critical care medicine* **155**, 38-42 (1997).
27. Andrews, R.K., Arthur, J.F. & Gardiner, E. Neutrophil extracellular traps (NETs) and the role of platelets in infection. *Thrombosis and haemostasis* **112** (2014).
28. Evangelista, V. *et al.* Platelet/polymorphonuclear leukocyte interaction in dynamic conditions: evidence of adhesion cascade and cross talk between P-selectin and the beta 2 integrin CD11b/CD18. *Blood* **88**, 4183-4194 (1996).
29. Kirschenbaum, L.A., Aziz, M., Astiz, M.E., Saha, D.C. & Rackow, E.C. Influence of rheologic changes and platelet-neutrophil interactions on cell filtration in sepsis. *American journal of respiratory and critical care medicine* **161**, 1602-1607 (2000).
30. Li, N. Platelet-lymphocyte cross-talk. *Journal of leukocyte biology* **83**, 1069-1078 (2008).
31. Dominical, V.M. *et al.* Prominent role of platelets in the formation of circulating neutrophil-red cell heterocellular aggregates in sickle cell anemia. *Haematologica* **99**, e214-217 (2014).
32. Golden, J.B. *et al.* Chronic Psoriatic Skin Inflammation Leads to Increased Monocyte Adhesion and Aggregation. *J Immunol* **195**, 2006-2018 (2015).
33. Wilson, C.B. An updated Declaration of Helsinki will provide more protection. *Nature medicine* **19**, 664 (2013).
34. Shaw, D. & McMahon, A. Ethicovigilance in clinical trials. *Bioethics* **27**, 508-513 (2013).
35. Vollmer, S.H. & Howard, G. Statistical power, the Belmont report, and the ethics of clinical trials. *Science and engineering ethics* **16**, 675-691 (2010).
36. Jolley, R.J., Yergens, D.W., Quan, H. & Doig, C.J. Physician recognition and documentation of sepsis. a comparison of the 2001 accp/sccm consensus conference definitions and physician documented diagnosis. *Intensive care medicine experimental* **3**, A224 (2015).
37. Seymour, C.W. *et al.* Assessment of Clinical Criteria for Sepsis: For the Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *Jama* **315**, 762-774 (2016).
38. Blanco, J. *et al.* Incidence, organ dysfunction and mortality in severe sepsis: a Spanish multicentre study. *Crit Care* **12**, R158 (2008).
39. Dellinger, R.P. *et al.* Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2008. *Critical care medicine* **36**, 296-327 (2008).
40. Astiz, M.E., DeGent, G.E., Lin, R.Y. & Rackow, E.C. Microvascular function and rheologic changes in hyperdynamic sepsis. *Critical care medicine* **23**, 265-271 (1995).
41. Rimmele, T. *et al.* Leukocyte capture and modulation of cell-mediated immunity during human sepsis: an ex vivo study. *Crit Care* **17**, R59 (2013).
42. Lindemann, S. *et al.* Activated platelets mediate inflammatory signaling by regulated interleukin 1beta synthesis. *The Journal of cell biology* **154**, 485-490 (2001).
43. Jy, W., Mao, W.W., Horstman, L., Tao, J. & Ahn, Y.S. Platelet microparticles bind, activate and aggregate neutrophils in vitro. *Blood cells, molecules & diseases* **21**, 217-231; discussion 231a (1995).
44. Singer, M. *et al.* The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *Jama* **315**, 801-810 (2016).
45. Hawley, T.S. & Hawley, R.G. Flow Cytometry: An Introduction, in *Flow Cytometry Protocols*, Edn. 3a 1-312(2011).
46. Rimmele, T. *et al.* Immune Cell Phenotype and Function in Sepsis. *Shock* **45**, 282-291 (2016).

47. Mine, S., Fujisaki, T., Suematsu, M. & Tanaka, Y. Activated platelets and endothelial cell interaction with neutrophils under flow conditions. *Intern Med* **40**, 1085-1092 (2001).
48. Rinder, H.M., Bonan, J.L., Rinder, C.S., Ault, K.A. & Smith, B.R. Activated and unactivated platelet adhesion to monocytes and neutrophils. *Blood* **78**, 1760-1769 (1991).
49. Passacquale, G. *et al.* Monocyte-platelet interaction induces a pro-inflammatory phenotype in circulating monocytes. *PloS one* **6**, e25595 (2011).
50. Tapper, H. The secretion of preformed granules by macrophages and neutrophils. *Journal of leukocyte biology* **59**, 613-622 (1996).
51. Austein, T. & Seevers, R. Acquired pseudo-Pelger-Huet anomaly under maintenance therapy with rituximab in follicular lymphoma. *European journal of haematology* **93**, 88 (2014).
52. Zeltser, D. *et al.* The leukocyte adhesiveness/aggregation test as an inflammation-related, plasma-dependent agglutination phenomenon. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation* **58**, 593-601 (1998).
53. Mejía, L.A.F. in Secretaría de investigación y posgrado. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Sección de estudios de Posgrado e investigación. Programa de posgrado en Inmunología, Vol. Maestría en Ciencias en Inmunología 77 (Instituto Politécnico Nacional, 2013).
54. Iskander, K.N. *et al.* Sepsis: multiple abnormalities, heterogeneous responses, and evolving understanding. *Physiological reviews* **93**, 1247-1288 (2013).
55. Owen, J.a., Punt, J. & Stanford, S.A. *Inmunología*, Edn. 7a. (Mc Graw Hill, 2014).
56. Kalele, K.P., Patil, K.P., Nayyar, A.S. & Sasane, R.S. Atypical Lymphocytes and Cellular Cannibalism: A Phenomenon, First of its Kind to be Discovered in Chronic Periapical Lesions. *Journal of clinical and diagnostic research : JCDR* **10**, ZC01-04 (2016).

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:

“Caracterización inmunofenotípica de leucocitos circulantes en 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:

Identificar el inmunofenotipo de leucocitos circulantes con valor pronóstico en pacientes adultos con 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 mí familiar o representado en el estudio, que son los siguientes:

Las molestias durante la toma de muestra de sangre son mínimas. En algunas ocasiones el procedimiento para tomarle una muestra de sangre puede causar un poco de dolor o una discreta molestia, es posible que se le pueda formar un moretón. En algunas ocasiones se evitará lo anterior tomando la muestra de un catéter subclavio que previamente los médicos especialistas del servicio tratante, le colocarán como parte de su tratamiento médico.

1. Posibles beneficios que recibirá al participar en el estudio.

Si bien los beneficios directos para usted pudieran no existir, los resultados del presente estudio contribuirán al avance en el conocimiento de la fisiopatología de la sepsis o los resultados de este estudio brindarán información relevante para el mejor manejo de personas como usted; o brindará información de gran utilidad para futuros programas de tratamiento para pacientes con problemas relacionados.

El investigador responsable se ha comprometido a darme información oportuna sobre cualquier procedimiento alternativo adecuado que pudiera ser ventajoso para mí tratamiento (en su caso), así como a responder cualquier pregunta y aclarar cualquier duda que le plantee acerca de los procedimientos que se llevarán a cabo, los riesgos, beneficios o cualquier otro asunto relacionado con la investigación o con mí tratamiento (en su caso).

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

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

comprometido a proporcionarme la información actualizada que se obtenga durante el estudio, aunque esta pudiera cambiar mi parecer respecto a mí permanencia en el mismo.

_____ Dra. Lourdes Andrea Arriaga Pizano
Nombre y Firma del Participante Nombre, Firma, Matrícula del Investigador

Datos de contacto del Participante y/o Responsable (dirección y teléfonos)

Nombre y Firma persona que obtuvo el consentimiento informado.

Número (s) telefónico(s) al (los) cual(es) puede comunicarse en caso de presentarse emergencias, dudas o preguntas relacionadas con el estudio: 9:00 a 16:00 horas, de lunes a viernes a los teléfonos: 56276915, en la Unidad de Investigación Médica en Inmunoquímica, en el primer piso del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI del IMSS, con la Dra. Lourdes A. Arriaga Pizano.

Mi firma como testigo certifica que el/la participante o tutor, firmó este formato de consentimiento informado en mi presencia, de manera voluntaria.

Nombre y Firma del Testigo (Parentesco con participante y Fecha)

Nombre y Firma del Testigo (Parentesco con participante y Fecha)

ANEXO 2

Hospital de Especialidades

Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS

Unidad de Investigación Médica en Inmunoquímica

Protocolo: Validación de un panel biomarcador para el diagnóstico y pronóstico de sepsis, basado en la inmunofenotipificación de leucocitos circulantes humanos

Ficha de identificación

Nombre							Filiación		No. De Paciente	
Fecha de hospitalización	Fecha de egreso de Hospitalización	Días de estancia intrahospitalaria	Ingreso a UCI	Fecha de ingreso a UCI	Fecha de egreso de UCI	Días de estancia en UCI	INICIALES			
			Si / No				Procedencia (Hospital, Domicilio)			
Diagnóstico de ingreso								Sexo		
								Edad		
								Peso		
								Talla		
Sistema afectado que desencadenó SIRS / SEPSIS										

De la Muestra

Fecha de diagnóstico de SIRS	Severidad a la toma de muestra	Días transcurridos desde inicio de SIRS hasta toma de muestra	Días transcurridos desde inicio de SEPSIS hasta toma de muestra

Antecedentes Médicos

	Si / No	Años	Tratamiento		Si / No	Años	Tratamiento
DM				Cardiopatía isquémica			
Hipertensión				Cáncer			
Traumáticos				Toxicomanías			
Quirúrgicos				Otros			

Padecimiento Actual

Diagnóstico	Comentario
1.-	
2.-	
3.-	
4.-	

SIRS

Fecha	Frecuencia Cardíaca	Frecuencia Respiratoria	Temperatura	Leucocitosis	T/A
Antibioticoterapia Empírica	Si / NO	Especificar			

SEPSIS

Foco de inicio	Sepsis de origen hospitalario	SI / NO	Cultivo Positivo	Si / No	
Tipo de muestra	Patógenos	Comentario / Sensibilidad			
Presento Sepsis grave	Si / No	Tiempo de duración		Numero de órganos afectados	
Presento choque séptico	Si / No	Tratamiento	Quirúrgico	Antibioticoterapia	Antibiótico usado

Gravedad al momento de toma de muestra

	Puntaje
APACHE II	
SOFA	
SAPS	
MODS	

Evolución Final

Curación Total	Motivo de egreso
	Mejoría
Si	Curación total
No	Envío a otro centro Hospitalario
Defunción	Muerte tiene relación a proceso Infeccioso
Si	Si
No	No

Laboratoriales

Fecha	%Monos	Col T	AST	Amilasa	Gasometría
ERITROS	%Eos	Trigl	ALT	Lipasa	PH
HB	%Bas	PT	GGT	Glu	FI02
HTO	#Neos	Albumina	DHL	UREA	PO2
Plt	#LINFOS	Globulina	FA	CREAT	PCO2
Leucos T	#Monos	BT	Na	TP	HCO3
%Neos	#Eos	BD	K	TTP	BE
%LINFOS	#Bas	BI	Ca	INR	LACTATO