



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
FACULTAD DE MEDICINA

**“ANÁLISIS FENOTÍPICO Y FUNCIONAL DE LEUCOCITOS
CIRCULANTES EN PACIENTES ADULTOS CON SIRS/SEPSIS”**

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:
LUIS ANGEL FLORES MEJÍA

DIRECTOR DE TESIS
DRA. LOURDES ANDREA ARRIAGA PIZANO
FACULTAD DE MEDICINA
UNIDAD MÉDICA DE INVESTIGACIÓN EN INMUNOQUÍMICA DEL INSTITUTO
MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
COMITÉ TUTOR
DRA. ROSANA PELAYO CAMACHO
FACULTAD DE MEDICINA
CENTRO DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA ORIENTE DEL INSTITUTO MEXICANO
DEL SEGURO SOCIAL
DR. ALEJANDRO ESCOBAR GÜTIERREZ
FACULTAD DE MEDICINA
COORDINACIÓN DE INVESTIGACIONES INMUNOLÓGICAS. INSTITUTO DE
DIAGNÓSTICO Y REFERENCIA EPIDEMIOLÓGICOS

CIUDAD DE MÉXICO, OCTUBRE 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

El trabajo experimental de esta tesis se llevó a cabo en la Unidad de Investigación Médica en Inmunoquímica del Hospital de Especialidades, Centro Médico Nacional Siglo XXI del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), bajo la dirección de la **Dra. Lourdes Andrea Arriaga Pizano**

Este trabajo fue financiado por el Consejo de Ciencia y Tecnología del Distrito Federal con el número de proyecto SALUD-2013-01-202621 y por el Instituto Mexicano del Seguro Social con el proyecto FIS/IMSS/PROT/G15/1484, ambos financiamientos otorgados a la Dra. Lourdes Andrea Arriaga Pizano.

El sustentante fue becario de Conacyt durante sus estudios con el número **257960** y agradece el apoyo recibido del Programa para la Realización de Maestría y Doctorado en ciencias en el área de la salud del IMSS matrícula **99096705**.

AGRADECIMIENTOS

ÍNDICE GENERAL

Índice de figuras	iii
Índice de tablas	iv
Abreviaturas	v
Resumen	vii
Abstract	ix
I. Introducción	1
<i>Respuesta inflamatoria</i>	1
<i>Respuesta inflamatoria sistémica (SIRS/sepsis)</i>	5
<i>Alteraciones en leucocitos debido a fases pro/anti- inflamatorias en SIRS/sepsis</i> ...	7
<i>Justificación</i>	10
<i>Pregunta de investigación</i>	11
<i>Hipótesis</i>	11
<i>Objetivo general</i>	11
<i>Objetivos particulares</i>	12
II. Material y métodos	12
<i>Aspectos éticos</i>	12
<i>Recolección de muestras</i>	13
<i>Recolección de datos clínicos</i>	13
<i>Cuantificación de citocinas solubles en suero</i>	13
<i>Inmunofenotipificación de leucocitos de sangre periférica utilizando citometría de flujo</i>	14
<i>Evaluación de la capacidad opsono-fagocítica de monocitos y granulocitos</i>	16
<i>Evaluación de la eliminación bacteriana en leucocitos de sangre periférica</i>	17
<i>Determinación de la respuesta a LPS y citocinas: detección de fosfoproteínas en células individuales</i>	18
<i>Análisis estadístico</i>	18
<i>Diseño del estudio</i>	19
<i>Universo de trabajo</i>	19
<i>Criterios de inclusión</i>	19

<i>Criterios de no inclusión pacientes sépticos</i>	19
<i>Criterio de exclusión</i>	20
<i>Criterios de eliminación</i>	20
<i>Variables del estudio</i>	20
<i>Definición de las variables</i>	21
III. Resultados	22
<i>Sujetos incluidos</i>	22
<i>Cuantificación de citocinas séricas</i>	23
<i>Inmunofenotipo de activación de leucocitos</i>	26
<i>Expresión de CD107a</i>	28
<i>Análisis de correlación múltiple y redes</i>	29
<i>Evaluación de la capacidad endo-fagocítica en monocitos-neutrófilos de pacientes con SIRS/sepsis</i>	38
<i>Evaluación de fosfoproteínas a nivel unicelular</i>	42
IV. Discusión	46
V. Conclusiones	54
VI. Perspectivas	55
VII. Referencias	56
VIII. Anexos.....	63

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1. Evaluación de la capacidad de internalización bacteriana para monocitos y neutrófilos a 4°C y 37°C</i>	17
<i>Figura 2. En pacientes con SIRS y sepsis la hipercitocinemia incluye componentes pro y anti- inflamatorios</i>	23
<i>Figura 3. En suero de pacientes con SIRS/sepsis el ambiente de citocinas es mixto</i> ..	25
<i>Figura 4. Neutrofilia y monocitosis en sujetos SIRS y Sepsis respecto a sujetos sanos</i>	26
<i>Figura 5. Monocitos de pacientes con sepsis presentan inmunofenotipo de activación</i>	27
<i>Figura 6. Neutrófilos de pacientes con sepsis presentan inmunofenotipo de activación</i>	28
<i>Figura 7. Monocitos y neutrófilos de pacientes con sepsis sobre-expresan CD107a</i> ...	29
<i>Figura 8. Matriz de correlación datos clínicos y citocinas séricas con marcadores de superficie en monocitos circulantes</i>	30
<i>Figura 9. Disminución en la expresión de CD64 en monocitos circulantes conforme aumenta la edad</i>	31
<i>Figura 10. Menor expresión de HLA-DR, a mayores niveles séricos de IL-1β</i>	32
<i>Figura 11. Análisis de redes entre marcadores en monocitos, citocinas séricas, variables hemodinámicas y de severidad</i>	33
<i>Figura 12. Matriz de correlación datos clínicos y citocinas séricas con marcadores de superficie en neutrófilos circulantes</i>	34
<i>Figura 13. Menor expresión de CCR7 en neutrófilos, a mayores niveles séricos de IL-1β</i>	35
<i>Figura 14. Incremento de CD107a y TREM-1, respecto a elevados niveles de CD69 en neutrófilos</i>	35

<i>Figura 15. Mayor expresión de CD16, cuando se encuentra elevada la degranulación (CD107a^{hi})</i>	36
<i>Figura 16. Análisis de redes entre marcadores en neutrófilos, citocinas séricas, variables hemodinámicas y de severidad</i>	37
<i>Figura 17. Degranulación en pacientes con inflamación sistémica SIRS/sepsis en comparación con sujetos sanos</i>	39
<i>Figura 18. Neutrófilos y monocitos de paciente son capaces de internalizar E. coli-pH Green</i>	40
<i>Figura 19. La eliminación bacteriana por los leucocitos disminuye en sepsis</i>	42
<i>Figura 20. Pacientes con SIRS/sepsis disminuyen la activación de la vía de señalización de p38</i>	43
<i>Figura 21. Pacientes con sepsis activan menos la vía de señalización de pSTAT3 en respuesta a IL-10</i>	44
<i>Figura 22. No existe alteración en la activación de la vía de señalización de pSTAT5 en pacientes con inflamación sistémica</i>	45

ÍNDICE DE TABLAS

<i>Tabla 1. Criterios diagnósticos de SIRS</i>	5
<i>Tabla 2: Panel de anticuerpos utilizados para la inmunofenotipificación</i>	15
<i>Tabla 3. Datos demográficos y parámetros clínicos de los pacientes</i>	22

ABREVIATURAS

ACCP	<i>American College of Clinical Pharmacy</i>
APACHE	<i>Acute Physiology and Chronic Health Evaluation</i>
APC	<i>Allophycocyanin.</i> (Alofococianina)
CARS	<i>Compensatory Anti-Inflammatory Response Syndrome.</i> (Síndrome de Respuesta Anti-inflamatoria Compensatoria)
CBA	<i>Cytometric Bead Array</i> (Arreglos citrométicos en perlas)
CCR7	<i>C-C chemokine receptor type 7</i> (Receptor tipo 7 para quimiocinas C-C)
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CMN	Centro Médico Nacional
CRP	<i>C Reactive Protein</i> (Proteína C reactiva)
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
FACS	<i>Fluorescence-Activated Cell Sorter</i>
FC	Frecuencia respiratoria
Fc	Fracción cristalizable de los anticuerpos
FSC	<i>Forward Scatter Detector</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FITC	<i>Fluorecein Isothiocyanate</i> (Isothiocyanato de fluoreceina)
FR	Frecuencia respiratoria
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i> (Virus de Inmunodeficiencia Humana)
HLA	<i>Human Leucocyte Antigen</i> (Antígeno Leucocitario Humano)
HMGB1	<i>High mobility group box 1</i>
IFN	Interferón
IL	Interleucina
IL-1Ra	<i>IL-1 Receptor antagonist</i> (Antagonista del receptor a interleucina 1)
IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social
IREM2	Immune Receptor Expressed On Myeloid Cells 2
LPS	Lipopolisacárido

MFI	<i>Median Intensity Fluorescence</i> (Intensidad Media de Fluorecencia)
MIF	<i>Monocyte Migration Inhibition Factor</i> (Factor inhibidor de la migración de monocitos)
MOF	Falla Orgánica Múltiple
mRNA	<i>Messenger RNA</i> (ácido ribonucleico tipo mensajero)
NK	<i>Natural Killer</i>
OMS	Organización Mundial de la Salud
PAI-1	<i>Plaminogen Activator Inhibitor 1</i>
PAM	Presión Arterial Media
PAMP	<i>Pathogen Associated Molecular Pattern</i> (Patrón Molecular Asociado a Patógenos)
PBS	<i>Phosphate Buffer Solution</i> (Solución amortiguadora de fosfatos)
PCT/PQT	Procalcitonina
PE	<i>Phycoerythrin</i> (Ficoeritrina)
PRR	<i>Pattern Recognition Receptor</i> (Receptor de reconocimiento de patrón)
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i> (Ácido ribonucleico)
SAPS	<i>Simplified Acute Physiology Score</i>
SSC	<i>Side Scatter Detector</i>
SIRS	Síndrome de Respuesta Inflamatoria Sistémica
SOFA	<i>Sequential Organ Failure Assessment</i>
TGF- β	<i>Tumoral Growing Factor beta</i> (Factor de crecimiento tumoral beta)
TLR	<i>Toll Like Receptor</i> (Receptor tipo "Toll")
TNF- α	<i>Tumor Necrosis Factor alfa</i> (Factor de Necrosis Tumoral alfa)
TREM-1	<i>Triggering receptor expressed on myeloid cells 1</i>
TREMs	<i>Soluble Triggering Receptor Expressed on Myeloid cells 1</i>
UCI	Unidad de cuidados intensivos

Resumen

Clínicamente, la sepsis se define como una enfermedad grave que involucra falla orgánica en presencia de infección. El Síndrome de Respuesta Inflamatoria Sistémica o SIRS, comparte el cuadro clínico con sepsis, aunque en SIRS no existe evidencia de infección.

A nivel mundial, se estima que al año hay aproximadamente 18 millones de casos de sepsis, con tasas de mortalidad del 30 al 60%. Esta alta morbi-mortalidad se asocia tanto con la dificultad para establecer el tratamiento específico, como con la complejidad del proceso inflamatorio sistémico. El proceso sepsis/SIRS involucra activación del endotelio, de los sistemas del complemento y coagulación, además de la conocida activación del sistema inmunológico, caracterizada por incrementos séricos de proteínas de fase aguda como procalcitonina, proteína C reactiva o IL-6, así como por la sobre-expresión de moléculas de adhesión, receptores Fc, receptores a quimiocinas o citocinas y/o de receptores de reconocimiento de patrón (PRRs); con disminución de la expresión de moléculas como las involucradas en la activación de la respuesta inmune adaptativa, como las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (o MHC).

Previamente, basados en la expresión de estas moléculas en la superficie de los leucocitos circulantes, exploramos un panel biomarcador que incluye a CD16, CD64, CD69, TREM-1, CCR7, CD107a y HLA-DR cuya expresión diferencial en monocitos y/o neutrófilos, además del potencial biomarcador que ofrecen, están asociadas a funciones celulares que podrían incrementarse correspondientemente a la naturaleza de la molécula. Con el objetivo de establecer si efectivamente este inmunofenotipo asociado a activación de leucocitos se relaciona con mayores capacidades funcionales, exploramos en un ensayo prospectivo, experimental ex-vivo, y transversal, las capacidades fagocíticas y activación de vías de señalización en monocitos y neutrófilos, junto con la expresión de las mencionadas moléculas asociadas a activación.

Se reclutaron 31 pacientes con sepsis, y 13 pacientes con SIRS; para fines comparativos se incluyeron 14 sujetos sanos. Además de la evidencia de infección, no observamos diferencias significativas en las características demográficas y variables clínicas y bioquímicas, entre los sujetos con inflamación sistémica. Observamos tanto en pacientes con sepsis como con SIRS, y en comparación a sujetos sanos, un estado de hipercitocinemia mixto, incluyendo citocinas pro/anti-inflamatorias. Comparado a sujetos sanos, los neutrófilos de los pacientes con sepsis, aunque no así los de SIRS, presentan incrementos significativos en la expresión de CD64, CD69, TREM-1 y CD107a ($p < 0.05$). La expresión de estas moléculas no presenta diferencias significativas entre el grupo de pacientes con SIRS o con sepsis. En cuanto a los monocitos, en pacientes con sepsis se incrementa significativamente la expresión de CD69, CCR7 y TREM-1. Respecto a sujetos sanos, las células de los pacientes con inflamación sistémica no tienen diferencias significativas en la capacidad de internalización bacteriana ($p = 0.21$). Sin embargo, la acidificación del fagolisosoma, indispensable para la eliminación de las bacterias internalizadas, es significativamente menor en los fagocitos de sujetos con inflamación sistémica, respecto a sujetos sanos ($p < 0.05$). En comparación con leucocitos de sujetos sanos, los monocitos de los pacientes con sepsis presentan el mismo nivel de fosforilación de STAT5 en respuesta a GM-CSF, y disminuyen significativamente la fosforilación de p38 en respuesta a LPS y de STAT3 en respuesta a IL-10. En conclusión,

en los pacientes con inflamación sistémica, ya sea o no asociada a infección, hay disfunción de los fagocitos aún cuando sobre-expresan algunas moléculas de superficie clásicamente asociadas con activación.

Abstract

Sepsis is a life-threatening condition associated with failure of at least one organ in the presence of infection. Along with SIRS, the acute systemic inflammatory syndrome without documented infection, sepsis represents a main health problem in intensive care units around the world.

Hypercytokinemia and overexpression of activation-markers on leukocytes are frequently reported in SIRS/sepsis. Leukocyte functions including antibody mediated-phagocytosis, pathogen recognition and migration appear to be disabled in SIRS/septic patients.

Searching for a panel biomarker for diagnosis and/or prognosis of SIRS/sepsis patients, we recently observed that the expression of CD16, CD64, HLA-DR, TREM-1 and CD69 in circulating phagocytes could be useful. Since some of these molecules enhance cytokine production, leukocyte migration, and/or endophagocytosis, our aim was to evaluate in phagocytes from patients with sepsis if a so-called activation immunophenotype reflects differential responses in functions related to infection contention. We analyzed blood samples from 44 patients with SIRS/sepsis and 14 healthy volunteers. CD16, CD69, CD64, CCR7, and TREM-1 levels were determined on the surface of neutrophils and monocytes. Bivariate and multivariate analysis showed no strong association between clinical data and serological cytokine levels and/or activation related markers. However, phagosome maturation and p38, STAT3, and STAT5 phosphorylation were evaluated in these phagocytes.

As expected, sepsis and SIRS patients had increased serological levels of pro- and anti-inflammatory cytokines. *E. coli* internalization was not increased in monocytes from patients with SIRS/sepsis, despite increased numbers of circulating neutrophils and monocytes ($p < 0.05$) and overexpression of CD64 and CD69 in neutrophils ($p < 0.05$), TREM-1 ($p < 0.01$), CD69 ($p < 0.001$), and CCR7 ($p < 0.05$).

Moreover, phagosome maturation was decreased in phagocytes from patients with SIRS/sepsis syndrome ($p < 0.00001$). Furthermore, p38 and STAT-3 phosphorylation elicited by LPS or IL-10 (respectively) was diminished in neutrophils and monocytes from patients ($p < 0.05$).

These results indicate that “activation markers” may not reflect higher functionality, so a

more profound analysis should be made before assuming that the activated immunophenotype means increased phagocyte responses.

INTRODUCCIÓN

Respuesta inflamatoria

La inflamación es el proceso fisiológico que involucra el reclutamiento y activación de las células del sistema inmune innato en respuesta a infecciones, traumatismos y/o lesiones químicas o mecánicas que ocurren en los tejidos vascularizados^[1]. El curso normal de una respuesta inflamatoria lleva a la eliminación del agente causal, a la reparación del daño tisular y a la eliminación mediante fagocitosis de agentes infecciosos, así como de los restos de las células que mueren durante el progreso de dicha respuesta.

El inicio y perpetuación de la respuesta inflamatoria depende de inductores primarios y secundarios. Los primeros incluyen a PAMPs (por Pathogen Associated Molecular Patterns) o DAMPs (por Damage Associated Molecular Patterns), mientras que los secundarios a mediadores inflamatorios, como quimiocinas, citocinas, aminas vasoactivas, e eicosanoides, que se liberan por células residentes de los tejidos así como por leucocitos infiltrantes^[2, 3]. La respuesta inflamatoria se inicia por el reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos ó PAMP entre los que se encuentran moléculas como: lipopolisacárido (LPS), flagelina, DNA y RNA de origen bacteriano o viral, entre otros; o por el reconocimiento de moléculas endógenas asociadas a daño denominadas DAMPs. Estos DAMPs incluyen a la proteína HMGB1 (por *High Mobility Group Box 1*), DNA mitocondrial, cristales de ácido úrico y cromatina. Tanto los PAMP como los DAMP pueden ser reconocidos por receptores de reconocimiento de patrón ó PRR (por Pattern Recognition Receptors) expresados en células residentes del tejido (como queratinocitos, macrófagos, etc.) o infiltrantes, como neutrófilos, monocitos, células dendríticas y linfocitos, entre otras. Actualmente, estos PRR se clasifican en cuatro grandes familias; estas familias incluyen proteínas transmembranales, tales como los receptores tipo Toll (TLR por Toll-Like Receptor) y receptores de lectina tipo C (CLR por C-type Lectin Receptor), así como las proteínas citoplasmáticas como receptores tipo RNA helicasas inducibles por ácido retinóico (RLR por RIG-1 Like Receptor) y los receptores tipo NOD (NLR por Nod-like Receptors)^[4, 5].

Dependiendo de qué PAMP o DAMP se reconozca por los PRRs, se activan diferentes vías de señalización. Cuando TLR2 reconoce a uno de sus ligandos, la lipopéptidofosfoglicana (o LPPG) o TLR-4 reconoce al LPS, se activa la cascada de señalización de Myd88, molécula adaptadora que a su vez activará a IRAK/TRAF-6 (IL-1R-associated kinase/TNF receptor associated factor 6) que activa a NEMO con lo que se dimeriza NF- κ B. NF- κ B es un factor de transcripción que activo se transloca a núcleo donde inducirá la expresión de los genes de citocinas como TNF- α (Tumor Necrosis Factor α), Interleucina (IL)-1 β , IL-6 e IL-8. A partir de MyD88 también se puede activar la vía de MAPK, específicamente a los componentes p38 y JNK que pueden inducir también la producción de TNF- α e IL-10. En el caso de TLR-4, la respuesta puede ser dependiente o independiente de MyD88. En este último caso es TRIF quien media la activación de NF- κ B. TRIF también puede mediar la activación de IRF3 con lo que se induce la producción de Interferón beta (IFN- β)^[6].

Posteriormente a la fase de reconocimiento de los inductores (PAMPs/DAMPs), y tras la producción de citocinas y quimiocinas por parte de las células residentes del tejido dañado; se da el reclutamiento de células del sistema inmune innato (inicialmente neutrófilos y monocitos) al sitio de la lesión. Esto requiere de la secreción de inductores secundarios o mediadores inflamatorios que incluyen eicosanoides, citocinas, quimiocinas. El resultado de la interacción de los inductores primarios y secundarios con sus respectivos receptores en la barrera endotelial provoca la polarización de diferentes moléculas de comunicación intercelular (uniones adherentes, estrechas o comunicantes), moléculas de adhesión (selectinas e integrinas) y quimiocinas hacia el lumen vascular^[7]. Se disminuye así la velocidad de circulación de los leucocitos, que “ruedan” sobre la superficie endotelial, favoreciendo las subsecuentes interacciones con las integrinas y sus ligandos, hasta que las células se detienen totalmente en las paredes vasculares, llevándose a cabo entonces la extravasación, lo que incluye penetrar la monocapa endotelial y la membrana basal subyacente^[8]. Los mediadores inflamatorios también inducen la expresión tanto en células endoteliales como en leucocitos, de receptores de quimiocinas como CCR7, CXCR8, CCR6 que median la activación y adhesión de leucocitos^[9-11].

La secreción de mediadores inflamatorios se da de forma secuencial existiendo las de

respuesta inicial, que se liberan en los primeros minutos a 18 horas posteriores al reconocimiento del estímulo inflamatorio. Las citocinas de este tipo incluyen al factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), IL-1 β e IL-6. Dependiendo del tipo de receptor para TNF- α que expresen las células, es que ésta citocina puede promover una gran variedad de respuestas, incluyendo apoptosis, proliferación celular, movilización de los leucocitos, producción y activación de proteínas de fase aguda como procalcitonina, proteína C reactiva y la misma IL-6^[12, 13]. Para IL1 β existen dos receptores: IL-1R1 o IL-1R2 que activan la vía de NF κ B lo que promueve la co-estimulación, activación y secreción de otras citocinas y de proteínas de fase aguda, además su acción en células del hipotálamo produce fiebre^[12, 14, 15].

El factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF) regula la supervivencia, proliferación, y diferenciación de los monocitos / macrófagos activando la vía JAK-STAT específicamente JAK2 y STAT5. Esto lo hace a través de la unión a su receptor (GM-CSFR) presente en estas células, el cual se compone de una cadena α de unión al ligando y la cadena β común de la familia de receptores de citocinas^[16].

Ahora bien, la activación de PRR no solo induce la producción de citocinas proinflamatorias, sino también de quimiocinas, proteínas antimicrobianas, factores de reparación de tejidos, reguladores del metabolismo, y moléculas con actividad anti-inflamatoria, como interleucina 10 (IL-10) ^[17]. La IL-10 a través de su receptor IL-10R presente en la membrana de sus células blanco entre las que se encuentran monocitos, macrófagos, linfocitos T, linfocitos B y células dendríticas, activa por fosforilación de receptores a la molécula JAK1 que a su vez activa a STAT 3. A pesar de que se activa la misma proteína STAT que IL-6, la IL-10 favorece diferentes funciones tales como la supresión de la respuesta inmunológica, inhibición de la expresión de IL-2, moléculas de co-estimulación y de moléculas de clase II del MHC, por lo que se considera una interleucina anti-inflamatoria^[12, 18].

Una vez que han sido reclutados a los tejidos dañados, los neutrófilos, monocitos y las células NK ejercen diferentes funciones para eliminar a los microorganismos. Estos mecanismos incluyen la endofagocitosis, la cual puede estar mediada por la participación de los receptores opsónicos, tales como Fc γ R o no opsónicos, como los receptores de

lectina tipo C, que favorecen la motilidad del citoesqueleto para encerrar al patógeno dentro de una vacuola denominada fagosoma^[19, 20]. La fagocitosis de neutrófilos es muy rápida, la internalización de partículas opsonizadas por IgG se produce en menos de 20 segundos^[21]. Posteriormente se da la fusión de la vacuola fagocítica con gránulos preformados dentro de la célula, en un proceso conocido como maduración fagosomal. Estos gránulos contienen enzimas hidrolíticas y subunidades NADPH oxidasa que inician mecanismos bactericidas. La fagocitosis en neutrófilos difiere de la de otros fagocitos profesionales tales como macrófagos, en los que tanto la captación de partículas y la maduración del fagosoma son mucho más lentos^[22]. Además, el fagosoma de neutrófilos completamente maduro tiene un pH neutro, mientras que en los macrófagos el pH del fagosoma es muy ácido^[23]. Esta diferencia puede reflejar los efectos del estallido respiratorio, que es mayor en los neutrófilos en comparación con los macrófagos. La eficiente maduración fagosomal en los neutrófilos también depende de Ca^{2+} citosólico, mientras que en los macrófagos, la fusión entre lisosomas y el fagosoma es independiente de Ca^{2+} ^[24, 25].

La velocidad con la que los neutrófilos pueden engullir y matar a los patógenos es una ventaja evidente en términos de defensa del huésped. Sin embargo, la fagocitosis y la maduración fagosomal no son procesos perfectos, ya que se ha reportado que los gránulos pueden fusionarse con el fagosoma antes de que sea completamente sellado, lo que lleva a la liberación de los contenidos citolíticos y productos oxidativos fuera del neutrófilo, donde se puede producir daño a otras células^[26].

A fin de evitar los efectos dañinos de la respuesta inflamatoria ante la contención del agente infeccioso, es importante que otros mediadores lipídicos como lipoxinas, resolvinas y protectinas, además de la mencionada IL-10, promuevan la resolución de la inflamación al disminuir el infiltrado de neutrófilos y reclutar monocitos de sangre periférica que se transforman en macrófagos, que junto con las células residentes, fagocitan neutrófilos muertos, conteniendo así la respuesta inflamatoria^[1, 2, 27].

Sin embargo, en ocasiones, la respuesta inflamatoria se vuelve sistémica, y los efectos de los mediadores proinflamatorios como $TNF-\alpha$, $IL-1\beta$, $IL-6$, HMGB1 y de MIF (*Monocyte Migration Inhibitory Factor*), son capaces de alcanzar células en órganos lejanos al sitio de la lesión inicial^[28, 29], así como activar al endotelio y con ellos a las cascadas de

coagulación y complemento, también a nivel sistémico.

Respuesta inflamatoria sistémica (SIRS/sepsis)

La inflamación sistémica genera un conjunto de manifestaciones clínicas que conforman el síndrome de respuesta inflamatoria sistémica ó SIRS^[30] (por *Systemic Inflammatory Response Syndrome*), cuyas características se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1. Criterios diagnósticos de SIRS

Variables generales	Fiebre (>38.3°C) Hipotermia (<36°C) Frecuencia cardiaca >90 latidos/min Frecuencia respiratoria >20/min Alteraciones neurológicas Edema significativo Glucosa plasmática >120 mg/dL en ausencia de diabetes
Variables inflamatorias	Leucocitosis (Cuenta de leucocitos >12,000/mm ³) Leucopenia (Cuenta de leucocitos <4000/mm ³) Cuenta de leucocitos normal con >10% de formas inmaduras Proteína C reactiva en plasma >2 desviaciones estándar sobre el valor normal Procalcitonina en plasma >2 desviaciones estándar sobre el valor normal
Variables hemodinámicas	Hipotensión arterial Saturación de oxígeno en sangre venosa mixta >70% Índice cardiaco >3.5 l/min/m ²
Variables asociadas a disfunción orgánica	Hipoxemia arterial Oliguria <0.5 ml/kg/h durante al menos 2h) Creatinina sérica >0.5 mg/dL

	Anormalidades en la coagulación (Tiempo de tromboplastina parcial activada >60 s) Íleo (Ausencia de sonidos intestinales) Bilirrubina total en plasma >4 mg/dL Trombocitopenia (<100,000/mm ³)
VARIABLES ASOCIADAS A PERFUSIÓN TISULAR	Lactato sérico >1 mmol/L Retardo en el relleno capilar

Para el diagnóstico de SIRS se requiere que se presenten al menos dos de los siguientes criterios: a) fiebre o hipotermia, b) taquicardia, c) taquipnea o hipocarbía y d) leucocitosis o leucopenia^[31].

La sepsis se clasifica de acuerdo al tiempo de evolución en sepsis temprana o tardía; de acuerdo a la edad de presentación en neonatal o de adultos; de acuerdo al foco infeccioso inicial en pulmonar, gastrointestinal, renal, neurológica, entre otras; o de acuerdo a la severidad en sepsis y choque séptico (cuando el compromiso hemodinámico es sostenido y refractario al tratamiento médico)^[31-35].

A nivel mundial, la sepsis constituye una de las primeras causas de morbi-mortalidad hospitalaria, reportándose 18 millones de casos al año^[36]. 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 de 14.8% en las primeras 48 horas de la enfermedad^[37], hasta 30-35% en casos de sepsis grave y 50% en choque séptico^[36, 38]. En México, la incidencia calculada de sepsis hasta el año 2000 era del 58.2% en pacientes que requieren ingreso a unidades de cuidados intensivos, con una tasa general de mortalidad del 25.5%^[39]. Entre las causas de sepsis, se sabe que aproximadamente 35% de pacientes sometidos a procedimientos quirúrgicos mayores pueden desarrollarla ^[40].

Como en otras entidades patológicas, en sepsis, la elevada tasa de morbi-mortalidad está inversamente relacionada con el diagnóstico temprano y manejo oportuno. Desafortunadamente, el diagnóstico de sepsis, así como su seguimiento, sigue resultando difícil ya que no existen signos patognomónicos de cada uno de estos estados

que permitan diferenciarlos. Además algunos grupos han propuesto que la detección del estado pro o anti-inflamatorio en el que se encuentran los sujetos, permitirá decidir la estrategia terapéutica de acuerdo a la fase del síndrome sepsis/SIRS/CARS en la que se encuentren. Entre las herramientas disponibles para evaluar a los pacientes con SIRS/sepsis se encuentran las diferentes escalas diseñadas para el seguimiento de pacientes con enfermedades críticas: APACHE II (por *Acute Physiology and Chronic Health Evaluation, Anexo 1*), SAPS (por *Simplified Acute Physiology Score*) y SOFA (por *Sequential Organ Failure Assessment, Anexo 2*). Estas escalas otorgan puntajes basados en parámetros tales como la temperatura, la frecuencia cardíaca y respiratoria, la tensión arterial, la oxemia, el hematocrito, el hemograma, la glucemia y la respuesta neurológica; la calificación final obtenida se asocia al estado general y el pronóstico de los sujetos con 70-80% de sensibilidad y 95% de especificidad. Sin embargo, estas escalas no pueden aplicarse a todo tipo de pacientes ya que no son valorables en pacientes con enfermedades crónico-degenerativas en fase avanzada, por ejemplo^[41-43]. Tampoco permiten establecer ni el origen ni la fase pro o anti-inflamatoria en que se encuentren los pacientes con síndrome SIRS/sepsis. En el caso de sepsis, pacientes con condiciones generales similares, presentan tasas de sobrevivencia muy diferentes. Esto probablemente se asocia a condiciones genéticas de los pacientes, y/o a la presencia de diferentes fases de la respuesta inflamatoria sistémica que pueden requerir de abordajes terapéuticos distintos para que resulten exitosos^[44-46].

Alteraciones en leucocitos en SIRS/sepsis

La respuesta inflamatoria sistémica, acompañada o no 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^[14, 44, 47-49]. 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- α y citocinas (IL- 1 β , 6 y 8)^[50]. 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

ó CARS (por Compensatory Anti-inflammatory Syndrome), durante el cual se producen mediadores anti-inflamatorios como IL-10, IL-1Ra y TGF- β , y también disminuye la expresión en macrófagos de moléculas del complejo principal de histocompatibilidad tipo II (ó HLA-DR por Human Leukocyte Antigen-DR)^[47]. Cabe mencionar que aunque todavía sin consenso, algunos autores consideran que una vez que coexisten los mediadores pro y anti-inflamatorios ocurre el llamado Síndrome de Respuesta de Antagonista Mixta (o MARS por Mixed Antagonist Response Syndrome), que se diferenciaría de las fases SIRS y CARS por que se encuentran tanto mediadores pro como anti-inflamatorios en circulación^[51].

Tanto SIRS como CARS comparten características clínicas, y solo se diferencian a nivel molecular por incrementos en la concentración sérica de IL-10, del receptor antagonista de la interleucina 1 (IL-1Ra), disminución en la concentración sérica de IFN- γ , y la disminución en la expresión de moléculas de clase II del complejo principal de histocompatibilidad ó HLA-DR en la superficie de monocitos y células dendríticas^[44]. Se propone que éste redireccionamiento hacia una respuesta anti-inflamatoria disminuye la capacidad de respuesta de las células del sistema inmune, que se relaciona con un fenotipo de “tolerancia” frente a patógenos^[52]. La IL-10 es una citocina anti-inflamatoria que inhibe la síntesis de citocinas pro-inflamatorias por parte de los monocitos y afecta su función incluyendo 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^[53]. Además, se reportó que los niveles elevados de IL-10 en sangre se relacionan con mayor riesgo a desarrollar falla orgánica múltiple en pacientes con choque séptico^[54]. 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”^[55] durante el cual los leucocitos serían incapaces de responder a los PAMP, lo que se propone da lugar a mayor susceptibilidad a infecciones por agentes oportunistas ^[31].

Otra alternativa que puede explicar este fenómeno de susceptibilidad a la infección en SIRS/sepsis se refiere al llamado “redireccionamiento” de las vías de transducción. En un estudio en ratones, en los que se desarrolló bacteremia por bacterias Gram+ (con

Listeria monocytogenes) ó Gram- (con *Escherichia coli*), se estudiaron los estados de fosforilación inducidos por ligandos de TLR o citocinas en linfocitos, monocitos/macrófagos y células dendríticas. Nolan y colaboradores encontraron que la exposición previa a bacterias Gram+ activa las moléculas STAT1, STAT3 y STAT5, pero que disminuye su capacidad de respuesta ante estimulaciones posteriores con IL-6 o GM-CSF. Además encontraron que la disminución de la respuesta se debía, al menos en parte, a la endocitosis de los receptores de IL-6. En síntesis, estos autores proponen que la exposición a mediadores pro-inflamatorios, como las citocinas o ligandos de TLR, más que simplemente hiper-estimular al sistema, pueden redireccionar las vías de señalización involucradas en la respuesta inflamatoria, generando estados refractarios que comprometen la eficiencia de la respuesta inmune^[56].

En éste 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, que junto la bandemia (que representa incremento de las formas inmaduras de leucocitos en circulación) forman parte de los signos para el diagnóstico de SIRS/sepsis, se modifica la expresión de varias moléculas en los leucocitos de estos pacientes. En neutrófilos de pacientes con sepsis, la expresión del receptor de inmunoglobulina G de alta afinidad ó CD64 se eleva ^[57]. 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 *Escherichia coli*); de igual manera, TREM-1 se incrementa en circulación en modelos animales de endotoxemia (inducida con 15mg/kg de LPS proveniente de *E. coli*) o por ligadura y punción del ciego^[58, 59]. Cabe mencionar que el incremento de TREM-1 de membrana está asociado a procesos inflamatorios sistémicos tanto infecciosos como no infecciosos^[60]. En ratones con choque séptico, el silenciamiento parcial de TREM-1 con RNA de interferencia, disminuye las concentraciones séricas de IL-1 β y TNF- α ^[61]. 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^[62].

Otra molécula asociada a activación en sepsis es CD69, glicoproteína de 28-34 kD que se expresa tempranamente durante la activación de linfocitos, monocitos y plaquetas, su expresión se incrementa en linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ en pacientes con sepsis en comparación con pacientes con SIRS^[63]. Recientemente exploramos la utilidad de la determinación combinada en leucocitos de estas moléculas de membrana para la identificación de un posible inmunofenotipo con potencial de biomarcador. Además de las modificaciones ya reportadas en TREM-1 y HLA-DR, encontramos incrementos significativos en los marcadores CCR7, CD69, CD64 en monocitos, granulocitos y linfocitos en comparación con sujetos sanos^[64]. Interesantemente, al comparar un grupo de sujetos con SIRS y sepsis, encontramos un inmunofenotipo diferencial, prevaleciendo en pacientes con sepsis el inmunofenotipo con mayor expresión de moléculas de activación en monocitos (FSC^{med}, SSC^{med}, CD45⁺, CD14⁺, HLA-DR^{hi}, TREM-1⁺, CD64⁺⁺) y neutrófilos (FSC^{hi}, SSC^{hi}, CD45⁺, CD14⁻, CD16⁺, HLA-DR⁻, TREM-1⁺⁺, CD64⁺⁺, CD107a⁺⁺, CD69⁺⁺) y no así en pacientes con SIRS (inmunofenotipo monocitos: FSC^{med}, SSC^{med}, CD45⁺, CD14⁺, HLA-DR⁺, TREM-1⁺⁺, CD64⁻; neutrófilos: FSC^{hi}, SSC^{hi}, CD45⁺, CD14⁻, CD16⁺, HLA-DR⁻, TREM-1⁺, CD64^{-/+}, CD107a⁺, CD69^{-/+}). Sin embargo, al momento se desconoce si esta combinación en expresión de marcadores que corresponden al inmunofenotipo tiene alguna característica funcional o correlación con otros sistemas claramente alterados en sepsis, como es la activación del endotelio, de las vías de complemento, y de las cascadas de coagulación, que colaboran en el desarrollo de graves complicaciones del SIRS/sepsis como la falla renal y coagulación intravascular diseminada^[51].

Justificación

En la respuesta inflamatoria sistémica aguda como SIRS y sepsis, los leucocitos de sangre periférica modifican el patrón de expresión en su membrana de moléculas asociadas con activación. Aunque también es claro que la capacidad de respuesta de los leucocitos de pacientes con SIRS/sepsis es disfuncional, hasta el momento se desconoce si la expresión diferencial de moléculas asociadas con activación CD16,

CD64, TREM1, CCR7, CD107a y/o CD69 que permite diferenciar entre SIRS y sepsis se relaciona además con capacidades funcionales diferentes en monocitos y neutrófilos de pacientes con SIRS o sepsis.

Pregunta de investigación

¿El ambiente inflamatorio en pacientes con SIRS y sepsis, además de inducir la expresión diferencial de moléculas tradicionalmente asociadas con activación en neutrófilos y monocitos, determina variaciones funcionales en estas células mieloides?

Hipótesis

Las células mieloides circulantes con inmunofenotipo “activado” de pacientes con SIRS/sepsis presentarán una capacidad disminuida opsono-fagocítica y de activación de vías de señalización asociadas a citocinas y/o ligandos de TLR, además, tendrán aumentos en la concentración de citocinas séricas, correlacionando así con cuadros más severos en la patología.

Objetivo general

Identificar la relación entre un inmunofenotipo de activación con la capacidad de producción de citocinas, función opsono-fagocítica y de activación de vías de señalización que se presentan en fagocitos de sangre periférica de pacientes adultos con SIRS/sepsis

Objetivos particulares

1. Identificar el inmunofenotipo de monocitos y neutrófilos de acuerdo a la expresión de: CD45, CD14, CD16, TREM-1, CD64, CD69 y CCR7, en sangre periférica de pacientes adultos con SIRS/sepsis y sujetos sanos.
2. Cuantificar en suero de pacientes SIRS/sepsis las citocinas pro-inflamatorias IL-1 β , IL-8, IL-6, TNF- α y anti-inflamatorias IL-10 e IL-1Ra.
3. Evaluar en fagocitos circulantes de pacientes SIRS/sepsis, la activación de las vías de señalización p38, pSTAT3 y pSTAT5, al exponerse *in vitro* a LPS, IL-10 y GM-CSF como sus respectivos inductores.
4. Evaluar la capacidad endocítica y fagocítica de monocitos y granulocitos circulantes de pacientes adultos con SIRS/sepsis.
5. Determinar la asociación o asociaciones entre los marcadores de activación encontrados y las capacidades funcionales de neutrófilos o monocitos.

Material y Métodos

Aspectos éticos

Para la realización del presente protocolo se cuenta con la aprobación del comité local de investigación No: R-2013-3601-229. Se considera que los sujetos incluidos en este estudio tendrán un riesgo mayor al mínimo, por lo que se solicitará la firma de carta de consentimiento informado por el paciente o familiar antes de iniciar la toma de muestra (Anexo 1, Carta de Consentimiento Informado).

Los procedimientos propuestos están 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, así como los códigos y normas internacionales vigentes para las buenas prácticas en la investigación clínica. Además de lo anterior, se respetarán cabalmente los principios contenidos en el Código de Nuremberg, la Declaración de Helsinki y sus enmiendas y el Informe Belmont.

Recolección de las muestras

La toma de las muestras se realizó del catéter central con previa asepsia de la zona y drenado del mismo, o bien por venopunción humeral para los voluntarios sanos. Se colectaron 5 mL de sangre periférica en tubos con heparina como anticoagulante para realizar la inmunofenotipificación de leucocitos, internalización bacteriana, eliminación bacteriana y realizar los ensayos de activación de vías de señalización. Adicionalmente se colectaron 5mL en un tubo sin anticoagulante para la recolección de suero, muestra que sirvió para la cuantificación de citocinas.

Recolección de datos clínicos

Utilizando una hoja de recolección de datos, los colaboradores médicos recabaron la información de identificación de cada paciente, así como el diagnóstico, evolución, variables clínicas y resultados de laboratorio de rutina que se relacionan con la severidad de la enfermedad y evolución de los pacientes. Toda esta información se manejó como información confidencial, salvaguardando la intimidad de cada persona participante en el estudio (Anexo 3, Hoja de recolección de datos clínicos).

Cuantificación de citocinas solubles en suero

Las concentraciones de citocinas se obtuvieron utilizando un inmunoensayo basado en arreglos de perlas citométricas (CBA, por sus siglas en inglés: *Cytometric-Bead-Arrays*). El kit utilizado fue CBA Human proinflammatory Cytokine Kit (BD™ Biosciences, San José, CA, USA) para la obtención de la concentración de IL-1beta, IL-6, IL-8, IL-10, TNF (*Límites de detección: 2.4pg/mL IL-6, 4.5pg/mL IL-10, 3.8pg/mL TNF y 0.2pg/mL IL-8*). Del kit se utilizaron 5µL de perlas recubiertas con anticuerpos dirigidos contra cada una de las proteínas a analizarse, realizándose mezclas específicas para cada kit y de volúmenes finales de acuerdo al número de muestras

a analizarse utilizando el buffer de dilución de fábrica que asemeja la composición del suero, llevándose a cabo mediante centrifugación de la mezcla de perlas a 1000 rpm por 5 min, decantando inmediatamente y restituyendo el volumen con el buffer tipo suero. Se colocó un volumen de cada mezcla de perlas en cada tubo de citometría rotulado con la clave de la muestra y kit correspondientes.

Dentro de las muestras a analizarse se incluyeron diez puntos de una curva estándar, (estándar de proteínas, ocho diluciones del estándar y un blanco), preparada de acuerdo a especificaciones del fabricante a partir de proteína liofilizada, específica de cada kit. Se agregaron 50 μ L de muestra, siendo suero, dilución o blanco, a su tubo rotulado correspondiente y se incubaron a temperatura ambiente por una hora, protegidos de la luz. Posteriormente se añadió un volumen de reactivo de detección, específico de cada kit por muestra, siendo estos reactivos anticuerpos monoclonales dirigidos contra las proteínas a cuantificarse, acoplados al fluorocromo ficoeritrina para los dos kits. Las muestras fueron analizadas con un citómetro de flujo FACSAria (BD™ Biosciences, San Jose, CA, USA), tras realizar el acondicionamiento del aparato con los controles de compensación de los kits.

Inmunofenotipificación de leucocitos de sangre periférica utilizando citometría de flujo

A 150 μ L de sangre total o lo correspondiente a 3×10^5 células, se adicionaron 1000 μ L de solución de lisis de eritrocitos (cloruro de amonio al 0.15M,) y se incubó 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente se adicionó 1 mL de solución amortiguadora a base de fosfatos (PBS 1x) y se centrifugó durante 5 min a 1500 rpm. El botón celular obtenido se resuspendió en 150 μ L de PBS 1x. Se agregaron 50 (μ L) del resuspendido celular a un tubo de auto-fluorescencia (sin anticuerpos, Tubo 1) y dos tubos (Tubos 2 y 3) de “tinción”, con diferentes mezclas de anticuerpos monoclonales. Pasados 15 min de incubación a temperatura ambiente y en oscuridad, se agregaron 250 μ L de solución de lisis y fijación (BD FACS Lysing Solution Cat. 349202) diluido 1:10 del concentrado y se incubó por 10 minutos a temperatura ambiente en

oscuridad.

Finalmente las células se lavaron por centrifugación agregando 1 ml de PBS y posteriormente se resuspendió en 50 μ L de solución isotónica. Se adquirieron al menos dos mil eventos correspondientes a la población de células NK y/o cinco mil monocitos utilizando un citómetro FACS Aria equipado con tres láseres y el juego de filtros adecuados para la detección de los fluorocromos utilizados.

Los inmunofenotipos se determinaron utilizando el programa de análisis citométrico Infinicyt (Cytognos Euroflow), que permite, además de la visualización clásica, el cálculo de la expresión de marcadores que compartan fluorocromos (el programa posee una herramienta de cálculo probabilístico que genera una matriz matemática de predicción). Esto nos permitió analizar en cada muestra catorce parámetros a la vez (12 parámetros de fluorescencia, tamaño y complejidad relativa).

Tabla 2: Panel de anticuerpos utilizados para la inmunofenotipificación.

Anticuerpo	Clona	Propósito
CD45/Pacific (Invitrogen) Orange	HI30	Identificación leucocitos
CD3/Pacific (Biolegend) Blue	UCHT1	Identificación Linfocitos T y NKT
CD56/APC (Pharmingen)	B159	Identificación Células NK y NKT
IREM/APC (Immunostep)	UP-H2	Identificación de monocitos
CD14/PECy7 (Biolegend)	M5E2	Identificación de monocitos
CD69/PE (Biolegend/Invitrogen)	FN50	Caracterización de activación temprana de linfocitos
TREM1/PE (R&D)	193015	Identificación de neutrófilos y caracterización de monocitos
CD64/FITC (Pharmingen)	10.1	Caracterización de neutrófilos y monocitos
CCR7/FITC (Biolegend)	3D12	Caracterización de activación de linfocitos

CD16/APC Cy7 (Biolegend)	3G8	Identificación de granulocitos y NK y caracterización de monocitos
HLA-DR/PECy5 (Biolegend/BD)	G46-6	Identificación linfocitos B y caracterización monocitos y linfocitos T.
CD107a/PE Cy5 (BD)	H4A3	Caracterización de monocitos y neutrófilos

Mediante la titulación de anticuerpos y la estandarización de la técnica para la tinción de marcadores de superficie en leucocitos circulantes se realizaron controles de fluorescencia menos uno (FMO) para descartar interferencia de una señal fluorescente con otras.

Evaluación de la capacidad opsono-fagocítica de monocitos y granulocitos

Para cada muestra se emplearon tres tubos de poliestireno estériles, un tubo para la auto-fluorescencia propia de las células (Tubo [AF], sin bacteria, sin anticuerpos), un tubo para el control a 4° C (Tubo [+ 4° C], control negativo para fagocitosis) y un tubo para el ensayo a 37° C (Tubo [+ 37°C], positivo para fagocitosis).

Siguiendo las condiciones señaladas, se colocaron las muestras en hielo por 10 minutos antes de realizar el ensayo. Se adicionó a un tubo de citometría 50 μ L de sangre total y 10 μ L de pHrodo® Green E. coli BioParticles® Conjugate for Phagocytosis (Life Technologies, Carlsbad, CA, E.U.). Después se colocaron los tubos [AF] y [+4° C] en hielo, y el tubo [+37° C] a 37°C por 15 minutos. Para cada experimento, después de 15 minutos de incubación, se colocaron los tubos en hielo. Se adicionaron 50 μ L de Lysis Buffer A (Component A) a todos los tubos, se agitó brevemente con vortex e incubó a temperatura ambiente por 5 minutos.

Posteriormente se adicionaron 500 μ L de Buffer B a las muestras, vortexeando brevemente, e incubando después a temperatura ambiente por 5 minutos. Se centrifugó a 350 x g por 5 min. a temperatura ambiente, se decantó el sobrenadante y se resuspendió el botón celular en 500 μ L de Buffer de lavado (Component C).

Se adicionó el mix de anticuerpos (1 μ L anti CD16/APC-Cy7 + 0.5 μ L anti CD45/PO

+ 0.5 μ L anti CD14/PE-Cy7)

Se volvió a adicionar Repetir pasos 5 y 6, resuspender en 50 μ L de PBS y adquirir las muestras en el citómetro de flujo.

Finalmente, se adicionan 5 μ L de una mezcla de anticuerpos (CD16/APC Cy7, IREM-1/PE y HLA-DR/PE Cy5) a los tubos 2 y 3 a fin de identificar las poblaciones celulares. Las muestras se mantendrán a 4°C hasta su adquisición en el citómetro FACS ARIA

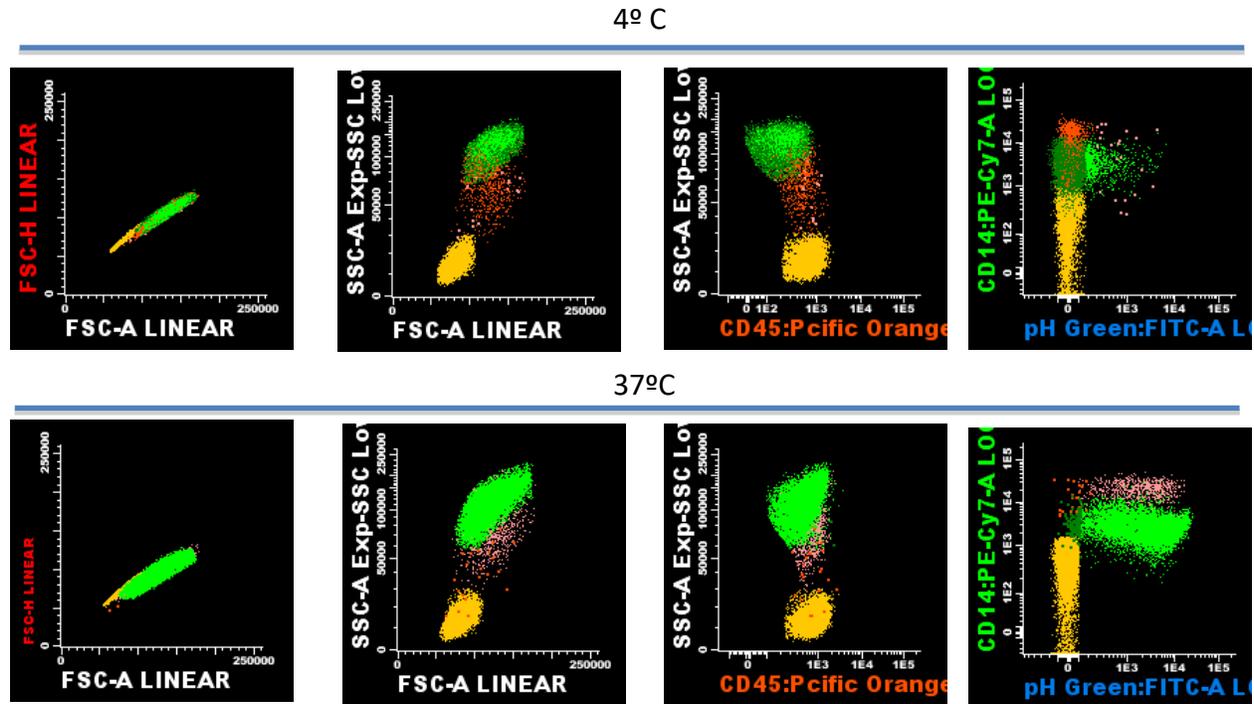


Figura 1: Evaluación de la capacidad de internalización bacteriana para monocitos y neutrófilos a 4°C y 37°C. Utilizando bacteria *E. coli* BioParticles® (10 μ L) en 50 μ L de sangre periférica se seleccionaron poblaciones sencillas, que fueran CD45 positivas, y células positivas para pH Green. En cultivos realizados a 4°C (control negativo) y a 37°C.

Evaluación de la eliminación bacteriana en leucocitos de sangre periférica.

De la sangre periférica, se lisaron los glóbulos rojos con una solución de NH₄Cl 0.15 M para obtener leucocitos. Se cultivaron células 2x10⁶ con 1x10⁵ *E. Coli* DH-5 α en 1 mL de medio DMEM (10% SFB) durante 15 minutos, 2 o 4 horas. Se añadió gentamicina (30 ng / ml) después de la incubación y 10 min más tarde las células se lavaron.

Después de la centrifugación se resuspendió el botón celular e incubó con 1 ml de solución de desoxicolato de sodio al 0,5% durante 5 minutos a 37 °C. Los lisados celulares se colocaron en placas en LB Agar y se incubaron a 37 °C, las UFC se contaron al día siguiente.

Determinación de la respuesta a LPS y citocinas: detección de fosfoproteínas en células individuales.

Se utilizan 50 μ L de sangre total (pre-incubada a 37°C por 30 min) por tubo para cada condición de estimulación (LPS, IL-10, GM-CSF), se estimulan por 15 minutos a 37°C, posteriormente se adicionan 500 μ L Lyse/Fix buffer (BD™ Biosciences, San José, CA, USA) diluido 1:5 y se incuba por 15 minutos a 37°C, esto para fijar las células, posteriormente se incuban a 4°C por 20 minutos con metanol al 70% para permeabilizar las células y así permitir el paso de anticuerpos anti p38, pSTAT3 y pSTAT5, además se adicionan anticuerpos para inmunofenotipificar la población de monocitos y granulocitos (CD45, CD14), todo lo anterior para evaluar, a partir del análisis individual de monocitos y neutrófilos, la capacidad que tienen las diversas poblaciones celulares de activar vías de señalización en respuesta a estímulos, tanto en pacientes como en voluntarios sanos.

Análisis estadístico

Una vez determinados los inmunofenotipos y aplicadas pruebas de U de Mann Whitney para establecer si existen diferencias en la expresión de marcadores entre los grupos de pacientes con sepsis y sujetos sanos, se utilizaron pruebas de análisis bivariados tipo Spearman para establecer si existen relaciones entre la expresión de los diferentes parámetros analizados mediante citometría de flujo y los datos clínicos y evolución de los pacientes Graphad Prism v5.01 (La Jolla, CA, USA).

Diseño del estudio

Estudio longitudinal, prospectivo, experimental.

Universo de trabajo

Se incluyeron pacientes ingresados en la Unidad de Cuidados Intensivos (UCI) o en el Servicio de Gastrocirugía del Hospital de Especialidades (HE) del Centro Médico Nacional (CMN) siglo XXI del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) con diagnóstico de sepsis o de SIRS, de acuerdo a los siguientes criterios:

Criterios de inclusión

- Pacientes con diagnóstico de sepsis o SIRS, de acuerdo a los criterios de la ACCP y/o el *The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3)*^[65].
- Pacientes diagnosticados con SIRS o sepsis en las 48 horas previas a la toma de muestra sanguínea.
- Pacientes de sexo masculino o femenino.
- Pacientes de entre 18 a 60 años de edad.
- Pacientes que otorguen su consentimiento informado firmado. En caso de incapacidad para firmar la hoja el consentimiento, se solicitó el consentimiento al representante legal.

Criterios de no inclusión pacientes sépticos

- Pacientes que rechacen participar en el estudio.
- Pacientes con inmunodeficiencias o inmunocompromiso por condiciones previas como los portadores de VIH, pacientes con hepatitis B o C, y/o con enfermedades autoinmunes.
- Pacientes tratados con inmunosupresores o inmunomoduladores en las 72 horas previas a la toma de la muestra.

- Embarazo.
- Pacientes con enfermedades crónico-degenerativas como diabetes mellitus, síndrome metabólico, insuficiencia renal crónica u obesidad mórbida.
- Pacientes que dentro de las 72 horas previas a la toma de muestra, hayan sido sometidos a procedimiento quirúrgico a fin de eliminar focos infecciosos (abscesos, peritonitis, apendicitis, perforación intestinal).

Criterio de exclusión

- Pacientes con expediente clínico incompleto.
- Pacientes que se retiren del estudio.

Criterios de eliminación

- Pacientes cuyas muestras sanguíneas no sean factibles de procesar por situaciones inherentes a la toma y/o calidad de la misma.
- Pacientes con diagnóstico de trastornos hematológicos, inmunodeficiencias primarias o infecciones virales como VIH, o citomegalovirus, cuyo diagnóstico se haya realizado posterior a la toma de muestra para el presente estudio.

Variables del estudio

Variable independiente

Evolución de la Sepsis

Variables dependientes

Inmunofenotipo de leucocitos

Niveles de IL-6, IL-10, TREM1 soluble

Capacidad fagocítica de monocitos y granulocitos

Definición de las variables

Inmunofenotipo: Conjunto de moléculas de superficie o intracelulares que identifican y caracterizan células para establecer el estado de activación y/o maduración celular.

Panel de biomarcadores: Conjunto de anticuerpos o moléculas que permiten identificar simultáneamente varias moléculas asociadas, cuya ausencia o presencia se relaciona con el diagnóstico o pronóstico de una enfermedad.

SIRS: Síndrome de respuesta inflamatoria sistémica caracterizado por la presencia de al menos dos de los siguientes criterios: fiebre o hipotermia, taquicardia, taquipnea o hipocarbia y leucocitosis o leucopenia.

Sepsis: Síndrome clínico definido por la presencia de inflamación sistémica (SIRS) e infección.

Sepsis grave: Sepsis complicada con disfunción orgánica; esta última definida clínicamente como la disfunción fisiológica progresiva y potencialmente reversible en más de 2 órganos.

Choque séptico: Sepsis grave acompañado de compromiso hemodinámico sostenido y refractario a tratamiento médico.

Resultados

Sujetos incluidos

A partir de su diagnóstico y la aceptación por escrito a participar en el estudio, se reclutaron un total de 50 pacientes (37 pacientes con diagnóstico de sepsis y 13 pacientes con SIRS). De estos se excluyeron seis pacientes por no contar con datos clínicos completos y se eliminaron: un paciente seropositivo a VIH (post-toma de muestra), tres pacientes con diagnóstico de diabetes y cuatro más por muestra de calidad o cantidad inadecuada para ser procesada. Finalmente se incluyeron 31 pacientes con sepsis y 13 pacientes con SIRS, cuyas características demográficas y clínicas se resumen en la Tabla 3.

Tabla 3: Datos demográficos y parámetros clínicos de los pacientes.

	SIRS (n=13)	Sepsis (n=31)	p value ³ (SIRS vs Sepsis)	Sanos (n=14)
Edad (años)	42	40	0.5856	27
Sexo (Hombres:Mujeres)	6:7	15:16	0.9999	8:6
Temperatura °C	37.0°C	37.2°C	0.8500	36.5°C
Frecuencia cardiaca (ppm)	100	91	0.9999	107
Frecuencia respiratoria (rpm)	22	22	0.1261	18
Leucocitos (millones/mm ³)	15.70	16	0.4172	6.8
Glicemia (mg/dl)	79	106	0.4865	91

SOFA	3.311	4.129	0.6438	NA
APACHE	7.22	9.84	0.5574	NA

Cuantificación de citocinas séricas

A fin de caracterizar el estado pro/anti-inflamatorio en que se encontraban los pacientes, se cuantificó en suero, mediante inmunoensayo múltiple las citocinas: IL-1 β , TNF, IL-6, IL-8 e IL-10 y IL-1Ra. Como se observa en la Figura 2, la concentración sérica de IL-1 β , IL-6, IL-8 e IL-1Ra es significativamente mayor en los pacientes con inflamación sepsis en comparación con el suero de voluntarios sanos en donde se observan aumentos en IL-1Ra (2535.5 +/- 2568.2 pg/mL), IL-6 (373.3 +/- 639.3 pg/mL) e IL-8 (99.0 +/- 159.9 pg/mL) respecto a sujetos control (134.7 +/- 60.5 pg/mL; 1.5 pg/mL y 2.6 pg/mL) respectivamente.

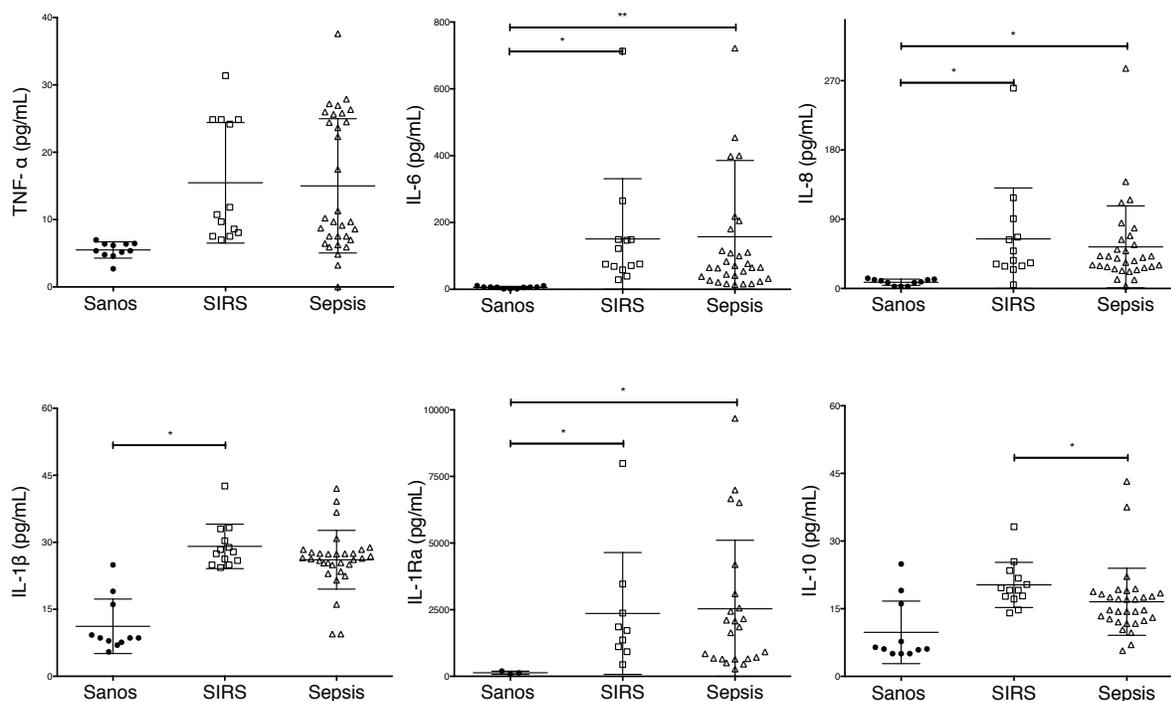


Figura 2. En pacientes con SIRS y sepsis la hipercitocinemia incluye componentes

pro y anti- inflamatorios. A partir de 200 μ L de suero de sujetos sanos (\bullet n= 11), SIRS (\square n=13) o de pacientes con sepsis (Δ n=31), se determinó mediante inmunoensayo (acoplado a perlas a excepción de IL-1Ra que fue con ELISA) las concentraciones séricas (pg/mL) de IL-1 β , IL-6, TNF, IL-10, IL-8, e IL-1Ra. Se presenta el valor promedio con los valores de desviación estándar. Cada símbolo representa un paciente. Kruskal-Wallis, con post prueba de Dunn; *p< 0.05, **p<0.01.

A fin de establecer si de acuerdo a las concentraciones de citocinas séricas existe polarización hacia un perfil pro o anti-inflamatorio y tal como se ha aplicado en reportes previos^[44, 48], se calcularon tanto pacientes con sepsis como con SIRS, las correlaciones entre IL-10 e IL-1Ra para la fase anti-inflamatoria y TNF, IL-1 β , IL-6 e IL-8 para la fase pro-inflamatoria. Como se muestra en la Figura 3 (paneles derechos), entre IL-1 β e IL-1Ra existe correlación directa positiva (r=0.453) y significativa (p=0.0063), lo mismo que entre IL-6 e IL-Ra (r=0.695, p<0.0001). Este mismo comportamiento, de correlaciones positivas y significativas, lo encontramos para: (Figura 3, paneles izquierdos) IL-10 e IL-1b (r=0.658, p<0.0001), IL-10 e IL-6 (r= 0.403, p=0.0023), y para IL-10 e IL-8 (r=0.464, p=0.0004)

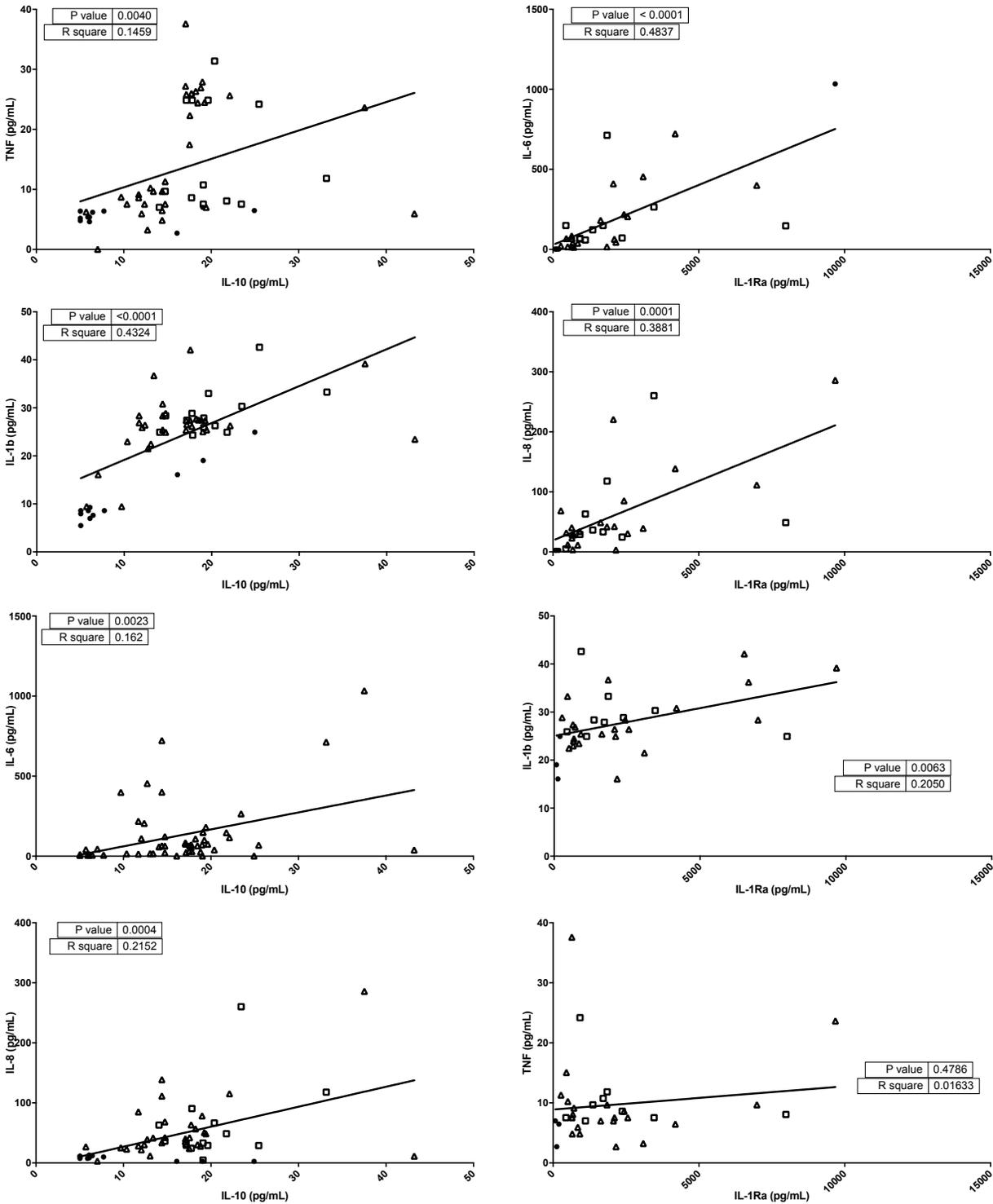


Figura 3. En suero de pacientes con SIRS/sepsis el ambiente de citocinas es mixto. A partir de las concentraciones séricas de las citocinas proinflamatorias: IL-1 β , TNF, IL-6 e IL-8, y anti-inflamatorias: IL-1Ra e IL-10, se calcularon las correlaciones en pacientes con sepsis (Δ n=31) SIRS (\square n=8). Prueba *rho* de Spearman

Después de evaluar el ambiente inflamatorio en suero de los grupos de estudio, se procedió a evaluar la presencia de células del sistema inmune en sangre periférica; en primera instancia evaluando las proporciones celulares y con ayuda de la biometría hemática se calculó el número absoluto de los distintos tipos de leucocitos (Figura 4). Se observa que los pacientes tanto SIRS como sepsis, presentan monocitosis y neutrofilia, respecto a los sujetos sanos.

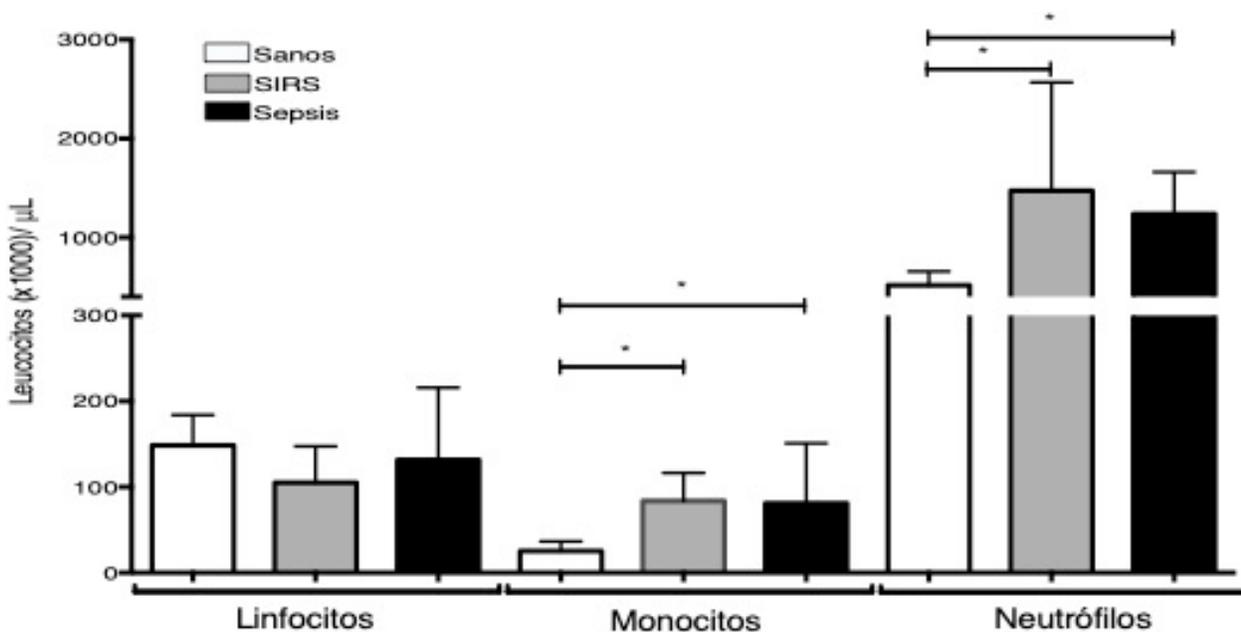


Figura 4. Neutrofilia y Monocitosis en sujetos SIRS y Sepsis respecto a sujetos sanos. Se muestran los números absolutos de células obtenidos mediante la biometría hemática y las proporciones analizadas por citometría de flujo, tanto para sujetos sanos como para pacientes SIRS o sépticos. . Kruskal-Wallis, con post prueba de Dunn; * $p < 0.05$.

Inmunofenotipo de activación de leucocitos

Como se menciona en la sección correspondiente de material y métodos, se estableció el inmunofenotipo de activación basado en la expresión de CD16, CD64, CD69, CCR7 y TREM-1 en monocitos y granulocitos. Para ello primero se identificaron las poblaciones

leucocitarias mayoritarias empleando 3 gráficas: FS-tamaño área (FSC-A) vs FS-tamaño altura (FSC-H) (que permite distinguir los eventos, equivalente a células individuales), el gráfico de FS-tamaño (FSC-A) vs SSC-complejidad (SSC-A) (que permite distinguir a las poblaciones compatibles con células viables en base a su tamaño y su complejidad relativa) y CD45 vs SSC-A (con la que se distinguen las subpoblaciones de linfocitos, monocitos y granulocitos) (**ANEXO III**). Para delimitar correctamente las subpoblaciones de interés se utilizaron los marcadores CD3 para linfocitos T, CD14 e IREM2 para monocitos y CD16 para neutrófilos.

Una vez identificada cada subpoblación se procedió a caracterizar cada una de las poblaciones de acuerdo a su expresión de marcadores asociados a activación: CD16 (solo para monocitos), CD64 (solo para neutrófilos), CD69, CCR7 y TREM1.

Como se muestra en la Figura 5 para los monocitos, solo en los pacientes con sepsis se incrementa significativamente la expresión de CD69 ($p < 0.05$), CCR7 ($p < 0.05$) y TREM1 ($p < 0.01$), respecto a sujetos sanos. En la figura 6 se muestra que solo los neutrófilos de pacientes con sepsis, pero no así los de SIRS, se incrementa significativamente la expresión de CD64, CD69 y TREM1, respecto a sujetos sanos. De allí que pensamos que son los monocitos y neutrófilos de sujetos con sepsis los que claramente presentan un inmunofenotipo de activación de acuerdo a la sobreexpresión de los marcadores explorados.

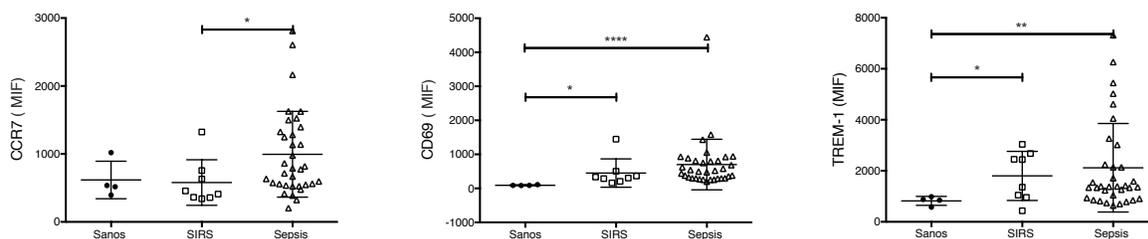


Figura 5. Monocitos de pacientes con sepsis presentan inmunofenotipo de activación. Utilizando citometría de flujo multiparamétrica se estableció la expresión relativa (como valor de la media de intensidad de fluorescencia o MIF) de CD69, CCR7 y TREM1 en monocitos (células CD45+, CD14+, IREM2+) de pacientes con sepsis (Δ n=31) y con SIRS (□ n=8) y controles sanos (● n=4). Cada punto representa a un paciente, se muestra el valor promedio junto con el error estándar. ANOVA de una vía (Kruskal-Wallis) con post-prueba de Dunn; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$.

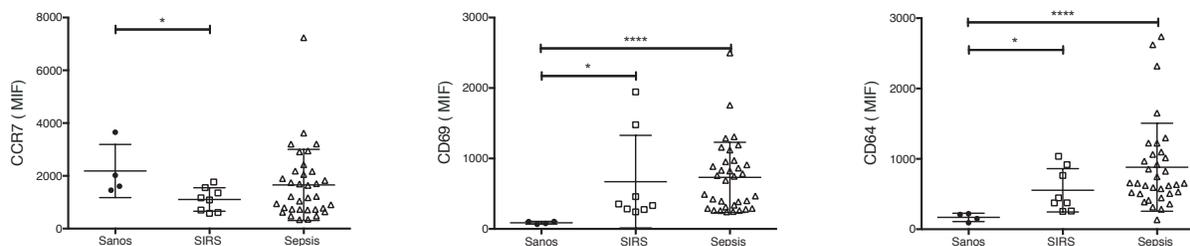


Figura 6. Neutrófilos de pacientes con sepsis presentan inmunofenotipo de activación. Utilizando citometría de flujo multiparamétrica se estableció la expresión relativa (como valor de la media de intensidad de fluorescencia o MIF) de CD64, CD69, y TREM1 en neutrófilos (células SSC^{high}, CD45⁺, CD16⁺) de pacientes con sepsis (Δ n=31) y con SIRS (\square n=8) y controles sanos (\bullet n=4). Cada punto representa a un paciente, se muestra el valor promedio junto con el error estándar. ANOVA de una vía (Kruskal-Wallis) con post-prueba de Dunn; *p<0.05, **p<0.01.

Expresión de CD107a

Dado que los eventos de activación de células mieloides incluyen la degranulación de las células, se determinó en inicio, como parte del inmunofenotipo la expresión de CD107a (LAMP1) en las poblaciones de monocitos y neutrófilos. Como se observa en la Figura 7, son los neutrófilos de pacientes con SIRS (696.5 +/- 273.4 MFI) y los pacientes con sepsis (1258 +/- 1787.6 MFI) los que incrementan significativamente la expresión de CD107a en comparación con sujetos sanos (161.9 +/- 117.8 MFI). Mientras que para monocitos solo se muestran tendencias a incrementar este marcador en los pacientes, pero sin existir diferencia estadística. Posterior a la expresión de marcadores se determinó la degranulación mediante la expresión relativa de SSC, dichos resultados se discutirán mas adelante.

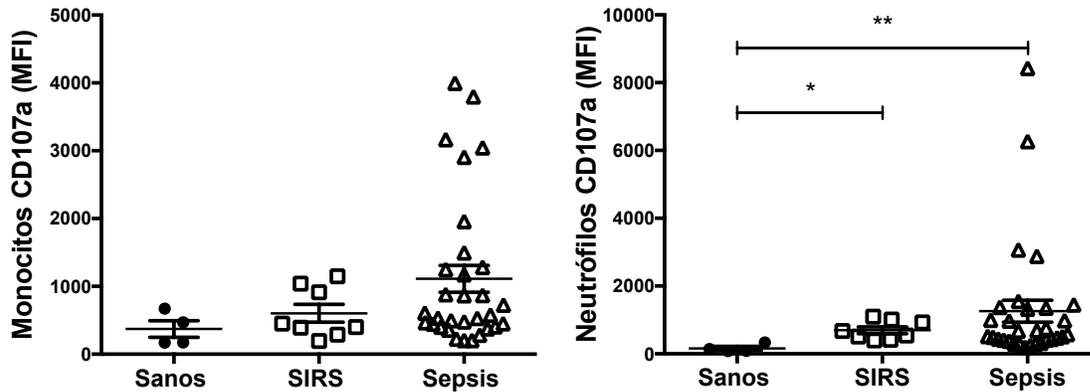


Figura 7. Monocitos y neutrófilos de pacientes con sepsis sobre-expresan CD107a. A partir de 3×10^5 células de sangre periférica de pacientes con sepsis (Δ $n=31$); y pacientes con SIRS (\square $n=8$) o sujetos control (\bullet $n=4$), se determinó mediante citometría de flujo la expresión relativa de CD107a (MFI). *Kruskal-Wallis, con pos prueba de Dunn's*; $*=p < 0.05$, $**=p < 0.01$.

Análisis de correlación múltiple y redes

Una vez obtenidos los datos de cantidad de citocinas séricas y niveles de expresión de moléculas de superficie, se procedió a realizar el análisis de asociación múltiple entre éstos datos, con las variables hemodinámicas, estudios de laboratorio y escalas de severidad del grupo de pacientes como se muestran en la Figura 8, en donde se representa una matriz de correlación de cada una de las variables numéricas antes mencionadas para la población de monocitos; cada elipse representa una correlación, si es azul es una correlación positiva, por el contrario, si la elipse es color rojo la correlación es negativa, entre más angosta sea la elipse representa un coeficiente de correlación de Pearson cercano a 1 o a -1 respectivamente.

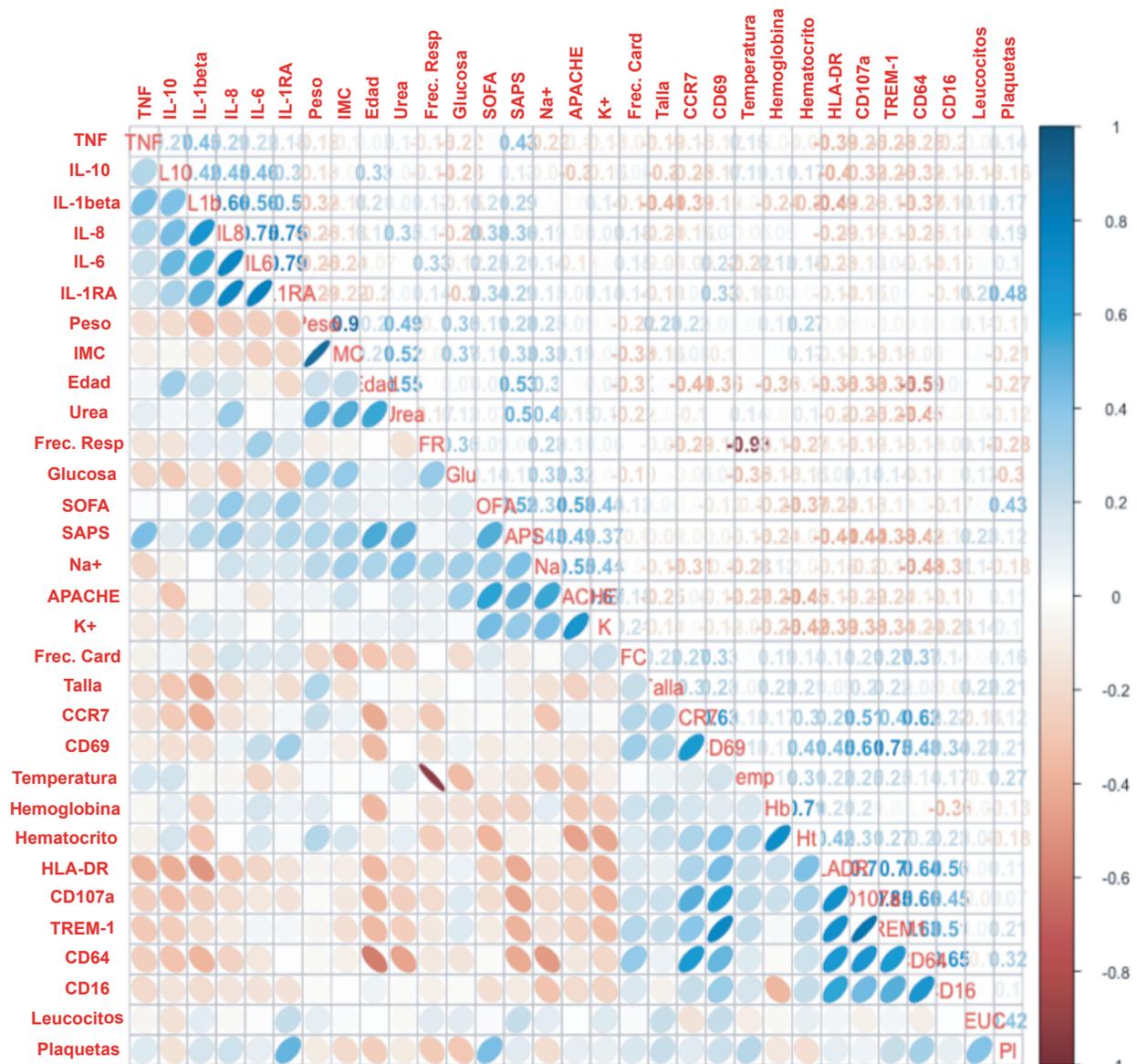


Figura 8. Matriz de correlación datos clínicos y citocinas séricas con marcadores de superficie en monocitos circulantes (Rho de Spearman). Se muestra por debajo de la diagonal las variables numéricas correlacionadas, círculos o elipses de diferente grosor o color, que indican si la correlación de Pearson es estadísticamente significativa (entre más estrecha mayor coeficiente de correlación mostrado en la parte superior de la diagonal) y el color indica: si es círculo y color blanco, no hay correlación; si es elipse y color azul, la correlación es positiva y si la elipse es roja la correlación es negativa.

Posteriormente, de la matriz de correlación se tomaron las más significativas que se dan con los marcadores de superficie y se realizaron análisis de correlación adicionando la

variable de severidad, para analizar cómo afecta la severidad del cuadro sistémico la expresión de los marcadores en superficie, o si son afectados por alguna otra variable clínica o demográfica.

Los resultados de estas correlaciones triples se muestran que la disminución de la expresión de CD64 correlaciona negativamente con la edad de los pacientes, pero no se ve afectada por la severidad del cuadro (Figura 9). También se observa que a mayores niveles de IL-1 β , disminuye la expresión de HLA-DR en la superficie de monocitos, esto independientemente del cuadro clínico (Figura 10)

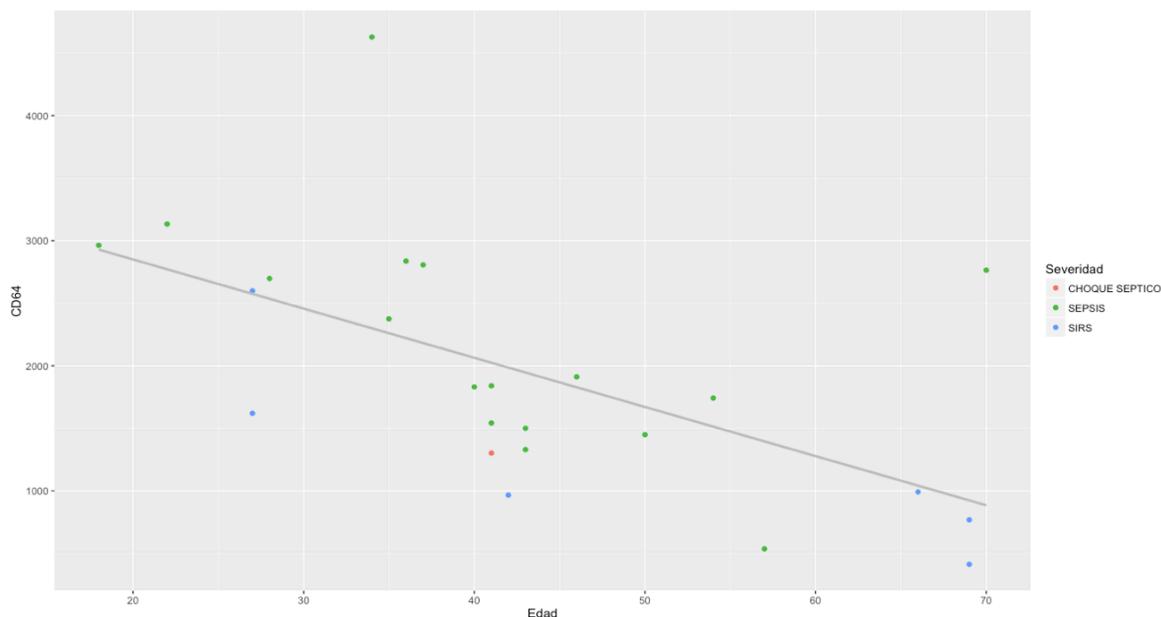


Figura 9. Disminución en la expresión de CD64 en monocitos circulantes conforme aumenta la edad. Se muestra disminución en la expresión de CD64 de la superficie de monocitos respecto al incremento en la edad, sin embargo, no parece que esto dependa directamente del cuadro SIRS-Sepsis-Choque Séptico.

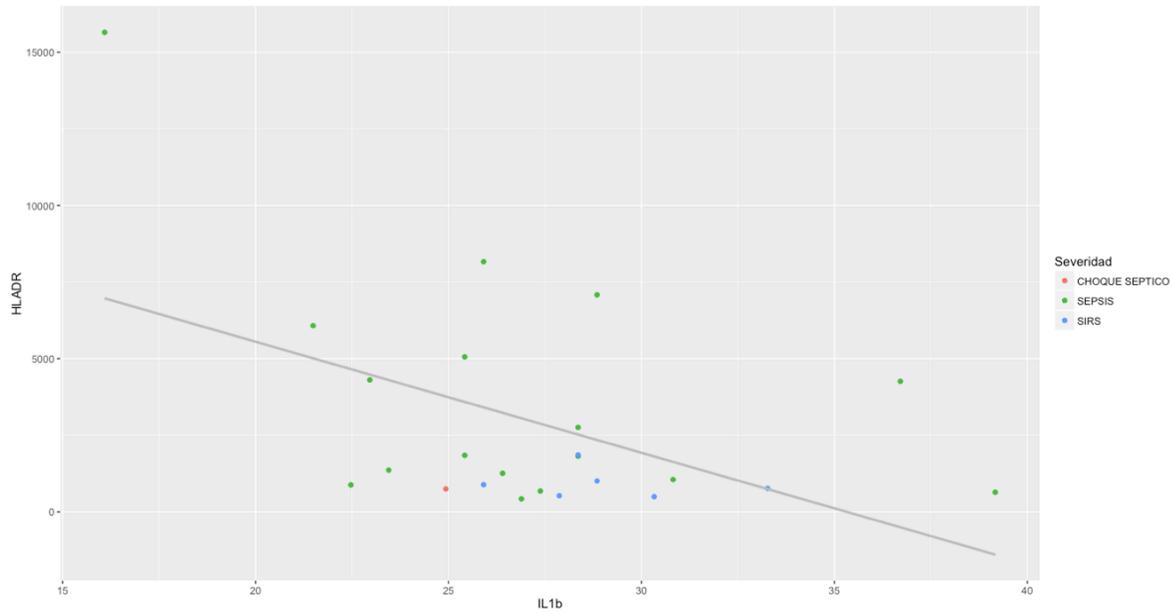


Figura 10. Menor expresión de HLA-DR, a mayores niveles séricos de IL-1 β . En los pacientes con inflamación sistémica se observa menor expresión de HLA-DR, a mayores niveles de IL-1 β , sin importar el cuadro clínico.

Una vez analizadas las múltiples correlaciones, se procedió a evaluar cuales de las variables están relacionadas entre sí con un análisis de redes, que lo que hace es buscar los “nodos” o las variables centrales, es decir las que se ven más afectadas con el aumento o disminución de otras, para así establecer si existen asociaciones directas entre la expresión de marcadores o citocinas con variables clínicas, hemodinámicas o de severidad (Figura 11).

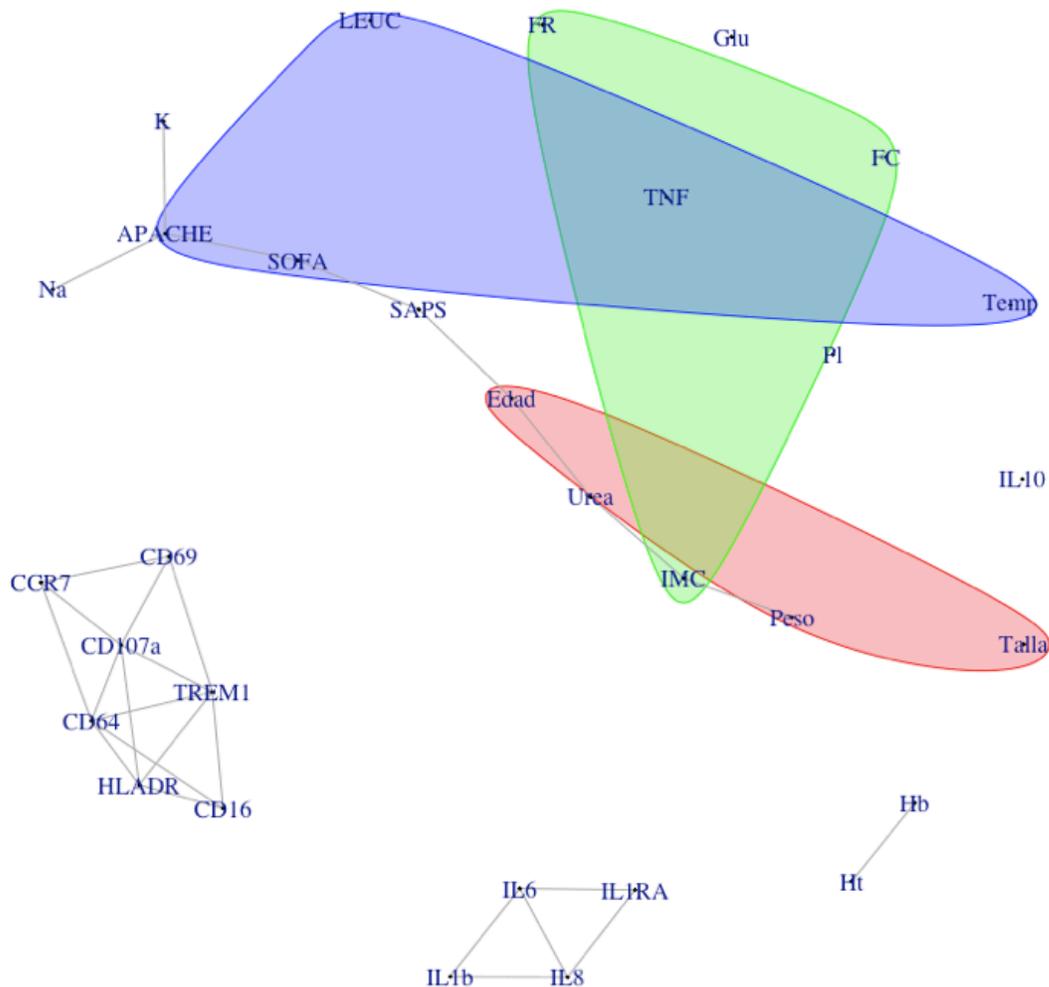


Figura 11. Análisis de redes entre marcadores en monocitos, citocinas séricas, variables hemodinámicas y de severidad. Se muestra la relación que existe entre los marcadores de superficie de monocitos con variables clínicas o hemodinámicas. Si existe una relación directa entre los parámetros se conectarán mediante una línea, si existe relación con más de una variable se encerrará en una nube, siendo centro de un nodo.

Éste mismo tipo de análisis se repitió para la población de neutrófilos, mostrando en la Figura 12 la matriz de correlación múltiple de la cual se derivaron las correlaciones triples mostradas en la Figura 13 en donde se muestra que la expresión de CCR7 se encuentra disminuida cuando existes altos niveles de IL-1beta en suero y que esto es independiente del cuadro (SIRS/sepsis/Choque séptico); en la Figura 14 observamos incrementos de CD107a y TREM-1 cuando se encuentra incrementado CD69 en superficie de neutrófilos; y en la Figura 15 observamos que se incrementa CD107a a mayor nivel de CD16, y esto es independiente del cuadro clínico presentado (SIRS/Sepsis/choque séptico).

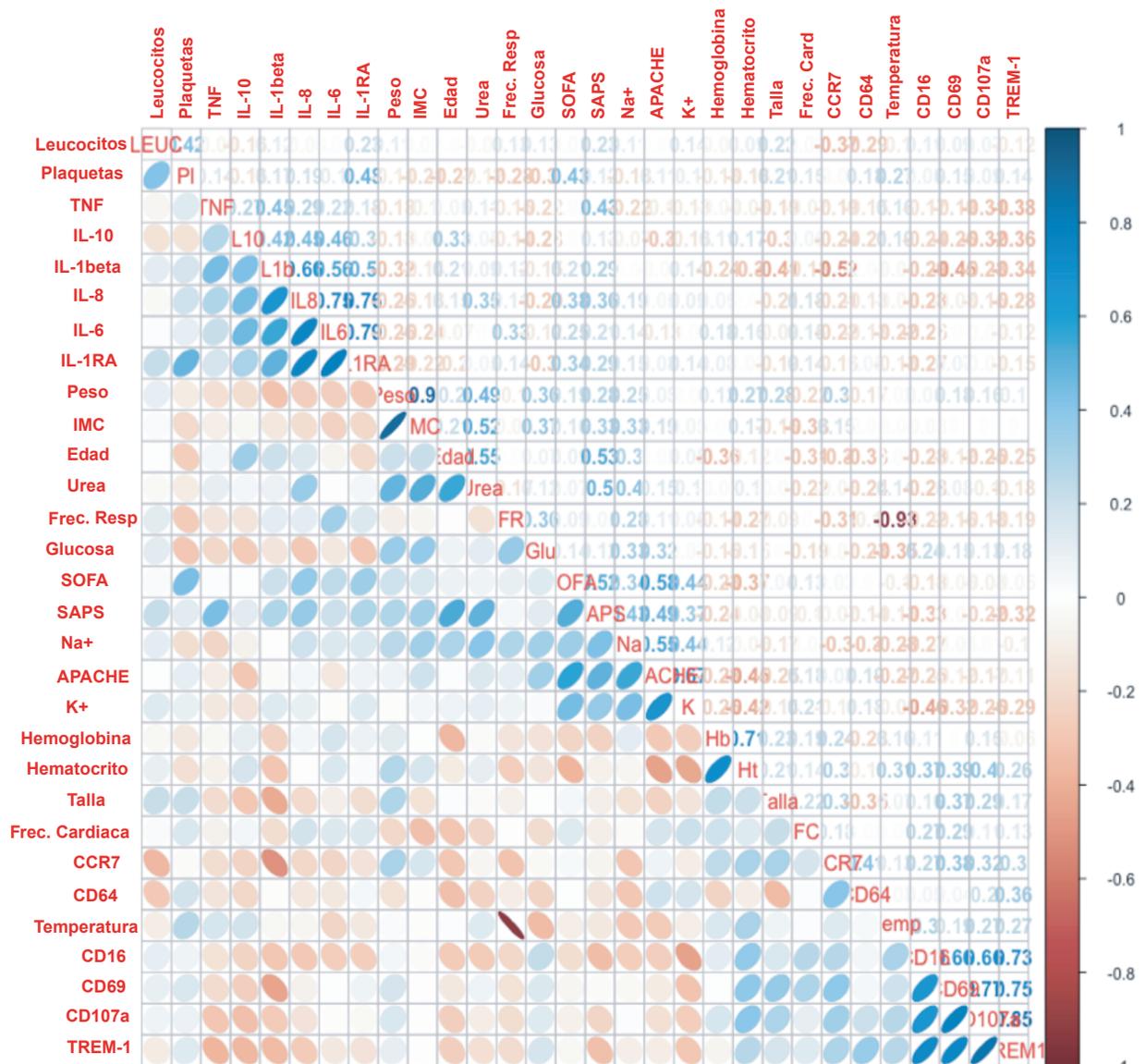


Figura 12. Matriz de correlación datos clínicos y citocinas séricas con marcadores de superficie en neutrófilos circulantes. Se observa por debajo de la diagonal que muestra las variables numéricas correlacionadas, círculos o elipses de diferente grosor o color, que indican si la correlación de Pearson es estadísticamente significativa (entre más estrecha mayor coeficiente de correlación mostrado en la parte superior de la diagonal) y el color indica: si es círculo y color blanco, no hay correlación; si es elipse y color azul, la correlación es positiva y si la elipse es roja la correlación es negativa.

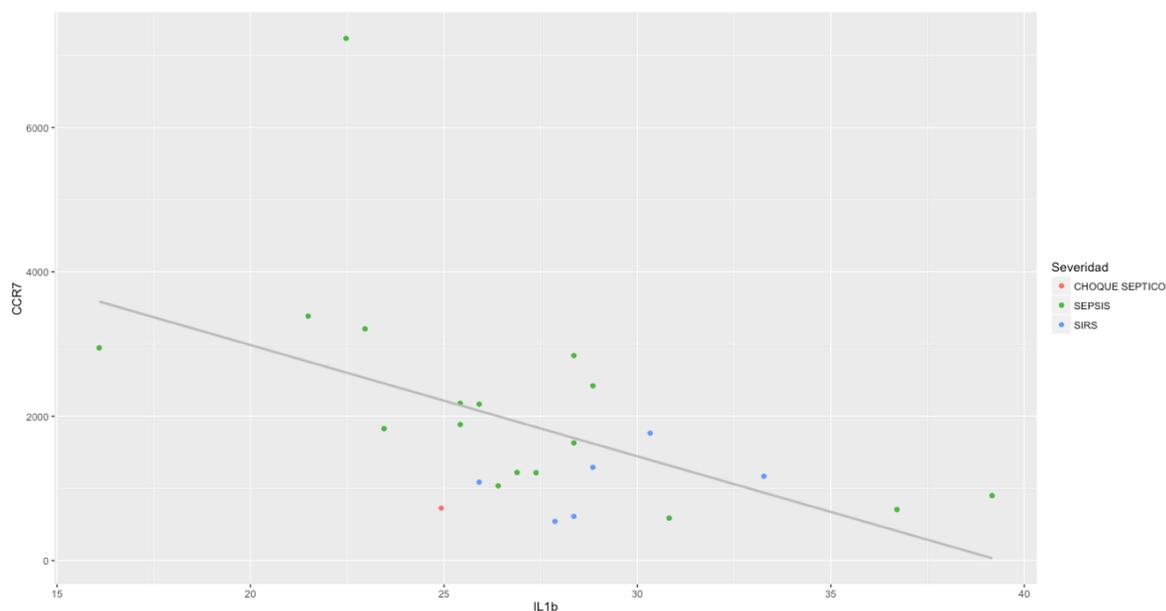


Figura 13. Menor expresión de CCR7 en neutrófilos, a mayores niveles séricos de IL-1beta. En los pacientes con inflamación sistémica se observa menor expresión de CCR7 en la superficie de neutrófilos, a mayores niveles de IL-1beta, sin importar el cuadro clínico.

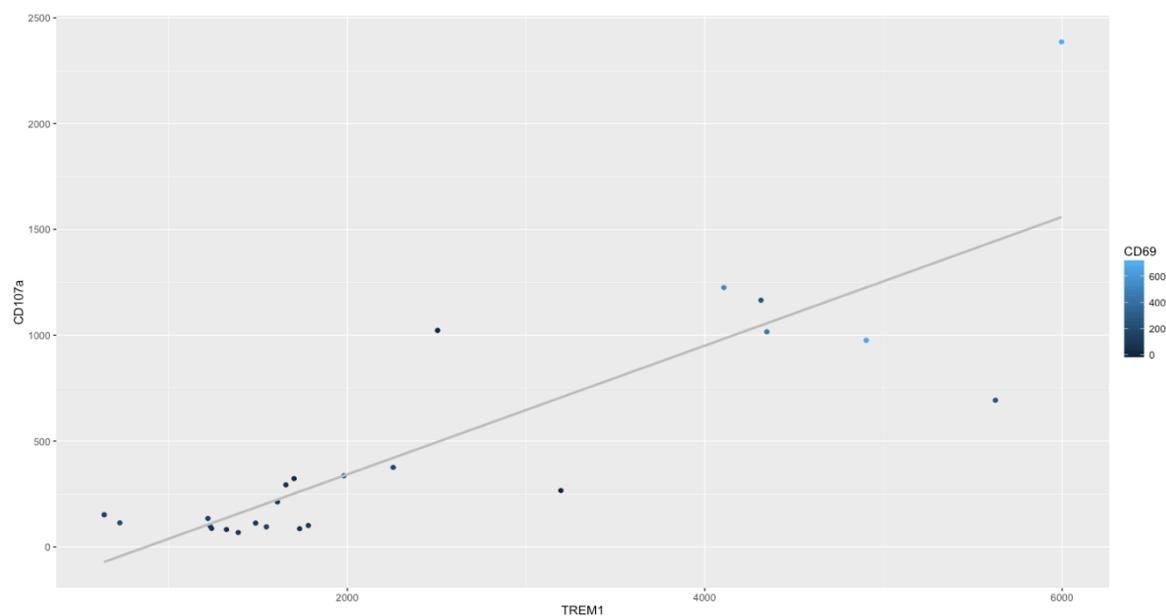


Figura 14. Incremento de CD107a y TREM-1, respecto a elevados niveles de CD69 en neutrófilos. En los pacientes con inflamación sistémica se observa que cuando incrementa la expresión de CD69, también incrementan la expresión de CD107a y TREM-1 en la superficie de neutrófilos.

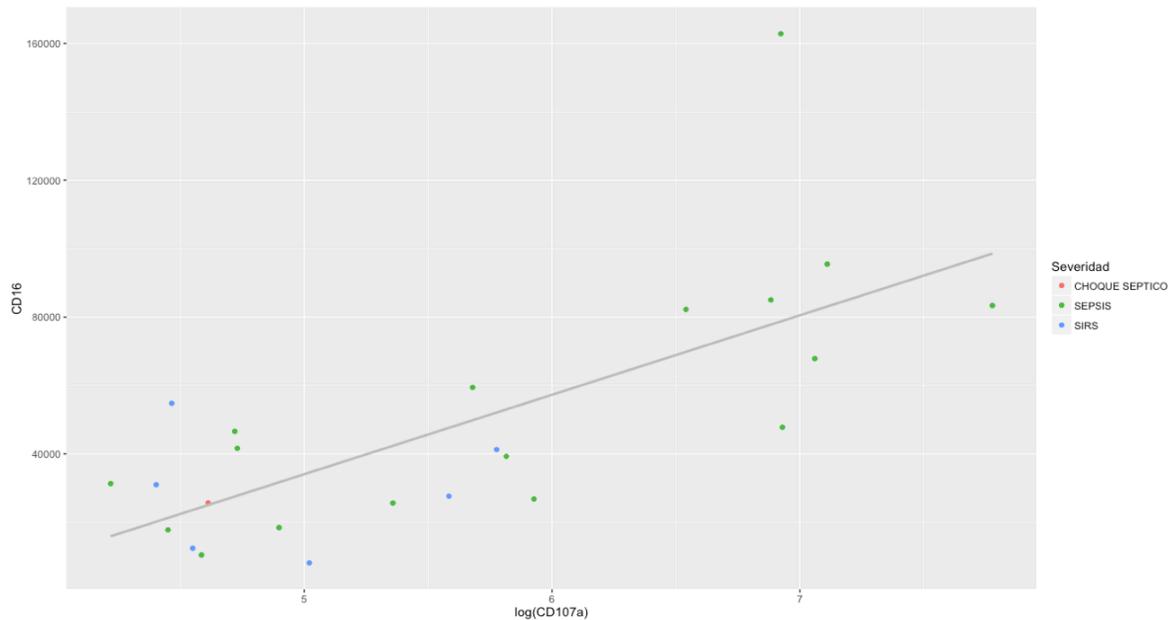


Figura 15. Mayor expresión de CD16, cuando se encuentra elevada la degranulación (CD107a^{hi}). En los pacientes con inflamación sistémica se observan niveles elevados de expresión de CD16, a mayores niveles de CD107a, sin importar el cuadro clínico.

Basado en las correlaciones triples realizadas para la población de neutrófilos (Figura 16), se desarrollo un ensayo de redes en busca de los “nodos” o las variables centrales, es decir las que se ven más afectadas con el aumento o disminución de otras, para así establecer si existe asociaciones directas entre la expresión de marcadores o citocinas con variables clínicas, hemodinámicas o de severidad de los pacientes.

Observamos que como paso para la población de monocitos, en los neutrófilos las citocinas (a excepción de IL-10) solo se asocian entre sí, al igual que los marcadores de superficie, siendo los centros del “nodo” CD16 y CD107a. Sin embargo existe un marcador que es el que se presenta como nodo central entre las variables hemodinámicas y de severidad, que es CCR7.

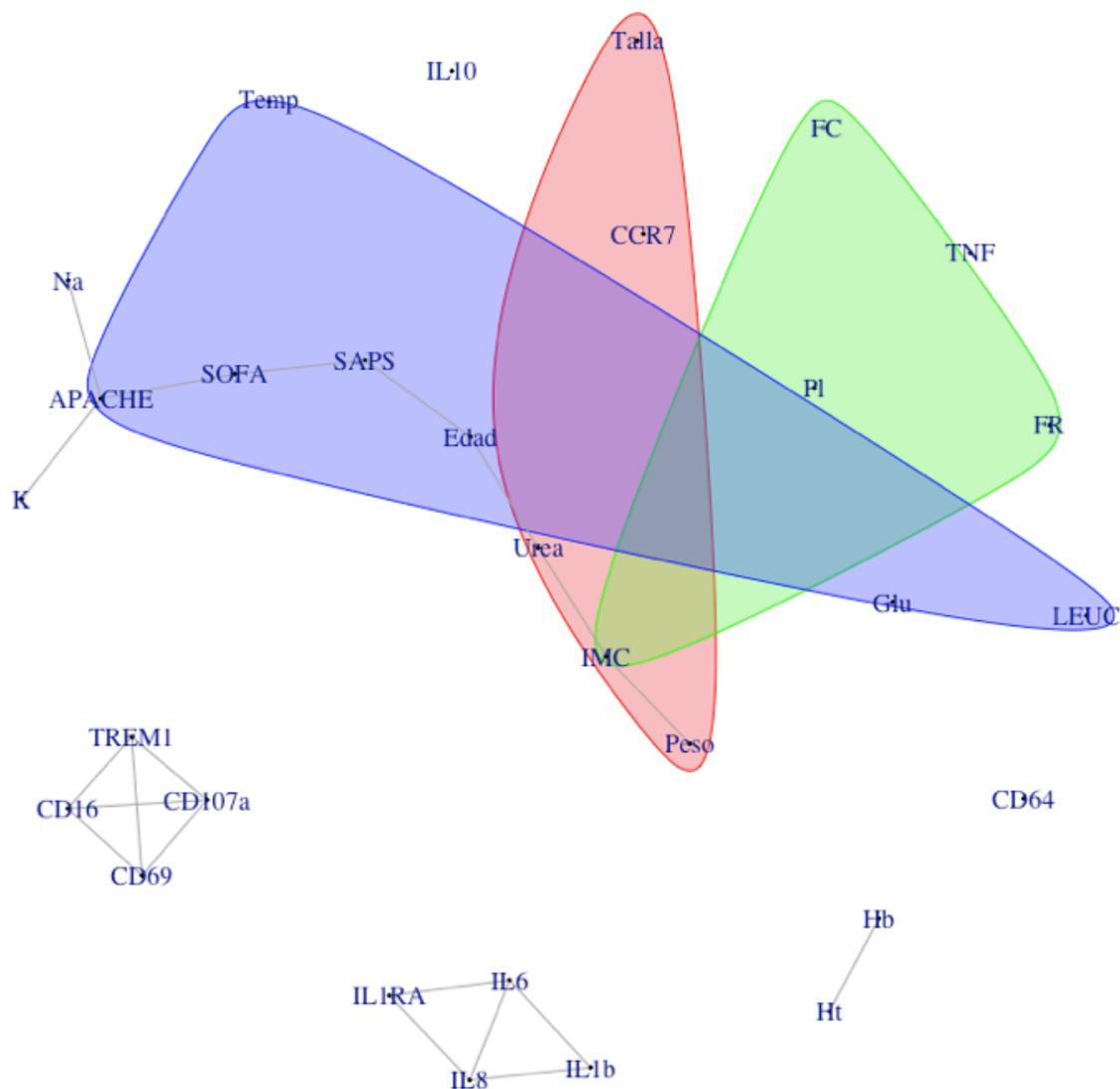


Figura 16. Análisis de redes entre marcadores en neutrófilos, citocinas séricas, variables hemodinámicas y de severidad. Se muestra la relación que existe entre los marcadores de superficie de neutrófilos con variables clínicas o hemodinámicas. Si existe una relación directa entre los parámetros se conectarán mediante una línea, si existe relación con más de una variable se encerrará en una nube, siendo centro de un nodo.

Los cambios mostrados en los inmunofenotipos, y en las correlaciones realizadas, sugieren alteraciones en funciones celulares, es por ello que lo siguiente que nos propusimos fue evaluar funciones asociadas a los marcadores de membrana en los leucocitos de sangre periférica.

Evaluación de la capacidad endo-fagocítica en monocitos-neutrófilos de pacientes con SIRS/sepsis.

Para poder evaluar la capacidad de eliminación bacteriana y con base a los datos obtenidos de degranulación y a la expresión de CD107a, lo siguiente que hicimos fue evaluar degranulación mediante la señal obtenida en el detector de SSC, graficando en una primera instancia FSC vs SSC para observar las 3 principales poblaciones leucocitarias en sangre periférica, posteriormente se graficó el cambio en la media de fluorescencia para SSC; Figura 17, en donde se observó disminución en la granularidad para los neutrófilos y monocitos de los pacientes con sepsis respecto a los sujetos sanos. Dichos resultados sugerían que, al presentar menor cantidad de gránulos, los neutrófilos de los pacientes con sepsis, pudiesen ser células ya activadas lo que impactaría en la capacidad de eliminación bacteriana que pudiesen presentar dichas células. Para eso se desarrollaron experimentos de eliminación con ayuda de un kit comercial pH Rodo. La identificación de las poblaciones leucocitarias a las cuales se les evaluó su capacidad endo-fagocítica en cada uno de los sujetos estudiados, se emplearon 3 gráficas: FS-tamaño área (FSC-A) vs FS-tamaño altura (FSC-H), que permite distinguir los eventos o células individuales y el gráfico de FS-tamaño (FSC-A) vs SSC-complejidad (SSC-A), que permite distinguir a las poblaciones en base a su tamaño y su complejidad, el gráfico de la expresión de CD45 vs SSC-A para separar los tres grandes grupos de leucocitos con base a su expresión diferencial de CD45 y un gráfico que muestra la expresión de CD14 vs la expresión de CD16, que permite la identificación de neutrófilos y monocitos. Posteriormente se grafica la expresión de CD14 vs pH Green para evaluar el porcentaje de células que internalizan bacterias (Figura 18)

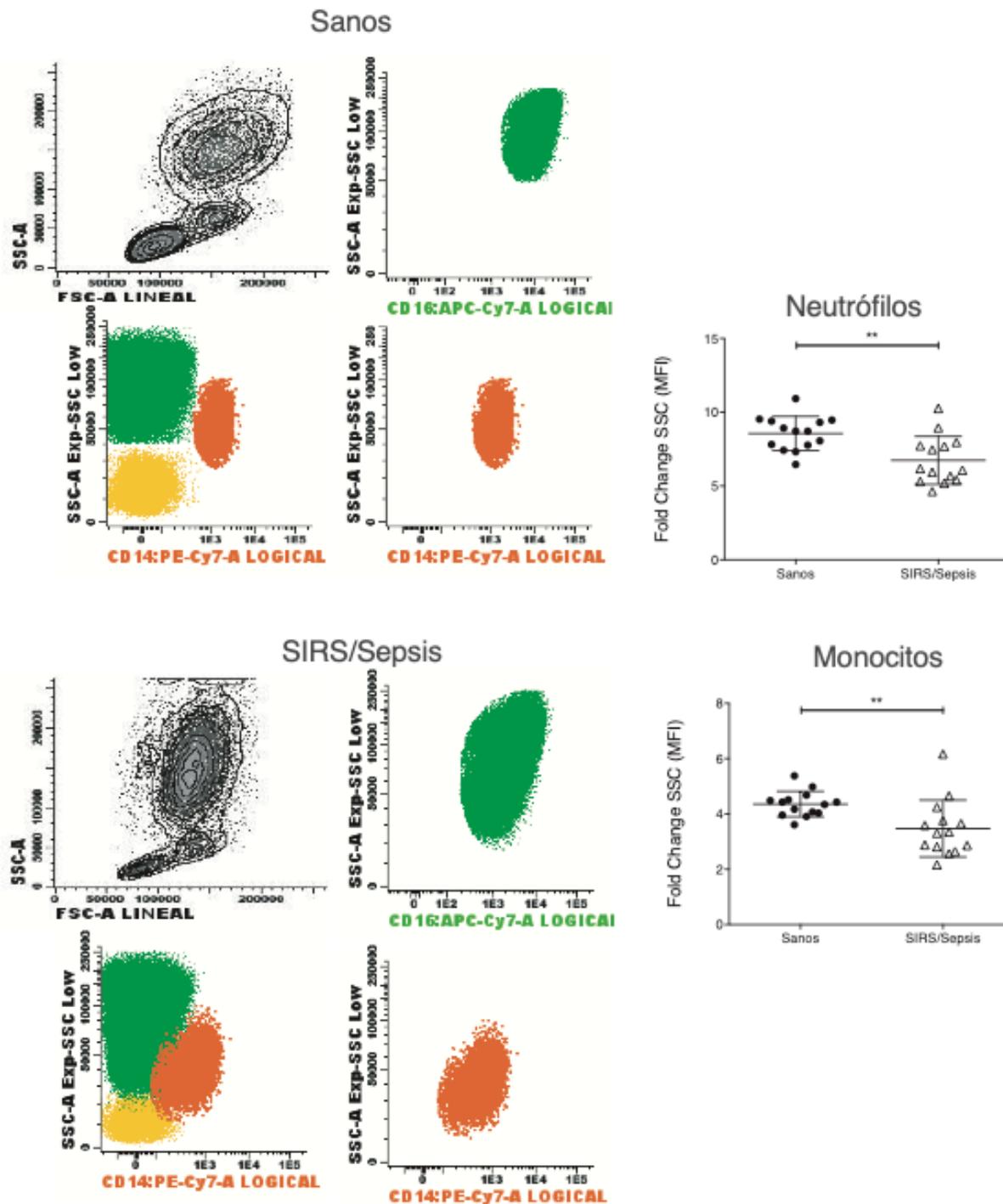


Figura 17. Degranulación en pacientes con inflamación sistémica SIRS/sepsis en comparación con sujetos sanos. Se grafica la granularidad relativa SSC tanto en sujetos sanos y pacientes con SIRS/sepsis (Gráficos lado izquierdo), además de los cambios en la mediana para complejidad relativa en las poblaciones de neutrófilos y monocitos respecto a la población de linfocitos (graficas lado derecho). U Mann-Whitney. ** p < 0.01,

Una vez identificadas las distintas poblaciones celulares, se procedió a realizar la caracterización de las células fagocíticas con base a la expresión de pH Green, tomando las células incubadas a 4°C como control negativo. Las células pH Green +, corresponden a aquellas que internalizaron *E. coli* (Figura 18). De la población positiva para pH Green se obtuvo la media de fluorescencia a 4°C y a 37°C, ya que dicha partícula fluorescente se activa con cambios de pH, es decir a menor pH la partícula genera mayor fluorescencia de acuerdo a las indicaciones del fabricante (pHrodo® Green *E. coli* BioParticles® Conjugate for Phagocytosis (Life Technologies, Carlsbad, CA, E.U.), lo que indicaría entonces mayor capacidad de destrucción bacteriana, para normalizar los datos las veces de incremento en la fluorescencia, se dividió el valor de la fluorescencia a 37°C entre el valor de la fluorescencia a 4°C, con lo que obtenemos las veces de incremento, y dividiendo ese valor entre el número de eventos por población obtenemos el valor de incremento por célula (Figura 18).

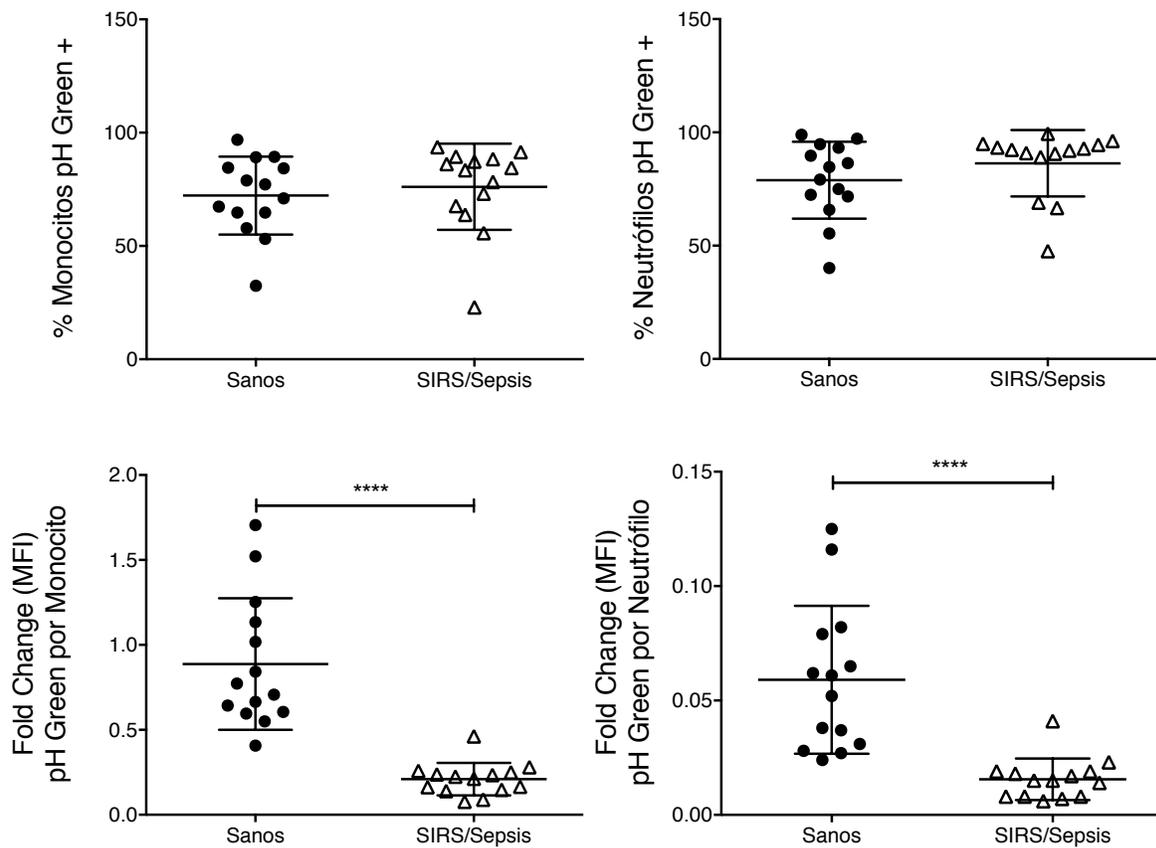


Figura 18. Neutrófilos y monocitos de paciente son capaces de internalizar *E. coli-pH Green*. De monocitos y neutrófilos caracterizados por la expresión de CD14 y CD16 respectivamente se muestra el porcentaje de células positivas para pH Green sin diferencias estadísticamente significativas entre los grupos (sanos n=14; sépticos n=14) pero con una tendencia a ser mayor en el grupo de pacientes; además se muestra el incremento en el potencial de eliminación dado por media de fluorescencia respecto al control a 4°C ****p< 0.0001.

De los datos obtenidos del ensayo de eliminación mediante citometría de flujo, los cuales se pueden interpretar como solo acidificación del fago-lisosoma, había que comprobar por otra técnica si los pacientes eliminaban menos bacteria, así que se realizó un ensayo de eliminación bacteriana y recuperación de UFCs, en el cual se colocaron leucocitos de sangre periférica (2×10^6) con *E. Coli* DH-5 α (1×10^5 UFC) de 4 pacientes con sepsis y 3 sujetos sanos, en donde las bacterias que no hayan eliminado los leucocitos crecerían en una placa de agar, realizando así el conteo (Figura 19), obteniendo que los pacientes eliminan menos bacteria viva, cabe mencionar que de acuerdo a los resultados de la biometría hemática (Tabla 3), a los porcentajes y números absolutos obtenidos mediante citometría de flujo (Figura 4), suponemos que el mayor número de células en la suspensión de leucocitos correspondería a neutrófilos, con lo que se demuestra la deficiencia en la capacidad de eliminación bacteriana en dicha población.

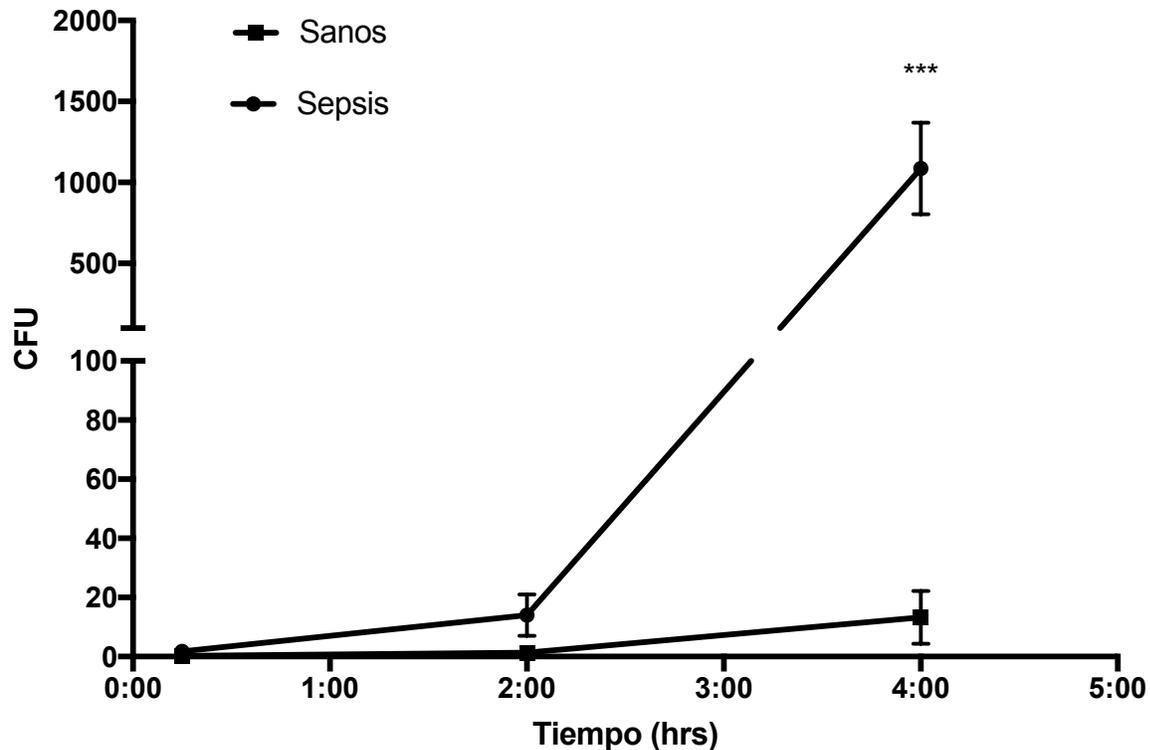


Figura 19. La eliminación bacteriana por los leucocitos disminuye en sepsis. Los leucocitos de sangre periférica total (2×10^6) fueron expuestos a *E. coli*-GFP (1×10^5) a 37°C . Después de lavar las células con antibiótico, las células se lisaron con desoxicolato y el lisado de leucocitos se sembró en agar LB. La eliminación bacteriana se determinó por las UFC formadas en las placas a las 0.25, 2 y 4 h después de la exposición inicial a las bacterias. Los valores medios con error estándar se dan para 4 pacientes con sepsis y 3 donantes sanos. U Mann-Whitney. *** $p < 0,001$.

Evaluación de fosfoproteínas a nivel unicelular

Dado que estudios anteriores en el laboratorio buscando receptores logramos identificar que la expresión en monocitos y neutrófilos de TLR2 es similar en pacientes sépticos (independientemente de la gravedad) vs sujetos sanos^[66]; además considerando que de acuerdo a múltiples trabajos han mostrado que se expresan niveles similares a incluso algunos muestran aumento en receptores como TLR4^[45, 67, 68], IL-10R^[69, 70] o GM-CSFR^[71, 72]; en donde en algunos casos incluso se han llegado a proponer tratamientos con GM-CS para mejorar el pronóstico de los pacientes^[73, 74]. Dichos estudios nos permitieron asumir que estos receptores se encuentran expresados en la población de pacientes con sepsis y por ello podemos hacer evaluación de la activación de las vías de

señalización con ligandos como LPS, IL-10 y GM-CSF.

Para la identificación de las poblaciones leucocitarias en cada uno de los sujetos estudiados, se emplearon 3 gráficas: FS-tamaño área (FSC-A) vs FS-tamaño altura (FSC-H), que permite distinguir los eventos o células individuales; el gráfico de FS-tamaño (FSC-A) vs SSC-complejidad (SSC-A), que permite distinguir a las poblaciones en base a su tamaño y su complejidad; y el gráfico de la expresión de CD45 y expresión de CD14, que permite la identificación de monocitos (ANEXO IV). De esta población se desplegó un histograma para ver la MFI de p38, pSTAT3 y pSTAT5, tras estímulos con LPS, IL-10 y GM-CSF respectivamente, dicha MFI habla del nivel de activación de cada una de estas vías.

En la Figura 20 se muestran los cambios en la media de fluorescencia para p-p38, en neutrófilos y monocitos después de ser estimulados con LPS (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), observando que ambas poblaciones celulares, pero sobre todo en monocitos es más evidente el fenómeno de disminución en la activación de la vía de p38 en los pacientes con sepsis

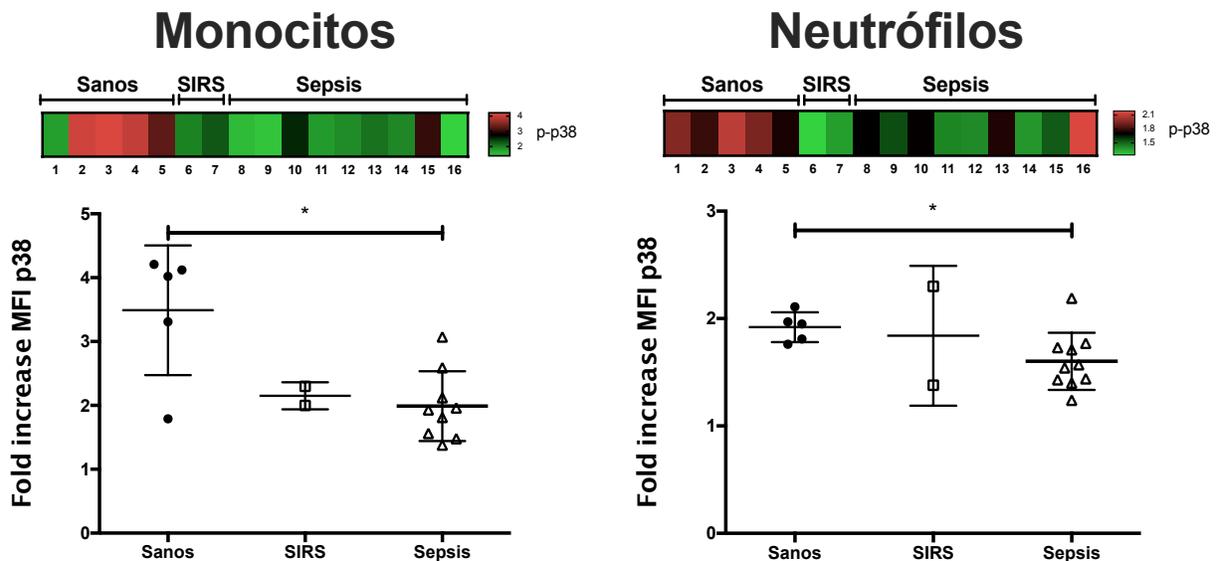


Figura 20. Pacientes con SIRS/sepsis disminuyen la activación de la vía de señalización de p38. Después de 15 minutos de incubar 50uL de sangre periférica de voluntarios sanos ● (n=5), pacientes con diagnóstico de SIRS □ (n=2) o pacientes con sepsis Δ (n=9) con o sin LPS (100ng/mL) se verificó la presencia de fosforilación para p38 en monocitos (leucocitos CD14+) del grupo de sujetos control en comparación con pacientes con sepsis; *U-Mann Whitney* *= $p < 0.05$.

Del mismo modo se desarrolló el ensayo para evaluar la activación de la vía STAT3 en la población de monocitos y neutrófilos tras la activación con IL-10 (50ng/mL). Como se muestra en la Figura 21, sólo la población de monocitos muestra disminuida su capacidad de activar la vía de STAT3.

Para finalizar la evaluación de las vías de señalización se evaluó la vía de STAT5 en monocitos y neutrófilos tras la activación con GM-CSF (50ng/mL), observando como se muestra en la Figura 22, ambas poblaciones celulares pueden activar esta vía normalmente en el grupo de pacientes comparado con los sujetos control.

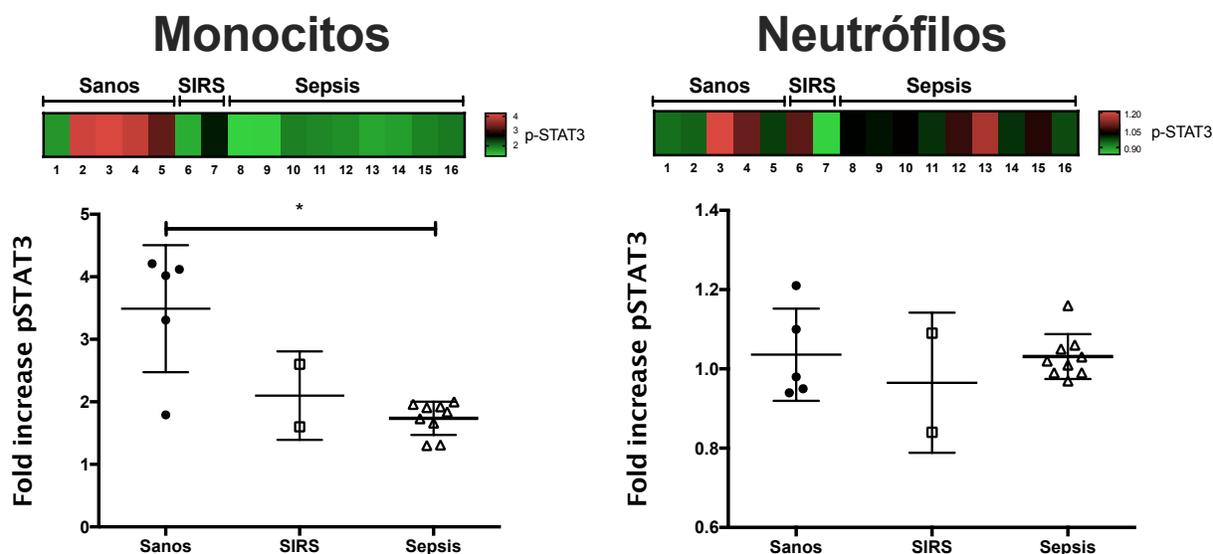


Figura 21: Pacientes con sepsis activan menos la vía de señalización de pSTAT3 en respuesta a IL-10. Tras un estímulo con IL-10 (50ng/mL) en sangre periférica de voluntarios sanos ● (n=5), pacientes con diagnóstico de SIRS □ n=2) y pacientes con sepsis Δ (n=9) se observa menor aumento en la fosforilación de pSTAT3 en monocitos (CD45+, CD14+) del grupo de pacientes con sepsis en comparación con sujetos sanos. *U-Mann Whitney* *=p<0.05

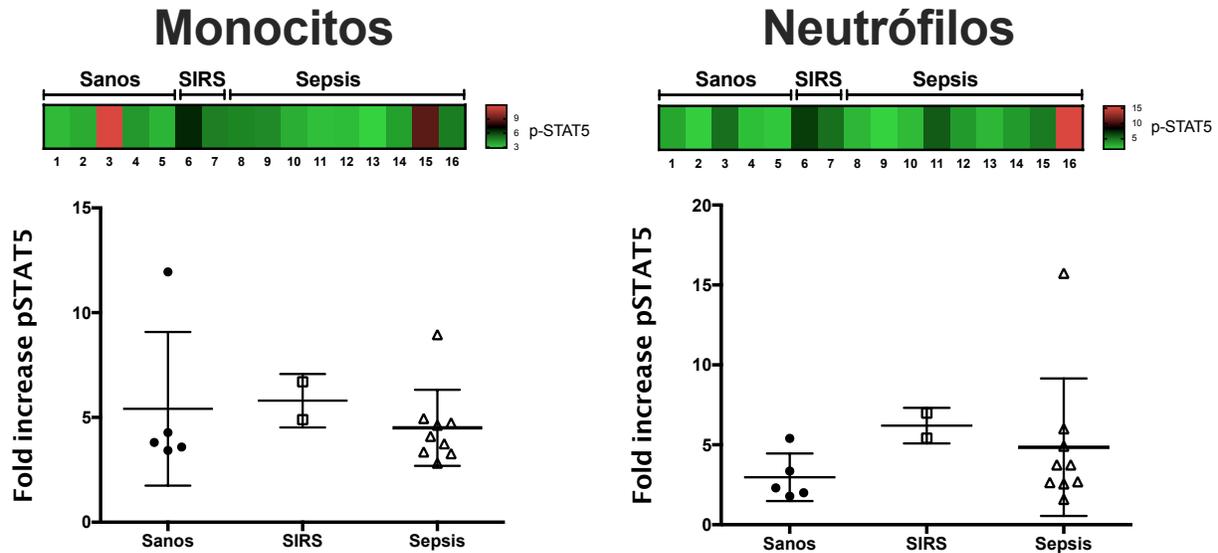


Figura 22. No existe alteración en la activación de la vía de señalización de pSTAT5 en pacientes con inflamación sistémica. Tras un estímulo con GM-CSF (50ng/mL) en 50uL de sangre periférica de voluntarios sanos ● (n=5), pacientes con diagnóstico de SIRS □ (n=2) y pacientes con sepsis Δ (n=9) no se observan diferencias estadísticamente significativas en la respuesta que presentan los grupos de estudio, solo se observa una tendencia a aumentar la fosforilación de pSTAT5 en el grupo de pacientes con SIRS respecto al grupo de voluntarios sanos. *U-Mann Whitney* *=p<0.05

Los resultados de la evaluación de activación en vías de señalización (p38, pSTAT3 y pSTAT5) posterior a los estímulos correspondientes (LPS (100 µg/mL); IL-10 (50ng/mL) y GM-CSF (50ng/mL), respectivamente) muestran que los pacientes presentan alteraciones en la capacidad de respuesta, disminuyendo en el caso de la activación de p38 y la fosforilación de pSTAT3 en el caso de los pacientes con sepsis comparados con los sujetos control; en el caso de los pacientes con SIRS solo se pueden hacer especulaciones debido a la baja cantidad de sujetos analizados para la activación de vías de señalización.

Discusión

A lo largo del tiempo la sepsis ha representado un problema de salud a nivel mundial^[31, 35], por la dificultad que representa el saber el origen de esta patología, la fase en la que se encuentra y por ende el tratamiento específico que se debe dar a los pacientes. Las guías para el manejo de estos pacientes incluyen muchas medidas generales y no suele dividirse por tratamiento específico para el agente causal ni para la fase pro o anti-inflamatoria con la que estén cursando^[30, 36, 38]. Aun cuando se dispone de algunas herramientas útiles para los médicos en el seguimiento de pacientes con sepsis, como los niveles de procalcitonina, proteína C reactiva, expresión de CD64 en neutrófilos, niveles séricos de IL-6, hasta ahora no se ha logrado estandarizar los criterios para que éstas determinaciones puedan ser parte de la batería de estudios de laboratorio y/o gabinete que se realizan en los centros de atención hospitalaria o bien no son aplicables a aproximadamente 30% de los pacientes con enfermedades crónico-degenerativas subyacentes^[48, 75-79].

Siguiendo ésta línea de pensamiento, decidimos evaluar la presencia de citocinas en suero en los grupos de estudio; esto con el fin de poder discriminar la fase del estado inflamatorio que predomina en éstos sujetos como se ha sugerido en estudios previos^[78, 80, 81]. Sin embargo en nuestra cohorte de pacientes, como lo muestran las **Figuras 1 y 2** observamos que se presentan niveles elevados de citocinas tanto pro-inflamatorias como anti-inflamatorias, sugiriendo la presencia del denominado síndrome de respuesta antagonista mixta o (MARS por sus siglas en inglés), como han sugerido algunos estudios^[82, 83].

Todo este ambiente inflamatorio mixto, puede tener repercusión en las células del sistema inmune circulantes y una forma de evaluarlo es realizando un análisis del fenotipo que dichas células presentan. En el presente trabajo, haciendo uso de un panel de marcadores para citometría de flujo, se evaluaron células mieloides circulantes con inmunofenotipo “activado” de pacientes con SIRS/sepsis, en busca de alteraciones sugeridas por dicho inmunofenotipo; como la activación celular y producción de citocinas sugerida por TREM1^[58], la proporción de neutrófilos, las capacidades de internalización, activación del fagolisosoma, y eliminación bacteriana, así como activación de vías de señalización.

El panel utilizado nos permite identificar cada una de las poblaciones de leucocitos presentes en sangre periférica tanto de los pacientes sépticos, SIRS, así como de los sujetos sanos y con los datos de porcentaje obtenido en éste análisis por citometría de flujo y los datos de cuenta de leucocitos totales, se obtiene el número absoluto de cada una de éstas subpoblaciones, observando que los controles sanos presentan números normales de acuerdo a los reportes existentes^[84, 85], y que los sujetos sépticos presentan neutrofilia (mayor a 6.35×10^6 cel/mL) y monocitosis (mayor a 1×10^6 cel/mL) circulantes. Cabe resaltar que dichas modificaciones en las poblaciones celulares pueden deberse a la resistencia a apoptosis que se presenta en neutrófilos, así como aumentos en la producción debido a los requerimientos en sangre como ya ha sido reportado en otros estudios^[86] generando los cambios vistos en ésta patología^[87].

Para los marcadores de activación, en el caso de monocitos, obtuvimos resultados congruentes con lo reportado anteriormente para TREM-1^[62]. En dicho trabajo de González –Roldán y colaboradores, reportan menores frecuencias de monocitos que expresan HLA-DR y aumento en la expresión de TREM-1 en pacientes que fallecieron, lo cual asocian con el pronóstico. En nuestro caso particular, para ésta corte de pacientes, no observamos disminución en la molécula HLA-DR, lo que puede deberse a la severidad que presentaban los pacientes reclutados, en donde es menor, comparado con el estudio de González-Roldan y en lo observado en un trabajo previo a éste^[88].

También replicamos el aumento de CD64 en la superficie de los granulocitos, que previamente se ha reportado para pacientes con sepsis, tanto de neonatos como de adultos^[76, 89-91]. Lo que hasta el momento no se había reportado, es que en estos granulocitos disminuye la expresión de CD16 en membrana, lo cual podría relacionarse con el recambio de este receptor de baja afinidad para Fc (fracción cristalizable) por uno de alta afinidad y con ello favorecer la capacidad fagocítica de estas células, con lo que se eliminarían más eficientemente algunos agentes patógenos extracelulares^[76]. Otra posible explicación a 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^[92, 93]. Debido a ello se planteó realizar ensayos de internalización y eliminación bacteriana. 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^[94].

Como era de esperarse, el marcador de activación temprana para linfocitos T y B, CD69^[95-97] se encuentra incrementado en la superficie de estos linfocitos de pacientes con sepsis^[63, 95]. Resulta interesante que, a pesar de tratarse de un marcador de activación temprana, es decir, que se expresa en las primeras 12 horas de activación *in vitro*, lo observamos sobre-expresado en linfocitos de pacientes que tenían 24-48 hrs de haber sido diagnosticados con sepsis. La explicación puede ser el recambio de linfocitos de circulación ya que, como menciona Roger, hay procesos de apoptosis y proliferación que se observan en etapas tempranas de sepsis^[95]. Es factible entonces que los altos niveles de expresión de CD69 lo mantengan linfocitos jóvenes, producto de la mencionada proliferación. Otro punto a considerar es que los linfocitos en un organismo complejo no están “sincronizados”, por lo que pueden existir subpoblaciones de linfocitos que responden a distintos tiempos, como se ha observado para casos de artritis o en modelos con antígenos sintéticos^[98, 99]. Adicionalmente a la expresión de CD69 en linfocitos, encontramos también sobre-expresada a esta molécula en monocitos y granulocitos, hecho que es aún más sorprendente ya que en la búsqueda bibliográfica solo se encontró un par de trabajos que hablan de la presencia y función de CD69 en monocitos y macrófagos^[100, 101], pero sin que hasta el momento existan evidencias sobre la función de esta molécula en estas células, como tampoco se ha descrito al momento su función en linfocitos, más allá de ser un marcador de activación temprana. Queda pendiente aclarar si las células mieloides aumentan la expresión génica, para lo cual se puede evaluar el mRNA de CD69 en monocitos y en granulocitos, o si están adquiriéndolo por otros procesos de transferencia intercelular, como trogocitosis^[102, 103] o endocitosis de linfocitos muertos^[104, 105]. Dichos mecanismos de transferencia hay que descartarlos en el caso de la expresión del marcador CCR7 para poblaciones mieloides, que de acuerdo con los resultados aquí mostrados, está incrementado en los pacientes comparados con sujetos sanos. Este marcador se había utilizado dentro del panel como una molécula “candidata” para la activación de linfocitos T y B, por los antecedentes en donde se encuentran incrementos de CCR7 en linfocitos y células dendríticas de pacientes con alergias^[11], lupus^[106] y cáncer^[107, 108]. En nuestro estudio se observa que

las poblaciones de monocitos y también incrementan los niveles de éste marcador probablemente para favorecer la migración a los nódulos linfáticos cercanos y favorecer la diferenciación de los monocitos a macrófagos o para que los neutrófilos estabilicen la presentación de antígeno como sugieren algunos autores^[9, 10]. Sin embargo, hacen falta experimentos que puedan demostrar dicha hipótesis para células mieloides en humanos. Otro de los marcadores evaluados fue CD107a, molécula asociada a degranulación celular en células NK, dicho marcador lo encontramos elevado en monocitos y neutrófilos, lo cual indicaría incremento en el número de células que han liberado contenido granular lo cual podría repercutir en la capacidad de eliminación bacteriana que presenten dichas células.

Una vez obtenidos los resultados de los inmunofenotipos decidimos realizar diferentes tipos de correlaciones con datos clínicos, estudios de laboratorio y niveles de citocinas séricas, para así indirectamente establecer la importancia biológica de estos marcadores en el proceso séptico. Buscamos correlaciones bivariadas (rho de Spearman) entre varios de estos marcadores y los niveles de citocinas pro y anti-inflamatorias, indicadores séricos de SIRS.

La correlación de los marcadores de superficie con citocinas pro (TNF- α , IL-8, IL-6) y anti-inflamatorias (IL-10) también fue evaluada con estrategias estadísticas utilizando el lenguaje de programación R, específicamente el paquete "igraph" con la función "corrplot" que nos permite realizar correlaciones múltiples y resumirlas en gráficos con elipses, en los que entre más angosta sea la elipse, mayor significancia estadística presenta, de igual forma entre mayor sea la intensidad del color rojo o azul (correlación positiva o negativa respectivamente) mayor será el valor de r cuadrada. Dentro de éstas correlaciones múltiples entre datos clínicos, laboratoriales, marcadores y citocinas destaca, para la población de monocitos la expresión de CD64 con la edad de los pacientes, en donde se muestra que los pacientes a mayor edad presentan menor expresión del receptor CD64 en monocitos, esto apoya la idea de que los pacientes en edad avanzada presentan inmunosenescencia, como consecuencia, mayor riesgo a sobre-infecciones en sepsis y por ende cuadros más severos^[109]. Existen marcadores de agotamiento celular que no se determinaron en el presente estudio, pero que de acuerdo a la literatura se encuentran ampliamente descritos para la población de linfocitos T como

lo son PD-1, PD-L1, CTLA-4, BTLA, TIM-3, LAG-3, 2B4, los cuales se encuentran incrementados en linfocitos T, B, NK y linfocitos innatos durante el cuadro séptico^[110-112]. Sin embargo, al igual que los marcadores CD69 y CCR7 que típicamente no se observan en población mieloide, sería de gran utilidad evaluar si estos marcadores de agotamiento, se encuentran en estas poblaciones de neutrófilos y monocitos, de ser el caso que se expresaran se tendría un mejor inmunofenotipo inhibido.

Otra correlación que destaca en esta matriz es la que muestra menor cantidad de la molécula HLA-DR a mayores niveles de IL-1beta, esto independientemente del cuadro clínico del cual deriva la sepsis.

Para resumir la matriz de correlación y al mismo tiempo evaluar qué variables se encuentran relacionadas entre sí, se decidió realizar un análisis mediante diagramas de redes que se componen de nodos (individuos) y bordes (conexiones). Los nodos que están altamente conectados aparecen más cerca en el gráfico. Los diagramas de red permiten visualizar las relaciones entre un grupo de entidades, describiendo cómo las variables están interconectadas. En dicho diagrama (Figuras 11 y 16 para monocitos y neutrófilos respectivamente) observamos en resumen que los marcadores están estrechamente relacionados entre sí al igual que las citocinas, el significado biológico de dichas observaciones en estos modelos matemáticos implicarían que las interacción celular genera la expresión de marcadores, sin embargo dichos marcadores no pueden predecir los cambios fisiológicos o en valores laboratoriales que ocurren en los pacientes con inflamación sistémica. Solo pueden predecir los cambios en los mismos marcadores de esa estirpe celular, especialmente los marcadores CD107a CD64 y TREM1 que se encuentran al centro del nodo para la población de monocitos. Dentro de los nodos importantes se encuentran el TNF-alfa que está estrechamente relacionado con variables clínicas, como FC, FR, leucocitos, Temperatura, así como con las escalas de severidad como APACHE, SOFA, etc. sugiriendo que los niveles de TNF-alfa influyen importantemente en el cuadro clínico de sepsis; sin embargo, se observa cercano a esos nodos la IL-10, lo que sugiere que es de las citocinas que estarían regulando el proceso séptico^[48, 113]. Para el resto de las citocinas encontramos que el nodo está compuesto por IL-1 β , IL-6, IL-8 e IL-1RA en contra parte a IL-1 β . Ésta última observación concuerda con lo obtenido en las cuantificaciones de citocinas en donde al observar incrementadas

tanto las pro- como las anti-inflamatorias, la entidad MARS, sugeriría que dichas citocinas cumplen un papel de autorregulación.

El mismo tipo de análisis desarrollado con los datos de inmunofenotipo proveniente de la población de neutrófilos nos muestra resultados similares; sólo que en las correlaciones que sobresalen se encuentran CCR7 vs IL-1 β en donde encontramos que a mayores niveles de IL-1 β observamos menores niveles de CCR7 en la superficie de neutrófilos. Este hallazgo va en contra de la línea de pensamiento que sugería que el ambiente inflamatorio induciría mayor expresión de CCR7 en neutrófilos, aunque cabe resaltar que aún falta probar si realmente los neutrófilos pueden expresar marcadores atípicos como lo es éste CCR7 y CD69, y elucidar cual sería la función en esta población, dado a que no son marcadores típicamente expresados en línea mieloide; habría que descartar obtención de los mismos por otro medio, como trogocitosis. Otra correlación que llama la atención es la que muestra que a mayores niveles de TREM1 mayor expresión de CD69 y de CD107a (Figura 14), lo que biológicamente significaría que a mayor activación de los neutrófilos mayor degranulación presente en los neutrófilos circulantes de sangre periférica. Asimismo, observamos que a mayor expresión de CD16 mayores niveles de CD107a, y que esto es independiente del estado del cuadro inflamatorio SIRS, sepsis o choque séptico.

Al hacer el análisis de redes observamos patrones similares al análisis con monocitos, lo cual tiene sentido porque los datos son los mismos excepto que se corrió el análisis con los datos del inmunofenotipo de neutrófilos, observando aquí que el TNF-alfa no es el centro de los nodos de datos clínicos y laboratoriales, observamos que existe estrecha relación entre el marcador CCR7 con estos nodos de datos clínicos, laboratoriales y escalas de severidad. Esto se suma a TNF- α e IL-10 que son citocinas importantes en el cuadro séptico como se ha descrito anteriormente.

De igual forma encontramos estrecha relación entre los marcadores de superficie CD16, CD107a, CD69 y TREM1 (Figura 16), sugiriendo que la activación celular en los neutrófilos, medida por expresión de marcadores CD69 y TREM1, se relaciona con la maduración evaluada por la expresión de CD16, así como con los procesos de degranulación celular medido por la expresión de CD107a.

Lo siguiente que decidimos hacer fue evaluar cómo se encontraban las capacidades

funcionales como endocitosis y fagocitosis, asociadas a los marcadores como CD16 y CD64. Lo primero que se hizo fue evaluar los cambios en granularidad que presentaban las poblaciones de monocitos y neutrófilos, esto mediante citometría de flujo, tomando en cuenta lo observado para el marcador CD107a; tanto para neutrófilos como para monocitos, encontramos disminución en la complejidad relativa (granularidad) en las poblaciones de pacientes respecto a los voluntarios sanos. Esto concuerda con los resultados de la expresión del marcador CD107a sugiriendo que los neutrófilos y en menor medida los monocitos de sangre periférica de los pacientes, se encuentran degranulados. Cabe mencionar que la forma definitiva de demostrar degranulación sería mediante microscopía, en donde se pueda contar la cantidad de gránulos presentes en células de sujetos control y compararlas con células de pacientes.

El resultado anterior de degranulación nos llevó entonces a evaluar la capacidad que tienen estas poblaciones de internalizar y eliminar bacterias. Así que tomando en cuenta que necesitábamos un ensayo que pudiéramos tener siempre a la mano, que presentara poca variabilidad, y que se pudiera leer de inmediato, se decidió trabajar con el kit “pHrodo® Green E. coli BioParticles® Conjugate for Phagocytosis”, ya que, de acuerdo al fabricante del kit, tenemos bacterias fijadas, fácilmente resuspendible y siempre a la misma concentración. Además nos permite mediante fluorescencia, evaluar la internalización bacteriana ya que dicha bacteria en su interior contiene partículas pH Green que fluorescen en verde pero la peculiaridad de dicha partícula es que al cambiar el pH como ocurre en el fagolisosoma, la partícula incrementa dramáticamente su fluorescencia permitiendo así evaluar el proceso completo de fagocitosis. Como se observa en la Figura 18, el porcentaje de internalización bacteriana (células pH Green +) es similar en el grupo control en comparación con los pacientes, con una ligera tendencia a ser mayor en éstos últimos. Pero para la eliminación bacteriana que presenta cada célula, es decir tomando en consideración la cuenta leucocitaria, el porcentaje de internalización y la media de fluorescencia observamos claramente una marcada disminución para el grupo de pacientes respecto al grupo control. Sin embargo, en el artículo nos pidieron demostrar por otra metodología dicho proceso, argumentando que el proceso que veíamos era solo de acidificación del fagolisosoma, por lo cual se realizó el ensayo de conteo de UFC utilizando *E. coli*-GFP (DH-5 α), en 4 pacientes vs 3

voluntarios sanos; obteniendo una marcada diferencia en la capacidad que tienen los sujetos sanos en la eliminación bacteriana sobre como se observa en la Figura 19, la capacidad de replicación bacteriana excede la capacidad de eliminación que tienen las células de sangre periférica de los pacientes. Esto puede explicar en parte el porqué de la neutrofilia y monocitosis observada en los pacientes, pensando que tal vez un aumento en la sobrevivencia de los neutrófilos y aumento en su tasa de liberación de medula ósea, son para compensar las capacidades de eliminación reducida que presentan individualmente dichas células, como se ha sugerido en algunos ensayos^[76, 114]. Cabe mencionar que en nuestros resultados de la expresión de CD64, tanto en neutrófilos como en monocitos, así como la naturaleza y función del receptor sugerían que las células presentarían aumento en el proceso de endo-fagocitosis, así que lo siguiente que hicimos fue evaluar a que nivel se encontraba la falla en la célula. Para ello decidimos evaluar la capacidad que tienen de activar distintas vías de señalización responsables de la proliferación y mantenimiento celular (STAT5 y STAT3), así como vías fundamentales para la producción de citocinas, estallido respiratorio, etcétera, como lo es la vía de p38. De acuerdo a nuestros resultados, tras la estimulación ex-vivo de sangre periférica con LPS observamos tanto que los monocitos como neutrófilos circulantes, activan menos la vía de p38, en los pacientes con sepsis, respecto a los voluntarios sanos (Figura 20). Al evaluar la activación de la vía de STAT3, tras estimular con IL-10, observamos afección solo en la población de monocitos de pacientes sépticos, no así en neutrófilos (Figura 21). Y por último al evaluar la activación de la vía de STAT5 con estimulación por GM-CSF, observamos que tanto pacientes como sujetos activan la vía de manera normal (Figura 22). Las implicaciones de este hallazgo, sugieren que no está ocurriendo una inmuno-parálisis en el sentido estricto de la palabra, como ocurre con estimulaciones repetidas con LPS descrita en modelos animales o como se ha sugerido para pacientes^[47, 83, 115]; sino que las células presentan respuestas selectivas a ciertos estímulos, mismos que cambiarán la respuesta o el destino final de esa célula, favoreciendo en el caso de la vía de STAT 5, el aumento en la sobrevivencia en sangre periférica, la producción de citocinas anti-inflamatorias o factores de crecimiento, o la diferenciación celular, procesos que ayudan a mejorar el cuadro séptico. Cabe mencionar que a pesar de que está ampliamente reportado en la literatura que la expresión de

receptores para LPS, IL-10 o GM-CSF se mantienen o incluso incrementa en sepsis^[67, 69-73], nosotros debemos descartar que nuestras poblaciones evaluadas presentan el receptor del ligando con el que se está estimulando, y si ese fuese el caso entonces si se corroboraría la alteración funcional de dichas vías, entonces lo que seguiría sería evaluar a qué nivel se encuentra la alteración (moléculas adaptadoras, fosfatasa, etc.). Del mismo modo, aunque los monocitos de los pacientes SIRS/sepsis presentan mayor nivel de activación de la vía de p38 previo al estímulo con LPS en comparación con los sujetos control, la disminución de la respuesta ante LPS repercute en su capacidad para la producción de citocinas o factores de crecimiento, o incluso la respuesta ante estrés celular, regulación del ciclo y muerte celular, entre otros^[116-119].

Este estudio es un primer acercamiento exploratorio para la realización de un panel más sencillo y escalable a los laboratorios de diagnóstico clínico, que nos permita apoyar en el diagnóstico y la evaluación del pronóstico de los pacientes con sepsis o con SIRS y con esto ayudar al médico a la toma de decisiones para el tratamiento, también nos permite entender que no siempre existe relación directa entre el aumento de marcadores de activación con las funciones que se encuentran realizando las células; es decir sobre-expresión en marcadores de activación, no significa aumento en la función celular.

Conclusiones

- Los pacientes sépticos presentan granulocitosis y monocitosis.
- CD64, CD16, TREM-1, CD69 y CCR7 se encuentran elevadas en monocitos y granulocitos de pacientes sépticos.
- Los pacientes con SIRS/sepsis presentan disminuidas sus capacidades de eliminación bacteriana.
- Los pacientes con SIRS/sepsis presentan disminución en la activación de las vías de señalización de p38 y STAT3 mientras que activan normalmente la vía de STAT5.
- Se encuentra disociación en los pacientes SIRS/sepsis entre el fenotipo de activación en células mieloides y las capacidades funcionales que presentan.

Perspectivas

- Es deseable incluir en el inmunofenotipo marcadores de agotamiento celular como PD-1, PD-L1, CTLA-4, BTLA, TIM-3, LAG-3 y 2B4, para evaluar tanto población linfoide como población mieloide y así tener un panorama más amplio de lo que sucede con las células del sistema inmune durante esta patología.
- Sería de gran importancia poder hacer ensayos de microscopia de fluorescencia para evaluar degranulación, así como tener el estándar de oro para evaluar internalización y eliminación bacteriana realizando el conteo de bacterias por célula.
- Evaluar la capacidad de estallido respiratorio presente en las poblaciones de neutrófilos y monocitos de pacientes y sujetos control para tener el panorama del proceso fagocítico completo.
- Debería evaluarse y cuantificar los niveles de receptor para LPS (TLR4), IL-10, GM-CSF y otro estímulo utilizado para evaluar la activación de las vías de señalización, lo cual asegura que la falta de activación no se debe a la carencia del receptor.
- Evaluar mediante PCR los transcritos para asegurarse que las células mieloides pueden expresar los marcadores no clásicos como CCR7 o CD69, y de ser el caso probar su posible función.
- Aumentar la población de pacientes reclutados e incrementar las n, para cada ensayo funcional para así poder realizar análisis de biología computacional buscando asociaciones con los marcadores en el inmunofenotipo.

REFERENCIAS

1. Serhan CN, Lu Y, Hong S, Yang R. **Mediator lipidomics: search algorithms for eicosanoids, resolvins, and protectins.** *Methods in enzymology* 2007; 432:275-317.
2. Medzhitov R. **Origin and physiological roles of inflammation.** *Nature* 2008; 454(7203):428-435.
3. Medzhitov R. **Inflammation 2010: new adventures of an old flame.** *Cell* 2010; 140(6):771-776.
4. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. **Pathogen recognition and innate immunity.** *Cell* 2006; 124(4):783-801.
5. Takeuchi O, Akira S. **Pattern recognition receptors and inflammation.** *Cell* 2010; 140(6):805-820.
6. Palsson-McDermott EM, O'Neill LA. **Signal transduction by the lipopolysaccharide receptor, Toll-like receptor-4.** *Immunology* 2004; 113(2):153-162.
7. Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S. **Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated.** *Nature reviews Immunology* 2007; 7(9):678-689.
8. Evans EA, Calderwood DA. **Forces and bond dynamics in cell adhesion.** *Science* 2007; 316(5828):1148-1153.
9. Akuthota P, Ueki S, Estanislau J, Weller PF. **Human Eosinophils Express Functional CCR7.** *American journal of respiratory cell and molecular biology* 2013.
10. Beauvillain C, Cunin P, Doni A, Scotet M, Jaillon S, Loiry ML, et al. **CCR7 is involved in the migration of neutrophils to lymph nodes.** *Blood* 2011; 117(4):1196-1204.
11. Kawakami M, Narumoto O, Matsuo Y, Horiguchi K, Horiguchi S, Yamashita N, et al. **The role of CCR7 in allergic airway inflammation induced by house dust mite exposure.** *Cellular immunology* 2012; 275(1-2):24-32.
12. Curfs JH, Meis JF, Hoogkamp-Korstanje JA. **A primer on cytokines: sources, receptors, effects, and inducers.** *Clinical microbiology reviews* 1997; 10(4):742-780.
13. Pober JS. **Effects of tumour necrosis factor and related cytokines on vascular endothelial cells.** *Ciba Foundation symposium* 1987; 131:170-184.
14. Dinarello CA. **Proinflammatory and anti-inflammatory cytokines as mediators in the pathogenesis of septic shock.** *Chest* 1997; 112(6 Suppl):321S-329S.
15. Dinarello CA. **Keep up the heat on IL-1.** *Blood* 2012; 120(13):2538-2539.
16. Lehtonen A, Matikainen S, Miettinen M, Julkunen I. **Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)-induced STAT5 activation and target-gene expression during human monocyte/macrophage differentiation.** *Journal of leukocyte biology* 2002; 71(3):511-519.
17. Foster SL, Medzhitov R. **Gene-specific control of the TLR-induced inflammatory response.** *Clinical immunology* 2009; 130(1):7-15.
18. Benkhart EM, Siedlar M, Wedel A, Werner T, Ziegler-Heitbrock HW. **Role of Stat3 in lipopolysaccharide-induced IL-10 gene expression.** *Journal of immunology* 2000; 165(3):1612-1617.
19. Nordenfelt P, Tapper H. **Phagosome dynamics during phagocytosis by neutrophils.** *Journal of leukocyte biology* 2011; 90(2):271-284.
20. Allen LA, Aderem A. **Molecular definition of distinct cytoskeletal structures involved in**

- complement- and Fc receptor-mediated phagocytosis in macrophages.** *The Journal of experimental medicine* 1996; 184(2):627-637.
21. Segal AW, Dorling J, Coade S. **Kinetics of fusion of the cytoplasmic granules with phagocytic vacuoles in human polymorphonuclear leukocytes.** *Biochemical and morphological studies.* *The Journal of cell biology* 1980; 85(1):42-59.
22. Vieira OV, Botelho RJ, Grinstein S. **Phagosome maturation: aging gracefully.** *The Biochemical journal* 2002; 366(Pt 3):689-704.
23. Jankowski A, Scott CC, Grinstein S. **Determinants of the phagosomal pH in neutrophils.** *The Journal of biological chemistry* 2002; 277(8):6059-6066.
24. Tapper H, Furuya W, Grinstein S. **Localized exocytosis of primary (lysosomal) granules during phagocytosis: role of Ca²⁺-dependent tyrosine phosphorylation and microtubules.** *Journal of immunology* 2002; 168(10):5287-5296.
25. Zimmerli S, Majeed M, Gustavsson M, Stendahl O, Sanan DA, Ernst JD. **Phagosome-lysosome fusion is a calcium-independent event in macrophages.** *The Journal of cell biology* 1996; 132(1-2):49-61.
26. Sheppard FR, Kelher MR, Moore EE, McLaughlin NJ, Banerjee A, Silliman CC. **Structural organization of the neutrophil NADPH oxidase: phosphorylation and translocation during priming and activation.** *Journal of leukocyte biology* 2005; 78(5):1025-1042.
27. Medzhitov R. **Recognition of microorganisms and activation of the immune response.** *Nature* 2007; 449(7164):819-826.
28. Cavaillon JM, Annane D. **Compartmentalization of the inflammatory response in sepsis and SIRS.** *Journal of endotoxin research* 2006; 12(3):151-170.
29. Gilroy DW, Lawrence T, Perretti M, Rossi AG. **Inflammatory resolution: new opportunities for drug discovery.** *Nature reviews Drug discovery* 2004; 3(5):401-416.
30. Levy MM, Dellinger RP, Townsend SR, Linde-Zwirble WT, Marshall JC, Bion J, et al. **The Surviving Sepsis Campaign: results of an international guideline-based performance improvement program targeting severe sepsis.** *Intensive care medicine* 2010; 36(2):222-231.
31. Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, et al. **2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference.** *Critical care medicine* 2003; 31(4):1250-1256.
32. Gustot T. **Multiple organ failure in sepsis: prognosis and role of systemic inflammatory response.** *Current opinion in critical care* 2011; 17(2):153-159.
33. Brunn GJ, Wijdicks MF, Platt JL. **Toward a modern concept of sepsis: new answers to ancient questions.** *Discovery medicine* 2006; 6(31):11-17.
34. Riedemann NC, Guo RF, Ward PA. **The enigma of sepsis.** *The Journal of clinical investigation* 2003; 112(4):460-467.
35. Vincent JL, Abraham E. **The last 100 years of sepsis.** *American journal of respiratory and critical care medicine* 2006; 173(3):256-263.
36. Slade E, Tamber PS, Vincent JL. **The Surviving Sepsis Campaign: raising awareness to reduce mortality.** *Critical care* 2003; 7(1):1-2.
37. Blanco J, Muriel-Bombin A, Sagredo V, Taboada F, Gandia F, Tamayo L, et al. **Incidence, organ dysfunction and mortality in severe sepsis: a Spanish multicentre study.** *Critical care* 2008; 12(6):R158.
38. Dellinger RP, Levy MM, Carlet JM, Bion J, Parker MM, Jaeschke R, et al. **Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2008.** *Critical care medicine* 2008; 36(1):296-327.

39. Ponce de Leon-Rosales SP, Molinar-Ramos F, Dominguez-Cherit G, Rangel-Frausto MS, Vazquez-Ramos VG. **Prevalence of infections in intensive care units in Mexico: a multicenter study.** *Critical care medicine* 2000; 28(5):1316-1321.
40. Medina-Franco H, Ramos-de la Medina A, Torres-Villalobos G, de Leon HT. **[Mortality-associated factors in major surgery: retrospective analysis in a referral center].** *Revista de investigacion clinica; organo del Hospital de Enfermedades de la Nutricion* 2006; 58(1):9-14.
41. Gursel G, Demirtas S. **Value of APACHE II, SOFA and CPIS scores in predicting prognosis in patients with ventilator-associated pneumonia.** *Respiration; international review of thoracic diseases* 2006; 73(4):503-508.
42. Papachristou GI, Muddana V, Yadav D, O'Connell M, Sanders MK, Slivka A, et al. **Comparison of BISAP, Ranson's, APACHE-II, and CTSI scores in predicting organ failure, complications, and mortality in acute pancreatitis.** *The American journal of gastroenterology* 2010; 105(2):435-441; quiz 442.
43. Minne L, Abu-Hanna A, de Jonge E. **Evaluation of SOFA-based models for predicting mortality in the ICU: A systematic review.** *Critical care* 2008; 12(6):R161.
44. Adib-Conquy M, Cavaillon JM. **Compensatory anti-inflammatory response syndrome.** *Thrombosis and haemostasis* 2009; 101(1):36-47.
45. Castoldi A, Braga TT, Correa-Costa M, Aguiar CF, Bassi EJ, Correa-Silva R, et al. **TLR2, TLR4 and the MYD88 signaling pathway are crucial for neutrophil migration in acute kidney injury induced by sepsis.** *PloS one* 2012; 7(5):e37584.
46. Holzheimer RG, Capel P, Cavaillon JM, Cainzos M, Frileux P, Haupt W, et al. **Immunological surrogate parameters in a prognostic model for multi-organ failure and death.** *European journal of medical research* 2000; 5(7):283-294.
47. Ward NS, Casserly B, Ayala A. **The compensatory anti-inflammatory response syndrome (CARS) in critically ill patients.** *Clinics in chest medicine* 2008; 29(4):617-625, viii.
48. Gogos CA, Drosou E, Bassaris HP, Skoutelis A. **Pro- versus anti-inflammatory cytokine profile in patients with severe sepsis: a marker for prognosis and future therapeutic options.** *The Journal of infectious diseases* 2000; 181(1):176-180.
49. Serhan CN, Chiang N, Van Dyke TE. **Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators.** *Nature reviews Immunology* 2008; 8(5):349-361.
50. Hoesel LM, Ward PA. **Mechanisms of inflammatory response syndrome in sepsis.** *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms* 2004; 1(3):345-350.
51. Iskander KN, Osuchowski MF, Stearns-Kurosawa DJ, Kurosawa S, Stepien D, Valentine C, et al. **Sepsis: multiple abnormalities, heterogeneous responses, and evolving understanding.** *Physiological reviews* 2013; 93(3):1247-1288.
52. Rittirsch D, Flierl MA, Day DE, Nadeau BA, Zetoune FS, Sarma JV, et al. **Cross-talk between TLR4 and FcγR3 (CD16) pathways.** *PLoS pathogens* 2009; 5(6):e1000464.
53. Friedman G, Jankowski S, Marchant A, Goldman M, Kahn RJ, Vincent JL. **Blood interleukin 10 levels parallel the severity of septic shock.** *Journal of critical care* 1997; 12(4):183-187.
54. Klosterhalfen B, Bhardwaj RS. **Septic shock.** *General pharmacology* 1998; 31(1):25-32.
55. Wang TS, Deng JC. **Molecular and cellular aspects of sepsis-induced immunosuppression.** *Journal of molecular medicine* 2008; 86(5):495-506.
56. Hotson AN, Hardy JW, Hale MB, Contag CH, Nolan GP. **The T cell STAT signaling network is reprogrammed within hours of bacteremia via secondary signals.** *Journal of immunology* 2009; 182(12):7558-7568.
57. Streimish I, Bizzarro M, Northrup V, Wang C, Renna S, Koval N, et al. **Neutrophil CD64 as**

- a diagnostic marker in neonatal sepsis.** *The Pediatric infectious disease journal* 2012; 31(7):777-781.
58. Bouchon A, Facchetti F, Weigand MA, Colonna M. **TREM-1 amplifies inflammation and is a crucial mediator of septic shock.** *Nature* 2001; 410(6832):1103-1107.
59. Colonna M, Facchetti F. **TREM-1 (triggering receptor expressed on myeloid cells): a new player in acute inflammatory responses.** *The Journal of infectious diseases* 2003; 187 Suppl 2:S397-401.
60. Ferat-Osorio E, Wong-Baeza I, Esquivel-Callejas N, Figueroa-Figueroa S, Duarte-Rojo A, Guzman-Valdivia-Gomez G, et al. **Triggering receptor expressed on myeloid cells-1 expression on monocytes is associated with inflammation but not with infection in acute pancreatitis.** *Critical care* 2009; 13(3):R69.
61. Ornatowska M, Azim AC, Wang X, Christman JW, Xiao L, Joo M, et al. **Functional genomics of silencing TREM-1 on TLR4 signaling in macrophages.** *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* 2007; 293(6):L1377-1384.
62. Gonzalez-Roldan N, Ferat-Osorio E, Aduna-Vicente R, Wong-Baeza I, Esquivel-Callejas N, Astudillo-de la Vega H, et al. **Expression of triggering receptor on myeloid cell 1 and histocompatibility complex molecules in sepsis and major abdominal surgery.** *World journal of gastroenterology : WJG* 2005; 11(47):7473-7479.
63. Schwulst SJ, Muenzer JT, Chang KC, Brahmhatt TS, Coopersmith CM, Hotchkiss RS. **Lymphocyte phenotyping to distinguish septic from nonseptic critical illness.** *Journal of the American College of Surgeons* 2008; 206(2):335-342.
64. Flores Mejía LA. **Caracterización inmunofenotípica de leucocitos circulantes en SIRS/sepsis.** Instituto Politécnico Nacional 2013.
65. Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, et al. **The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3).** *JAMA* 2016; 315(8):801-810.
66. Flores Mejía LA. **Caracterización inmunofenotípica de leucocitos circulantes en SIRS/sepsis.** Instituto Politécnico Nacional 2013.
67. Brunialti MK, Martins PS, Barbosa de Carvalho H, Machado FR, Barbosa LM, Salomao R. **TLR2, TLR4, CD14, CD11B, and CD11C expressions on monocytes surface and cytokine production in patients with sepsis, severe sepsis, and septic shock.** *Shock* 2006; 25(4):351-357.
68. Ehrentraut SF, Dorr A, Ehrentraut H, Lohner R, Lee SH, Hoeft A, et al. **Vascular dysfunction following polymicrobial sepsis: role of pattern recognition receptors.** *PloS one* 2012; 7(9):e44531.
69. Tamassia N, Calzetti F, Menestrina N, Rossato M, Bazzoni F, Gattin L, et al. **Circulating neutrophils of septic patients constitutively express IL-10R1 and are promptly responsive to IL-10.** *Int Immunol* 2008; 20(4):535-541.
70. Ocun LM, Bamboat ZM, Balachandran VP, Cavnar MJ, Obaid H, Plitas G, et al. **Neutrophil IL-10 suppresses peritoneal inflammatory monocytes during polymicrobial sepsis.** *Journal of leukocyte biology* 2011; 89(3):423-432.
71. Pangault C, Le Tulzo Y, Tattevin P, Guilloux V, Bescher N, Drenou B. **Down-modulation of granulocyte macrophage-colony stimulating factor receptor on monocytes during human septic shock.** *Critical care medicine* 2006; 34(4):1193-1201.
72. Chousterman BG, Arnaud M. **Is There a Role for Hematopoietic Growth Factors During Sepsis?** *Front Immunol* 2018; 9:1015.
73. Frydrych LM, Bian G, Fattahi F, Morris SB, O'Rourke RW, Lumeng CN, et al. **GM-CSF**

Administration Improves Defects in Innate Immunity and Sepsis Survival in Obese Diabetic Mice. *Journal of immunology* 2019; 202(3):931-942.

74. Pinder EM, Rostron AJ, Hellyer TP, Ruchaud-Sparagano MH, Scott J, Macfarlane JG, et al. **Randomised controlled trial of GM-CSF in critically ill patients with impaired neutrophil phagocytosis.** *Thorax* 2018; 73(10):918-925.

75. Clec'h C, Ferriere F, Karoubi P, Fosse JP, Cupa M, Hoang P, et al. **Diagnostic and prognostic value of procalcitonin in patients with septic shock.** *Critical care medicine* 2004; 32(5):1166-1169.

76. Danikas DD, Karakantza M, Theodorou GL, Sakellaropoulos GC, Gogos CA. **Prognostic value of phagocytic activity of neutrophils and monocytes in sepsis. Correlation to CD64 and CD14 antigen expression.** *Clin Exp Immunol* 2008; 154(1):87-97.

77. Gibot S, Cravoisy A. **Soluble form of the triggering receptor expressed on myeloid cells-1 as a marker of microbial infection.** *Clinical medicine & research* 2004; 2(3):181-187.

78. Lvovschi V, Arnaud L, Parizot C, Freund Y, Juillien G, Ghillani-Dalbin P, et al. **Cytokine profiles in sepsis have limited relevance for stratifying patients in the emergency department: a prospective observational study.** *PloS one* 2011; 6(12):e28870.

79. Mokart D, Merlin M, Sannini A, Brun JP, Delpero JR, Houvenaeghel G, et al. **Procalcitonin, interleukin 6 and systemic inflammatory response syndrome (SIRS): early markers of postoperative sepsis after major surgery.** *British journal of anaesthesia* 2005; 94(6):767-773.

80. Munoz C, Carlet J, Fitting C, Misset B, Bleriot JP, Cavaillon JM. **Dysregulation of in vitro cytokine production by monocytes during sepsis.** *The Journal of clinical investigation* 1991; 88(5):1747-1754.

81. Inoue S, Sato T, Suzuki-Utsunomiya K, Komori Y, Hozumi K, Chiba T, et al. **Sepsis-induced hypercytokinemia and lymphocyte apoptosis in aging-accelerated Klotho knockout mice.** *Shock* 2013; 39(3):311-316.

82. Novotny AR, Reim D, Assfalg V, Altmayr F, Friess HM, Emmanuel K, et al. **Mixed antagonist response and sepsis severity-dependent dysbalance of pro- and anti-inflammatory responses at the onset of postoperative sepsis.** *Immunobiology* 2012; 217(6):616-621.

83. Ostanin AA, Leplina OY, Shevela CY, Kozhevnikov VS, Chernykh HR. **Inflammatory Syndromes (SIRS, MARS, CARS) in Patients with Surgical Infection.** *Russ J Immunol* 2000; 5(3):289-300.

84. Santagostino A, Garbaccio G, Pistorio A, Bolis V, Camisasca G, Pagliaro P, 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* 1999; 84(6):499-504.

85. Tsang CW, Lazarus R, Smith W, Mitchell P, Koutts J, Burnett L. **Hematological indices in an older population sample: derivation of healthy reference values.** *Clinical chemistry* 1998; 44(1):96-101.

86. Paunel-Gorgulu A, Flohe S, Scholz M, Windolf J, Logters T. **Increased serum soluble Fas after major trauma is associated with delayed neutrophil apoptosis and development of sepsis.** *Critical care* 2011; 15(1):R20.

87. Rodriguez S, Chora A, Goumnerov B, Mumaw C, Goebel WS, Fernandez L, et al. **Dysfunctional expansion of hematopoietic stem cells and block of myeloid differentiation in lethal sepsis.** *Blood* 2009; 114(19):4064-4076.

88. Flores Mejía LA. **“Caracterización inmunofenotípica de leucocitos circulantes en SIRS/sepsis”:** ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS, IPN; 2013.

89. Bhandari V, Wang C, Rinder C, Rinder H. **Hematologic profile of sepsis in neonates:**

- neutrophil CD64 as a diagnostic marker.** *Pediatrics* 2008; 121(1):129-134.
90. Davis BH, Olsen SH, Ahmad E, Bigelow NC. **Neutrophil CD64 is an improved indicator of infection or sepsis in emergency department patients.** *Archives of pathology & laboratory medicine* 2006; 130(5):654-661.
91. Groselj-Grenc M, Ihan A, Derganc M. **Neutrophil and monocyte CD64 and CD163 expression in critically ill neonates and children with sepsis: comparison of fluorescence intensities and calculated indexes.** *Mediators of inflammation* 2008; 2008:202646.
92. Pasquier B, Launay P, Kanamaru Y, Moura IC, Pfirsch S, Ruffie C, et al. **Identification of FcalphaRI as an inhibitory receptor that controls inflammation: dual role of FcRgamma ITAM.** *Immunity* 2005; 22(1):31-42.
93. Watanabe T, Kanamaru Y, Liu C, Suzuki Y, Tada N, Okumura K, et al. **Negative regulation of inflammatory responses by immunoglobulin A receptor (FcalphaRI) inhibits the development of Toll-like receptor-9 signalling-accelerated glomerulonephritis.** *Clin Exp Immunol* 2011; 166(2):235-250.
94. Belge KU, Dayyani F, Horelt A, Siedlar M, Frankenberger M, Frankenberger B, et al. **The proinflammatory CD14+CD16+DR++ monocytes are a major source of TNF.** *Journal of immunology* 2002; 168(7):3536-3542.
95. Roger PM, Hyvernats H, Ticchioni M, Kumar G, Dellamonica J, Bernardin G. **The early phase of human sepsis is characterized by a combination of apoptosis and proliferation of T cells.** *Journal of critical care* 2012; 27(4):384-393.
96. Ziegler SF, Ramsdell F, Alderson MR. **The activation antigen CD69.** *Stem Cells* 1994; 12(5):456-465.
97. Vazquez BN, Laguna T, Carabana J, Krangel MS, Lauzurica P. **CD69 gene is differentially regulated in T and B cells by evolutionarily conserved promoter-distal elements.** *Journal of immunology* 2009; 183(10):6513-6521.
98. Fukushima A, Shiloach J, Whitcup SM, Nussenblatt RB, Gery I. **Human lymphocyte responses against epitopes of a self antigen: a follow-up at different time points.** *Cellular immunology* 1996; 167(1):150-153.
99. Gupta D, Singh VK, Rajasingh J, Shinohara T, Misra R, Agarwal SS. **Cellular immune responses of patients with juvenile chronic arthritis to retinal antigens and their synthetic peptides.** *Immunologic research* 1996; 15(1):74-83.
100. De Maria R, Cifone MG, Trotta R, Rippo MR, Festuccia C, Santoni A, et al. **Triggering of human monocyte activation through CD69, a member of the natural killer cell gene complex family of signal transducing receptors.** *The Journal of experimental medicine* 1994; 180(5):1999-2004.
101. Marzio R, Jirillo E, Ransijn A, Mauel J, Corradin SB. **Expression and function of the early activation antigen CD69 in murine macrophages.** *Journal of leukocyte biology* 1997; 62(3):349-355.
102. Alegre E, Howangyin KY, Favier B, Baudhuin J, Lesport E, Daouya M, et al. **Membrane redistributions through multi-intercellular exchanges and serial trogocytosis.** *Cell research* 2010; 20(11):1239-1251.
103. Gary R, Voelkl S, Palmisano R, Ullrich E, Bosch JJ, Mackensen A. **Antigen-specific transfer of functional programmed death ligand 1 from human APCs onto CD8+ T cells via trogocytosis.** *Journal of immunology* 2012; 188(2):744-752.
104. Tsuruyama T, Okamoto S, Fujimoto Y, Yoshizawa A, Yoshitoshi E, Egawa H, et al. **Histology of intestinal allografts: lymphocyte apoptosis and phagocytosis of lymphocytic**

- apoptotic bodies are diagnostic findings of acute rejection in addition to crypt apoptosis.** *The American journal of surgical pathology* 2013; 37(2):178-184.
105. Krysko DV, Denecker G, Festjens N, Gabriels S, Parthoens E, D'Herde K, et al. **Macrophages use different internalization mechanisms to clear apoptotic and necrotic cells.** *Cell death and differentiation* 2006; 13(12):2011-2022.
106. Gerl V, Lischka A, Panne D, Grossmann P, Berthold R, Hoyer BF, et al. **Blood dendritic cells in systemic lupus erythematosus exhibit altered activation state and chemokine receptor function.** *Annals of the rheumatic diseases* 2010; 69(7):1370-1377.
107. Correale P, Rotundo MS, Botta C, Del Vecchio MT, Tassone P, Tagliaferri P. **Tumor infiltration by chemokine receptor 7 (CCR7)(+) T-lymphocytes is a favorable prognostic factor in metastatic colorectal cancer.** *Oncoimmunology* 2012; 1(4):531-532.
108. Zhang Q, Sun L, Yin L, Ming J, Zhang S, Luo W, et al. **CCL19/CCR7 upregulates heparanase via specificity protein-1 (Sp1) to promote invasion of cell in lung cancer.** *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* 2013.
109. Lopes AB, Lopes LB, da Silveira Antunes RN, Fukasawa JT, de ACD, Calamita Z. **Effects of Immunosenescence on the Lower Expression of Surface Molecules in Neutrophils and Lymphocytes.** *Curr Aging Sci* 2018; 11(2):118-125.
110. Inoue S, Bo L, Bian J, Unsinger J, Chang K, Hotchkiss RS. **Dose-dependent effect of anti-CTLA-4 on survival in sepsis.** *Shock* 2011; 36(1):38-44.
111. Patil NK, Guo Y, Luan L, Sherwood ER. **Targeting Immune Cell Checkpoints during Sepsis.** *Int J Mol Sci* 2017; 18(11).
112. Inoue S, Suzuki K, Komori Y, Morishita Y, Suzuki-Utsunomiya K, Hozumi K, et al. **Persistent inflammation and T cell exhaustion in severe sepsis in the elderly.** *Critical care* 2014; 18(3):R130.
113. Sousa A, Raposo F, Fonseca S, Valente L, Duarte F, Goncalves M, et al. **Measurement of cytokines and adhesion molecules in the first 72 hours after severe trauma: association with severity and outcome.** *Dis Markers* 2015; 2015:747036.
114. 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* 2013; 41(3):820-832.
115. Osuchowski MF, Welch K, Siddiqui J, Remick DG. **Circulating cytokine/inhibitor profiles reshape the understanding of the SIRS/CARS continuum in sepsis and predict mortality.** *Journal of immunology* 2006; 177(3):1967-1974.
116. Ono K, Han J. **The p38 signal transduction pathway: activation and function.** *Cellular signalling* 2000; 12(1):1-13.
117. Nebreda AR, Porras A. **p38 MAP kinases: beyond the stress response.** *Trends in biochemical sciences* 2000; 25(6):257-260.
118. Kyriakis JM, Avruch J. **Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation.** *Physiological reviews* 2001; 81(2):807-869.
119. Coulthard LR, White DE, Jones DL, McDermott MF, Burchill SA. **p38(MAPK): stress responses from molecular mechanisms to therapeutics.** *Trends in molecular medicine* 2009; 15(8):369-379.

ANEXOS

Anexo I: **Carta de consentimiento informado.**



INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
SEGURIDAD Y SOLIDARIDAD SOCIAL

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 mi 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 mi 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 mi 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 mi permanencia en el mismo.

_____	<u>Dra. Lourdes Andrea Arriaga Pizano</u>
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)

ANEXOII: Hoja de recolección de datos clínicos

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

Nombre						
Filiación		Sexo	M	F	Edad	
Hospital de Procedencia				Clave (iniciales)		

Datos generales a su ingreso

Fecha de Diagnóstico de SIRS/sepsis		Tiempo de evolución SIRS/sepsis		Fecha ingreso HE	
-------------------------------------	--	---------------------------------	--	------------------	--

Antecedentes Personales No Patológicos

1 Tabaquismo	Si	No	2 Drogadicción		Si	No
3 Alcoholismo	Si	No	4 Otros		Si	No

Antecedentes Personales Patológicos

1 Diabetes		2 Hipertensión	
3 Cáncer		4 Cardiopatía isquémica	
5 Lupus Eritematoso		6 Alergias	
7 Artritis reumatoide		8 Otros (especificar)	

Padecimiento Actual (Diagnósticos)

FECHA	Diagnósticos asociados	SIRS	SEPSIS	Hemocultivo Positivo/Negativo	Fecha del Hemocultivo	Comentario

Sepsis (Infección + dos o más de los siguientes criterios: FC > 90 x', FR > 20 x' o PaCO2 < 32, Temp < 36°C ó > 38°C, Leucos < 4000 ó > 12 000 ó > 10 bandas)

Datos clínicos

Temperatura corporal				
----------------------	--	--	--	--

Frecuencia Cardíaca				
Frecuencia Respiratoria				
Tensión arterial				
Oxemia (PaO ²)				
Escala de Glasgow				
SOFA				
APACHE				

Tratamiento

Tratamiento	Si	No	Tipo	Fecha inicio	Fecha finalización	Motivo
Corticosteroides						
Antibióticos						
Tranfusiones						

Evolución Final

Fecha de Egreso	Curación Total		Si	No
Defunción	Si	No	Fecha de defunción	

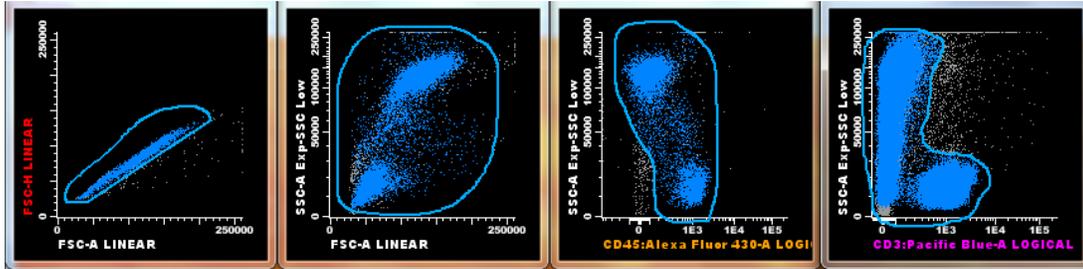
Laboratorio

Día post-diagnóstico SIRS/sepsis	0	1	2	3	4	5	6
FECHA							
pH sanguíneo							
Oxemia (PaO ²)							
Hb							
Hto							
Leucocitos							
% PMN							
%Linfocitos							
% Bandas							
% Monocitos							
Plaquetas							
Glucosa							
Urea							
Creatinina							
ALT							
AST							
Bil Total							
Bil Directa							
Bil Indirecta							

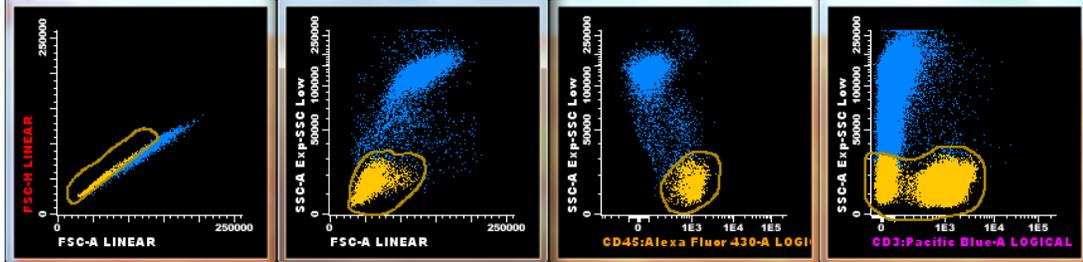
Fos Alcalina							
Albúmina							
Prot Totales							
DHL							
GGTP							
Proteína C Reactiva							

ANEXOIII: Estrategia de análisis identificación de leucocitos

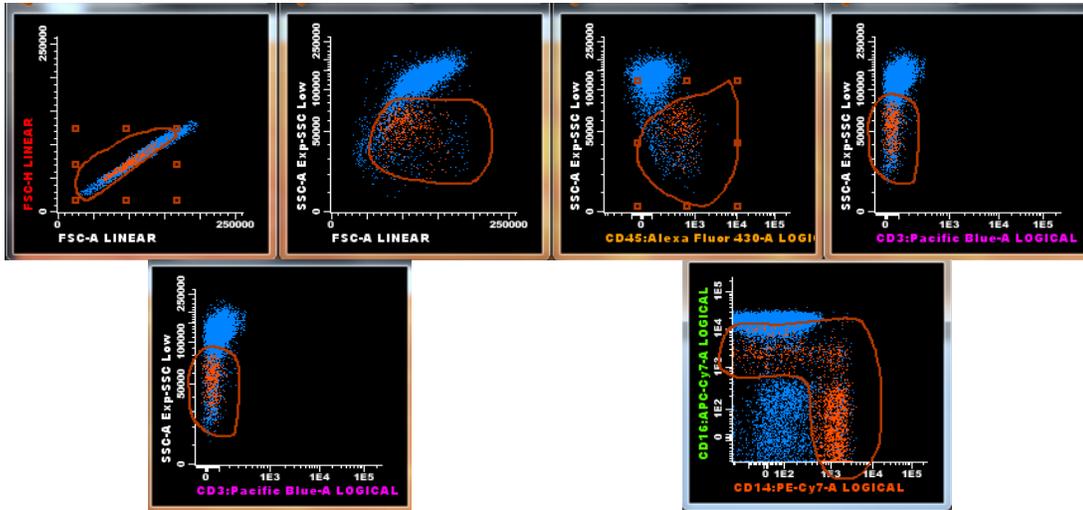
Identificación de leucocitos



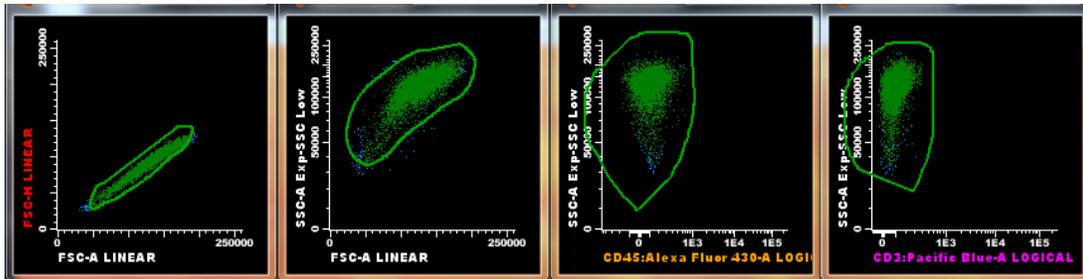
Identificación de linfocitos



Identificación de Monocitos



Identificación de Neutrófilos



Algoritmo de identificación para inmunofenotipificación de leucocitos de sangre periférica.

ANEXOIV: Estrategia de análisis para evaluar activación de fosfoproteínas

