



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

**INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
DELEGACIÓN SUR DEL DISTRITO FEDERAL
UMAE HOSPITAL DE ESPECIALIDADES CMN SIGLO XXI
“DR. BERNARDO SEPULVEDA”**

**EFFECTO DE LAS CITOCINAS IL-10, IL-6 Y TNF ALFA EN SUERO DE PACIENTES
CON INFLAMACION SISTEMICA POR COVID-19 Y SU RELACION CON LA
EVOLUCION DE LA ENFERMEDAD**

PARA OBTENER EL DIPLOMA EN LA ESPECIALIDAD DE MEDICINA INTERNA

**PRESENTA:
DR. JORGE ALBERTO CARMONA MEZA**

**TUTOR PRINCIPAL:
DR. EN C. EDUARDO FERAT OSORIO**

**CO-TUTOR:
DR. JUAN CARLOS ANDA GARAY**



CIUDAD DE MEXICO

AGOSTO 2021



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



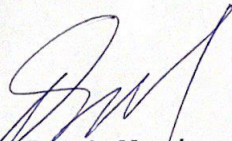
UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

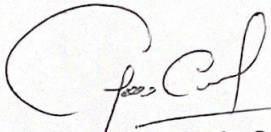
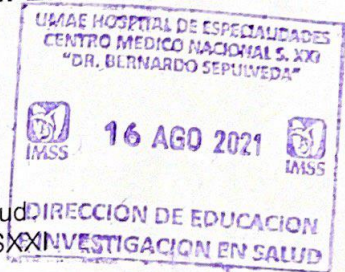
Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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

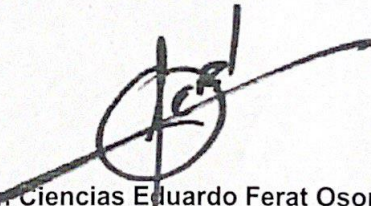
**EFFECTO DE LAS CITOCINAS IL-10, IL-6 Y TNF ALFA EN SUERO
DE PACIENTES CON INFLAMACION SISTEMICA POR COVID-19 Y
SU RELACION CON LA EVOLUCION DE LA ENFERMEDAD**



Dra. Victoria Mendoza Zubieta
Jefe de la División de Educación en Salud
UMAE Hospital de Especialidades CMN SXXI



Dr. Juan Carlos Anda Garay
Profesor titular del curso
Médico adscrito al servicio de Medicina Interna
UMAE Hospital de Especialidades CMN SXXI



Dr. en Ciencias Eduardo Ferat Osorio
Tutor principal
Investigador titular A
Unidad de Investigación Médica en Inmunoquímica
UMAE Hospital de Especialidades CMN SXXI



Dr. Juan Carlos Anda Garay
Co-Tutor
Médico adscrito al servicio de Medicina Interna
UMAE Hospital de Especialidades CMN SXXI

AGRADECIMIENTOS:

Agradezco a Dios por haberme permitido llegar a este punto en compañía de mi familia quienes han creído en mi siempre, dándome ejemplo de superación, humildad y sacrificio; enseñándome a valorar todo lo que tengo.

Agradezco a mis padres que me han brindado su apoyo incondicional en todo momento y me han impulsado a superarme en cada paso por este camino difícil y arduo de la vida. Gracias por ser como son, y ayudarme a construir y forjar la persona que soy ahora.

A mis maestros y amigos que en el andar por la vida nos hemos encontrado, porque cada uno de ustedes ha motivado mis sueños y esperanzas en consolidar un mundo mas humano y con justicia. Gracias a todos los que han recorrido conmigo este camino, porque me han enseñado a ser mas humano.

Datos de Alumno:	
Apellido paterno:	Carmona
Apellido Materno:	Meza
Nombre:	Jorge Alberto
Teléfono:	7442080373
Universidad:	Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad:	Medicina
Carrera:	Medicina Interna
Número de cuenta:	518232670
Datos de Tutor:	
Apellido paterno:	Ferat
Apellido materno:	Osorio
Nombre(s):	Eduardo
Teléfono:	Tel. 56276900 ext. 21476
Correo:	eduardoferat@me.com
Adscripción:	División de Investigación en Salud, Unidad de Investigación Médica en Inmunoquímica y Servicio de Gastrocirugía Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI. IMSS.
Tesis:	
Título:	Efecto de las citocinas IL-10, IL-6 y TNF alfa en suero de pacientes con inflamación sistémica por COVID-19 y su relación con la evolución de la enfermedad
Número de páginas:	41
Año:	2021
Numero de registro:	F-2021-3601-152

RESUMEN

La COVID-19 enfermedad causada por el nuevo agente etiológico el virus SARS-CoV-2, comenzó a propagarse desde la ciudad de Wuhan y se ha extendido de forma acelerada por todo el mundo, llevando consigo una alta tasa de mortalidad. La infección por SARS-CoV-2 da como resultado un amplio espectro de manifestaciones clínicas y el desarrollo de una forma grave de COVID-19 depende de múltiples factores, como la composición genética del huésped, el envejecimiento y la preexistencia de comorbilidades. Recientemente se observó que los pacientes con COVID-19 grave, ingresados en unidad de cuidados intensivos, presentaron niveles séricos mas altos de IL1b, IL2, IL6, IL7, IL8, IL10, Factor estimulante colonias de granulocitos (FEC-G), proteína inflamatoria de macrófagos 1a (PIM-1a) y factor de necrosis tumoral (TNF).

Además, los pacientes con enfermedad grave mostraron un porcentaje significativamente mayor de monocitos inflamatorios en sangre periférica y liquido de lavado broncoalveolar comparado con los pacientes con enfermedad leve, por lo que se presumió que las lesiones pulmonares observadas en pacientes con COVID-19 son debidas a hipercitocinemia. Los principales contribuyentes a la interacción de la hipercitocinemia son IL-6 y TNF- α . Su reconocimiento temprano y el tratamiento oportuno busca disminuir la morbi-mortalidad asociadas con COVID-19, por lo que se han propuesto varios agentes biológicos dirigidos a citocinas como parte del arsenal terapéutico.

Por lo anterior se planteó como objetivo cuantificar la concentración de citocinas IL-6, IL-10 y TNF-alfa en el suero de pacientes graves con COVID-19 al inicio y a los 7 días después del ingreso hospitalario. Se incluyeron pacientes con sintomatología de COVID-19 que acudieron a la UMAE Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS, en donde fueron evaluados por los médicos encargados de Admisión Continua de Urgencias y se realizaron RT-PCR para realizar diagnóstico molecular. Se evaluó la cantidad de citocinas IL-6, IL-10 Y TNF-alfa mediante citometría de flujo y se reclutaron personas sin enfermedad para contar con un grupo control de personas sanas. De cada paciente se registraron la evolución clínica incluyendo la asociación entre los niveles séricos de dichas citocinas con el número de días de estancia hospitalaria, alta médica por mejoría y desenlace fatal.

ÍNDICE

Abreviaturas	8
Antecedentes.....	9
Planteamiento del problema.....	11
Pregunta de Investigación.....	11
Hipótesis	12
Objetivos	12
Metodología	13
Diseño del Estudio.....	13
Universo de trabajo.....	13
Criterios de inclusión	13
Criterios de no inclusión	13
Criterios de eliminación	14
Tamaño de muestra	14
Variables	14
Variables dependientes	14
Variables Independientes	15
Definición operacional de las variables	16
Procedimiento General.....	20
Resultados.....	29
Discusión	34
Conclusión.....	36
Referencias	37
Anexo	38

ABREVIATURAS

APB	Periferal blood Adult (Sangre Periférica de Adulto)
CCL	Chemokine (C-C motif) (Quimiocina con dos residuos de cisteína adyacentes)
CCR	Chemokine (C-C motif) receptor (Receptor de quimiocina con dos residuos de cisteína adyacentes)
CD	Cluster of Differentiation (Marcador de diferenciación)
CXCL	Chemokine (C-X-C motif) ligand (Quimiocina con dos residuos de cisteína separados por un aminoácido diferente)
CXCR	Chemokine (C-X-C motif) receptor (Receptor de quimiocina con dos residuos de cisteína separados por un aminoácido diferente)
dsRNA	(Double-strandes RNA, RNA de doble cadena)
DNA	Deoxyribonucleic acid (Ácido desoxirribonucleico)
FC	Frecuencia cardíaca
GM-CSF	Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor (Factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos)
HLA	Human Leucocyte Antigen (Antígeno leucocitario humano)
ID2	DNA-binding Protein Inhibidor 2 (Factor de transcripción, inhibidor de proteína de unión a ADN 2)
IL	Interleucina
IRF3	INF regulatory factor 3
ISGs	IFN-stimulated genes
MDA5	Melanoma differentiation antigen 5
NF- κB	Nuclear Factor Kappa-Light-Chain-Enhancer of activated B cells (Factor nuclear potenciador de las cadenas kappa de las células B activadas)
NK	Natural Killer (Asesinas naturales)
PAMP	Pathogen Associated Molecular Pattern (Patrón Molecular Asociado a Patógenos)
PCT	Procalcitonina
PRR	Pattern Recognition Receptor (Receptor de Reconocimiento de Patrón)
PBS	Phosphate Buffer Solution (Solución amortiguadora de fosfatos)
PCR	Polymerase Chain Reaction (Reacción en cadena de la polimerasa)
PerCp	Peridinin Chlorophyll Protein (Fluorocromo Proteína Clorofila Peridinina)
rpm	Revoluciones por minuto
SARS	Severe Acute Respiratory Syndrome (Síndrome Agudo Respiratorio Severo)
STAT1	Signal transducers and transcription factors 1
TGFβ	Transforming Growth Factor beta (Factor de crecimiento transformante tipo beta)
TNFα	Tumor Necrosis Factor alpha (Factor de necrosis tumoral alpha)

ANTECEDENTES

La COVID-19, que es causada por una infección del nuevo coronavirus (SARS-CoV-2), comenzó a propagarse desde la ciudad de Wuhan, provincia de Hubei en China en noviembre de 2019 y se extendió de forma acelerada por todo el mundo en un corto período de tiempo. Siendo hasta el 11 de marzo de 2020 declarado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) que oficialmente se trataba de una pandemia. Aunque existe controversia sobre el origen de este virus, se cree que el SARS-CoV-2 se transmite de murciélagos a humanos, potencialmente a través de un huésped intermedio aún por determinar. La Organización Mundial de la Salud (OMS) indica que COVID-19 es responsable de unos 68 millones de casos y 1,5 millones de muertes al 10 de diciembre de 2020. ¹

El virus del síndrome respiratorio agudo severo coronavirus 2 (SARS-CoV-2) pertenece a la familia Coronaviridae del orden Nidovirales. Su genoma es un ácido ribonucleico (ARN) monocatenario de sentido positivo. Ingresa al cuerpo con la ayuda de su proteína espiga (proteína S) al infectar las células del epitelio de las vías respiratorias, las células epiteliales alveolares, las células endoteliales vasculares y los macrófagos en el pulmón a través de los receptores de la enzima convertidora de angiotensina 2 (ECA2) humana por medio de la endocitosis. La proteasa de serina transmembrana 2 (TMPRSS2) ayuda a cebar la proteína S. La entrada del virus reduce la expresión de ECA2, lo que da como resultado una disfunción del sistema renina-angiotensina (SRA). Esto influye en la presión arterial y el equilibrio de líquidos y electrolitos al tiempo que causa inflamación y mejora la permeabilidad vascular en las vías respiratorias. ²

Después de la entrada, comienza a replicarse activamente en el sitio de la infección y posteriormente, a través de la ECA2, invade directamente y prolifera en múltiples órganos (células epiteliales alveolares, pulmonares, células del músculo liso arterial en la mucosa oral y nasal, nasofaringe, pulmón, estómago, intestino delgado, colon, piel, ganglios linfáticos, timo, médula ósea, bazo, hígado, riñón y cerebro), posteriormente estimula la actividad de las células inmunes, aumenta la producción de citocinas y activa otros mecanismos de resistencia a patógenos, lo cual justifica sus distintas formas de presentación clínica y compromiso multisistémico.²

La infección por SARS-CoV-2 da como resultado un amplio espectro de manifestaciones clínicas, desde formas asintomáticas hasta enfermedad leve, moderada o grave con síntomas que incluyen fiebre alta, tos, fatiga y disnea seguidos de muerte por insuficiencia respiratoria o falla multiorgánica. El desarrollo de una forma grave de COVID-19 depende de múltiples factores, como la composición genética del huésped, el envejecimiento y la preexistencia de comorbilidades, incluidas las enfermedades cardiopulmonares, la diabetes y la hipertensión. Los pacientes con afecciones crónicas, como enfermedades autoinmunes, cánceres y trasplantes de órganos sometidos a terapia inmunosupresora, tienen un mayor riesgo de desarrollar complicaciones. La inmunosupresión del hospedador podría inhibir potencialmente la formación de anticuerpos neutralizantes además de inhibir la hipercitocinemia lo que podría retrasar la eliminación del virus. Recientemente, se ha informado que un aclaramiento tardío del virus se asocia con incremento del riesgo de muerte.³

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La COVID-19 es una enfermedad emergente que ocasiona inflamación sistémica, similar a la observada en sepsis, donde las citocinas IL-6, IL-10 y TNF-alfa participan activamente en el desarrollo de la enfermedad y el desenlace. Debido a esta similitud se propone que en la COVID-19 estas citocinas también se encontrarán involucradas en la evolución de la enfermedad.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Existirá alguna relación entre las citocinas IL-6, IL-10 y TNF-alfa y la evolución de los pacientes con COVID-19?

HIPÓTESIS

Determinar los valores de IL-6, TNF-alfa e IL-10 en los pacientes graves de COVID-19 al inicio y durante su hospitalización se correlacionará con el desenlace de la enfermedad.

OBJETIVOS

GENERAL

Cuantificar la concentración de citocinas IL-6, IL-10 y TNF-alfa en el suero de pacientes graves con COVID-19 al inicio y a los 7 días después del ingreso hospitalario.

PARTICULARES

1. Determinar la concentración de IL-6, IL-10 y TNF-alfa en pacientes graves COVID-19 al inicio y 7 días después del ingreso hospitalario y voluntarios sanos.
2. Evaluar la relación de las citocinas IL-6, IL-10 y TNF-alfa y su efecto en la evolución de los pacientes.
3. Establecer la correlación de las citocinas IL-6, IL-10 y TNF-alfa de pacientes COVID-19 con el desenlace de la enfermedad.

METODOLOGÍA

DISEÑO DEL ESTUDIO

Analítico: Observacional, Longitudinal, Retrospectivo.

UNIVERSO DE TRABAJO

Pacientes adultos que ingresaron con la sintomatología asociada a COVID-19 (fiebre ≥ 38 C, tos, fatiga, cefalea, disnea) a la UMAE Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS, y que contaron con prueba de RT-PCR positiva para SARS-CoV-2.

CRITERIOS DE INCLUSIÓN

1. Pacientes adultos de ambos sexos, mayores de 16 años que ingresaron a la UMAE Hospital de especialidades del CMN SXXI con diagnóstico de COVID-19 y que se corroboró mediante la prueba de RT-PCR.

CRITERIOS DE NO INCLUSIÓN

1. Pacientes portadores de enfermedades inmunosupresoras: VIH+, Virus de Hepatitis C, inmunodeficiencias primarias, artritis reumatoide, lupus eritematoso y bajo tratamiento con inmunosupresores.
2. Pacientes o representantes legales que no aceptaron participar en el estudio.

CRITERIOS DE ELIMINACIÓN

1. Pacientes que rechazaron continuar participando en el estudio.
2. Pacientes con expediente incompleto.
3. Pacientes en los que no se logró efectuar la evaluación completa de la respuesta inflamatoria, serológica y celular.

TAMAÑO DE MUESTRA

1. Considerando las condiciones de la pandemia y el número de pacientes que recientemente se diagnosticaron, se consideró una muestra por conveniencia y se incluyó a todos los pacientes que cumplieron los criterios de inclusión de marzo a septiembre de 2020.

VARIABLES

VARIABLES DEPENDIENTES

1. Concentración de citocinas
2. Alta médica por mejoría o desenlace fatal
3. Número de días de estancia hospitalaria

VARIABLES INDEPENDIENTES

1. *Prueba positiva de RT-PCR para COVID-19*
2. *Gravedad de la enfermedad evaluada por las siguientes escalas: SOFA,*
3. *Variables sociodemográficas, laborales y personales.*
4. *Edad*
5. *Género*
6. *Presencia de comorbilidades: diabetes mellitus, hipertensión arterial, cardiopatías, sobrepeso/obesidad*
7. *Toxicomanías*
8. *Fiebre ≥ 38 C, tos, fatiga, cefalea, disnea, congestión nasal, secreción nasal, estornudos, dolor articular y muscular, dolor de garganta, diarrea*
9. *Número de días con los síntomas.*

DEFINICIÓN OPERACIONAL DE LAS VARIABLES

Variable	Tipo	Definición conceptual	Definición operacional	Escala medición	Fuente de información
Edad	Cuantitativa continua	Tiempo en años a partir del nacimiento	Tiempo en años a partir del nacimiento	Años	Expediente clínico
Género	Cualitativa Nominal Dicotómica	Característica biológica que permite clasificar a los seres humanos en hombres o mujeres	masculino o femenino	0=hombre 1= mujer	Expediente clínico
Caso confirmado	Cualitativa Dicotómica	Persona que cumpla con la definición operacional de caso sospechoso y que cuente con diagnóstico confirmado por la Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública reconocidos por el INBRE	Positivo o negativo	Positivo o negativo a SARS CoV2	Expediente clínico/ o resultado del laboratorio reconocido a solicitud
SOFA (Sequential Organ Failure Assessment Score)	Cuantitativa Discreta	Escala utilizada para la valoración de la severidad de disfunción orgánica, la cual involucra parámetros clínicos (Frecuencia arterial media y escala de Glasgow) y de laboratorio (Plaquetas, $\times 10^3 / \mu\text{L}$, Bilirubina, mg/dL, Creatinina,	puntuación SOFA más alta está asociada con una mayor probabilidad de mortalidad	valores del 0 al 4	Expediente clínico

		mg/DI, etc.)			
Índice de Masa Corporal (IMC)	Cuantitativa continua	Indicador que marca la relación entre el peso y la talla de un individuo utilizado en la detección del sobrepeso y obesidad en adultos.	Se calcula utilizando el peso en kilogramos dividido por el cuadrado de la talla en metros (kg/m ²)	IMC normal es de 18.5 a 24.9 sobrepeso o como un IMC igual o superior a 25 y la obesidad como un IMC igual o superior a 30	Expediente clínico
Citocinas (IL-10, IL-6 y TNF-alfa)	Cuantitativa continua	Las citocinas son proteínas pequeñas producidas y secretadas por distintas células, tienen efectos específicos sobre las interacciones y comunicación intercelular.	Se determinó la concentración sérica de citocinas séricas en pacientes COVID-19 y voluntarios sanos	Se miden a través de citometría de flujo en pg/ml	Técnica de inmunoensayos múltiples basados en perlas

DEFINICIONES

Caso sospechoso: Paciente adulto que en los últimos 7 días presento al menos dos de los siguientes signos y síntomas: tos, fiebre o cefalea. Acompañadas de al menos uno de los siguientes signos o síntomas:

- Disnea, artralgias, mialgias, odinofagia/dolor faríngeo, rinorrea, conjuntivitis, dolor torácico.

Caso confirmado: Paciente que cumpla con la definición de caso sospechoso y que cuente con diagnóstico confirmado por la Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública reconocidos por el InDRE

Caso grave: Paciente con neumonía, Síndrome Respiratorio Agudo Severo o insuficiencia renal.

SOFA (*Sequential Organ Failure Assessment Score*): Escala utilizada para la valoración de la severidad de disfunción orgánica, la cual involucra parámetros clínicos (Frecuencia arterial media y escala de Glasgow) y de laboratorio (Plaquetas, 1×10^3 / μ L. Bilirrubina, mg/dL. Creatinina, mg/dL. etc.). Tiene valores del 0 al 4, donde una puntuación SOFA más alta está asociada con una mayor probabilidad de mortalidad. El puntaje califica la anormalidad por sistema de órganos y explica las intervenciones clínicas²⁴.

Índice de Masa Corporal (IMC): Indicador que marca la relación entre el peso y la talla de un individuo utilizado en la detección del sobrepeso y obesidad en adultos. Se calcula utilizando el peso en kilogramos dividido por el cuadrado de la talla en metros (kg/m^2).

Donde un IMC normal es de 18.5 a 24.9, sobrepeso como un IMC igual o superior a 25 y la obesidad como un IMC igual o superior a 30.

Obesidad: El sobrepeso y la obesidad se definen como una acumulación anormal y excesiva de grasa que puede ser perjudicial para la salud.

Diabetes Mellitus: La diabetes de tipo 2 es un trastorno crónico que afecta la manera en la cual el cuerpo metaboliza el azúcar (glucosa), una fuente importante de combustible para el cuerpo.

Hipertensión arterial: La hipertensión arterial es una enfermedad crónica en la que aumenta la presión con la que el corazón bombea sangre a las arterias, para que circule por todo el cuerpo.

Cardiopatía: Es una condición patológica que involucra diferentes alteraciones del corazón como la enfermedad isquémica (alteración en el aporte de oxígeno al corazón), la insuficiencia cardiaca, entre otras.

Hepatopatía: Condición patológica que se caracteriza por alteración en la función hepática y cuya etiología puede ser de origen diverso.

Neumopatía: Condición patológica que se caracteriza por alteración en la función respiratoria y cuya etiología puede ser de diferente origen.

PROCEDIMIENTO GENERAL

En nuestro modelo de muestreo no probabilístico de casos consecutivos de pacientes que cumplieron con los criterios de selección y que aceptaron participar en el estudio (o los representantes legales) mediante consentimiento informado (con firma en la carta de consentimiento informado, ver Anexos), se realizó el siguiente proyecto. Los pacientes con sintomatología de COVID-19 y que acudieron a la UMAE serán evaluados por los médicos encargados de Admisión Continua de Urgencias de pacientes con potencial infección por SARS-CoV2. El área de Triage respiratorio se diseñó como un circuito lean health con la finalidad de ser más eficiente el proceso de valoración clínica de los pacientes.

Diagnóstico molecular y seguimiento de la carga viral

Una vez hecho el diagnóstico clínico de presunción se tomó una muestra para diagnóstico molecular (RT-PCR). Por disposición oficial, las muestras de los pacientes sospechosos fueron enviadas a los laboratorios de vigilancia epidemiológica del IMSS quienes eran los encargados y certificados institucionalmente para realizar el diagnóstico y reportar los casos. Fueron incluidos en el estudio aquellos pacientes que se ingresaron a hospitalización en esta unidad (UMAE HE CMN SXXI, IMSS). Las muestras iniciales se tomaron en pacientes sin resultado de RT-PCR, ya que la entrega del resultado lleva 48 horas. Por lo que existía la posibilidad de tomar muestras en pacientes con resultados negativos (Ver Anexo de Flujograma de muestras COVID-19).

Detección del virus SARS-CoV-2

El diagnóstico molecular se basó en la realización de una prueba de qRT-PCR de

tamizaje y otra confirmatoria empleando los iniciadores y sondas diseñados por V. Corman y col. del Charité, Berlín (Anexos). El grupo de V. Corman diseñó tres juegos de iniciadores y sondas que permiten la amplificación específica de fragmentos de los genes del virus SARS-CoV-2: gen RdRp (RNA Polimerasa dependiente de RNA), gen N (proteína de la nucleocápside) y gen E (proteína de la envoltura). La prueba de tamizaje se realizó empleando la región del gen E y la prueba confirmatoria se hizo utilizando los iniciadores para un gen alternativo como RdRp.

Toma de la muestra periférica

La toma de muestra de sangre se realizó por venopunción (o a través del catéter central en caso de contar con él); aproximadamente 2 tubos Vacutainer para extracción de sangre, con EDTA y sin EDTA, para obtención de suero y plasma, siguiendo los protocolos de protección para el paciente y para el personal médico (Anexo). La toma de muestra se realizó al ingreso y 7 días. Las muestras para analitos solubles fueron alicuotadas y congeladas hasta su procesamiento. Se reclutaron personas sin enfermedad para contar con un grupo control de personas sanas.

La determinación de mediadores inflamatorios solubles se realizó como a continuación se detalla.

Quantificación de citocinas séricas

Se evaluó la cantidad de citocinas IL-6, IL-10 Y TNF-alfa, mediante los equipos comerciales conocidos como CBAs (Cytokine Bead Array) para determinación de citocinas en solución mediante citometría de flujo.

Preparación de la mezcla de perlas

Se agitó cada suspensión de perlas antes de tomar las alícuotas durante 30 segundos en vórtex. Posteriormente, se tomó 10 μ L de cada suspensión de perlas del kit (IL-6, IL-10 y TNF-alfa) por cada muestra para analizar.

Se preparó la mezcla suficiente para los tubos a analizar contando la curva estándar por duplicado.

Preparación de las muestras: Alícuotas de suero de pacientes conservadas a -70° C de ~200 μ L. Fueron transferidas a refrigerador REVCO a -20° C una noche antes de la fecha de análisis. Posteriormente fueron transferidas a refrigerador a 4° C el día del análisis.

La alícuota se diluyó 1:4 con la solución específica para tal fin siguiendo las especificaciones del fabricante. Se colocó en el tubo correspondiente y se agitó con el vórtex y agregando 50 μ L de cada mezcla de perlas a su correspondiente tubo marcado. Se transfirieron 50 μ L de las muestras diluidas, del estándar, y de las correspondientes diluciones a los tubos rotulados. Se agregaron 50 μ L de reactivo de detección (proporcionado por el kit) a los correspondientes tubos. Los tubos se incubaron por 3 horas protegidos de la luz a temperatura ambiente. Se agregó 1mL de solución amortiguadora de lavado (proporcionada por el kit) a todos los tubos. Centrifugar a 200 g por 5 minutos. Se descartó el sobrenadante cuidadosamente y se añaden 300 μ L de solución amortiguadora de lavado que contiene paraformaldehído al 2%. Re-suspender el botón. Realizar cuantificación en citómetro de flujo Aria II.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se utilizó estadística descriptiva con base a las variables de interés. Así para las variables categóricas se reportaron proporciones. Para variables cuantitativas discretas o continuas, se determinó la media, mediana, moda y desviación estándar. De acuerdo con su distribución y varianza, se determinó el uso de estadísticos paramétricos o no-paramétricos. Así el análisis comparativo entre las características sociodemográficas (hombre vs mujer), edad (categorías de edad), comorbilidades (enfermo vs no enfermo), gravedad; con la concentración de los biomarcadores inflamatorios, ya sea frecuencias, medias o distribuciones de poblaciones, se realizaron pruebas de hipótesis mediante T de Student ó U-Mann Whitney o ANOVA de 2 vías y post-prueba Bonferroni o Dunn cuando así corresponda. Se elaboraron los mejores modelos de regresión logística, para estimar el riesgo de ser positivo para SARS-CoV2, así como de su gravedad y de presentar mayor o menor incremento en la respuesta. Los resultados se procesaron utilizando Excel, GraphPad Prisma y el programa STATA v.14.

ASPECTOS ÉTICOS

Para la realización del presente protocolo se solicitó la aprobación por el Comité de local de ética del HE del CMN “Siglo XXI” del IMSS (3601). Se consideró que los sujetos incluidos en este estudio tienen un riesgo mínimo, por lo que se solicitó la firma de una carta de consentimiento informado antes de iniciar el estudio.

Marco Legal: Este protocolo respeta las disposiciones enunciadas en la declaración de Helsinki de 1975 y sus enmiendas, así como los códigos y normas internacionales vigentes para las buenas prácticas en la investigación clínica. Aunado a lo anterior, se respetaron cabalmente los principios contenidos en el Código de Núremberg, el Informe Belmont, el Código de Reglamentos Federales de Estados Unidos, y en el reglamento de la ley general de salud, tanto en materia de investigación para la salud (Título Quinto). El protocolo no calificó para subordinarse a otras normas oficiales mexicanas específicas, ya que no utilizó compuestos radioactivos, compuestos químicos marcados, animales de laboratorio, partículas o materiales susceptibles de transmitir enfermedades infecciosas, ingeniería genética, terapia celular, ni sustancias químicas reactivas o tóxicas.

Se consideró que los sujetos sometidos a este estudio se solicitó la firma de una carta de consentimiento informado antes de iniciar el mismo (Anexo Carta de consentimiento). La persona que solicitó dicho consentimiento fue el investigador principal y/o alguno de los colaboradores que fueron considerados como sub-investigadores.

Riesgo de la Investigación: Dado que este protocolo incluye la toma de muestras sanguíneas, esta se clasifica con un riesgo tipo II, pero sólo fue realizada en pacientes adultos.

Calidad de la muestra: el control de calidad de la muestra se regirá de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-253-SSA1-2012 para la disposición de sangre humana y sus componentes con fines terapéuticos.

Balance Riesgo/Beneficio: Dado que las determinaciones biológicas se hicieron en el laboratorio, donde la UIMIQ cuenta con las medidas de bioseguridad necesarias para ello, así como el manejo confidencial de los datos, y de que el procedimiento en los pacientes fue parte del manejo indicado por su padecimiento. El único riesgo fue el relacionado con la toma de sangre, la cual se realizó por un profesional con experiencia, los cuales se vieron altamente superados por el beneficio académico y social de la información a obtener.

Confidencialidad: Todos los pacientes que ingresaron al estudio fueron tratados con apego estricto de confidencialidad, quedando prohibida la divulgación de sus datos personales y médicos. Las hojas de recolección de datos (Anexo Recolección de datos) fueron mantenidas en resguardo en la UIMIQ de la UMAE Hospital de Especialidades del CMN SXXI y únicamente fueron utilizadas por los investigadores con los propósitos de la investigación en curso. En el expediente clínico del paciente se anotaron los datos clínicos relevantes para el seguimiento de su padecimiento y los resultados de laboratorio. Los reportes de la investigación, como los artículos publicados o presentaciones en congresos y foros académicos, no llevaron ningún dato personal de los participantes.

Selección de Participantes: Antes de invitar a cada paciente a participar en el proyecto, se le explicó ampliamente su patología y las estrategias terapéuticas que le corresponden al momento, así como la posibilidad de participación en la investigación y los riesgos y

potenciales beneficios que pueden derivar de ello.

Si el paciente decidió no ser seleccionado para el protocolo se continuó su tratamiento tal y como indicó de acuerdo con el protocolo de tratamiento de pacientes con COVID-19 en la UMAE Hospital de Especialidades de CMN "Siglo XXI", acordes a la norma oficial mexicana vigente y la normativa del IMSS. Se invitó a participar a los pacientes que cumplieron con los criterios de inclusión y que exentaron los criterios de exclusión o eliminación.

ASPECTOS DE BIOSEGURIDAD

1. La investigación se consideró de riesgo mínimo en aspectos de bioseguridad ya que se colectaron datos del expediente clínico, a través de un cuestionario, así como de la toma de muestra sanguínea por personal calificado y con material estéril. Se anexa la carta de bioseguridad que informa acerca del manejo de muestras de sangre. Los RPBI generados durante el estudio fueron manejados bajo la norma NOM-087-ECOL-SSA1-2002.
2. Las muestras de sangre fueron recolectadas en el área asignada para manejo de los pacientes con COVID-19. Una vez colectadas fueron colocadas en hieleras etiquetadas adecuadamente para su transporte exclusivo a la Unidad de Investigación Médica en Inmunoquímica de la UMAE del Hospital de Especialidades, Centro Médico Nacional Siglo XXI, por los investigadores responsables del proyecto.
3. Las muestras de sangre fueron obtenidas de pacientes que cumplieron los criterios de selección. Todo el material punzocortante que fue empleado para la toma de muestras, así como el desecho de estas en el laboratorio fueron depositados en recipientes especiales, manejados por expertos para el desecho de estos. La UIMIQ cuenta con campanas y áreas para el trabajo con nivel de bioseguridad 2, necesarias para el manejo de las muestras de estos pacientes.

4. Las muestras de plasma o suero fueron almacenadas en ultracongeladores del biobanco de la Unidad de Investigación Médica en Inmunoquímica de la UMAE del Hospital de Especialidades, Centro Médico Nacional Siglo XXI a -80°C hasta su procesamiento.

5. Este protocolo no contempla el uso de fármacos o de procedimientos quirúrgicos más allá de los indicados por las normas vigentes para el tratamiento de infección por SARS-CoV2, por lo cual los riesgos y efectos colaterales para el participante son mínimos, restringiéndose a la posible formación de un hematoma debido a la punción de la vena para la toma de la muestra. Esto se explica con detenimiento en la carta de consentimiento y asentimiento.

RESULTADOS

Se reclutaron un total de 28 pacientes con COVID-19 hospitalizados en área designada para dicha enfermedad dentro del Hospital de Especialidades Centro Médico Nacional Siglo XXI, recabando los datos clínicos y laboratoriales mediante la hoja de recolección de datos usada para este protocolo de investigación, dichos datos son presentados en la siguiente tabla:

*Tabla 1. Datos demográficos y clínicos de Pacientes con COVID-19. Se realizaron análisis estadísticos mediante pruebas de chi-cuadrada (variables categóricas) o Mann-Whitney (variables continuas) ($\alpha = 0,05$). $p > 0.05$ **

VARIABLES	TOTAL (N=28)	SOBREVIDA(21)	DECESOS(7)	P
EDAD	51 ± 13	49±11	59±16	0.00772
SEXO (%)	FEM 39.3 MASC 60.7	FEM 33.3 MASC 66.7	FEM 57.1 MASC 42.9	0.3809
IMC (kg/m ²)	30.54 ± 6	27±35	32 ±10	0.8053
DM %	21.4	23.8	14.3	0.0715
HTA%	21.4	19	29	0.0978
OBESIDAD %	53.6	57.1	42.9	0.0477
SOFA	3.6-14.3	4.8-9.5	14.3-28.6	0.1093
BULUT	MODERADO 21.4 SEVERO 78.6	MODERADO 19 SEVERO 81	MODERADO 28.6 SEVERO 71.4	0.6219
LEUCOCITOS (10 ³ /μL)	7.24-12	7.11-11.2	9.24-15	<0.0001
PLAQUETAS (10 ³ /μ)	226-350	222-347	224-585	0.6037
NEUTROFILOS (10 ³ /μ)	6-10	5.9-10	7.72-11.15	0.2676
LINFOCITOS (10 ³ /μ)	0.62-1.3	0.72-1.4	0.51-1.05	<0.0001
MONOCITOS (10 ³ /μ)	0.3-0.6	0.3- 0.6	0.29-0.85	0.6497
EOSINOFILOS (10 ³ /μ)	0	0	0	0.2895
BASOFILOS (10 ³ /μ)	0.01-0.03	0.01-0.02	0.01-0.06	0.5092
GLUCOSA (mg/dl)	91.25-131	93-133	87-105	0.0821
FERRITINA (ng/ml)	131	351-1919	760-1530	0.6512
PCR (mg/dl)	5.4-20.8	3.32-15	11.5-29	0.0080
DIMERO D (ug/ml)	0.6-1.9	0.49-3	0.84-1.05	0.7244
FIBRINOGENO (ng/mL)	322-793	97-766	671-914	0.0165
FIEBRE %	82.1	81	85.7	0.3408
TOS %	54	47.6	71.4	0.0009
FATIGA %	25	14.3	57.1	<0.0001
CEFALEA %	54	47.6	71.4	0.0009
DISNEA %	25	91	85.7	0.0003

CONSTIPACION NASAL%	0	0	0	NA
ARTRALGIAS%	50	52.4	42.9	0.2025
MIALGIAS%	79	76.2	85.7	0.0715
ODINOFAGIA %	32.1	38.1	14.3	0.0001
DIARREA %	29	28.6	28.6	>0.9999
DÍAS DESDE EL INICIO DE LOS SÍNTOMAS	6-11	6-11	5-10	0.6847
TOXICOMANÍAS (TABAQUISMO) %	21	23.8	14.3	0.0715
IL-6 (pg/ml)	1.2- 104	1.2-64	84-142	0.0203
TNF-A (pg/ml)	3.32-3.32	3.32-33.62	3.32 -3.32	>0.9999
IL-10 (pg/ml)	6-24	4.3-21	10.24-26	>0.1738

Los pacientes fueron divididos en dos cortes bajo los criterios de sobrevida (n=21) y pacientes que fallecieron durante la estancia hospitalaria (n=7) analizados mediante estadística descriptiva con las pruebas de chi cuadrada o exacta de Fisher.

Dentro de las características demográficas los pacientes contaron con una edad media de 51 ± 13 años, observando una diferencia significativa entre los pacientes con sobrevida y los decesos (49 y 59 años respectivamente); la obesidad también es un factor diferencial ($p=0.0477$); dentro de las características clínicas se observó un mayor número de leucocitos ($p= <0.0001$) en pacientes que fallecieron, sin embargo, tienen un menor número de linfocitos ($p= <0.0001$). Dentro de los marcadores de inflamación de fase aguda, se notó una mayor concentración de fibrinógeno ($p= 0.016$) y de proteína C reactiva ($p= 0.008$) en aquellos pacientes que fallecieron, de manera general, también presentaron mayores síntomas (tabla 1).

Se determino la concentración de las citocinas IL-6, IL-10 y TNF-alfa en pacientes graves COVID-19 al inicio y 7 días después del ingreso hospitalario y voluntarios sanos IL-6, IL-10 y TNF-alfa en pacientes graves COVID-19 al inicio y 7 días después del ingreso hospitalario y voluntarios sanos. En el caso de la IL-6 no hay diferencia significativa entre los pacientes COVID-19 y los voluntarios sanos, pero si se observa una disminución de esta citocina al día 7 ($p=0.05$, Fig. 1a). Los pacientes COVID-19 tuvieron valores bajos de TNF-a respecto a los voluntarios sanos ($p= < 0.0001$), pero el seguimiento de estos pacientes al día 7, no mostro ningún cambio en la concentración de esta (Fig. 1b). Los valores de la interleucina IL-10 en pacientes COVID-19 resulto alta en comparación con los voluntarios ($p=0.0053$), pero al día 7 no hubo cambio significativo en cuanto su concentración periférica (Fig. 1c).

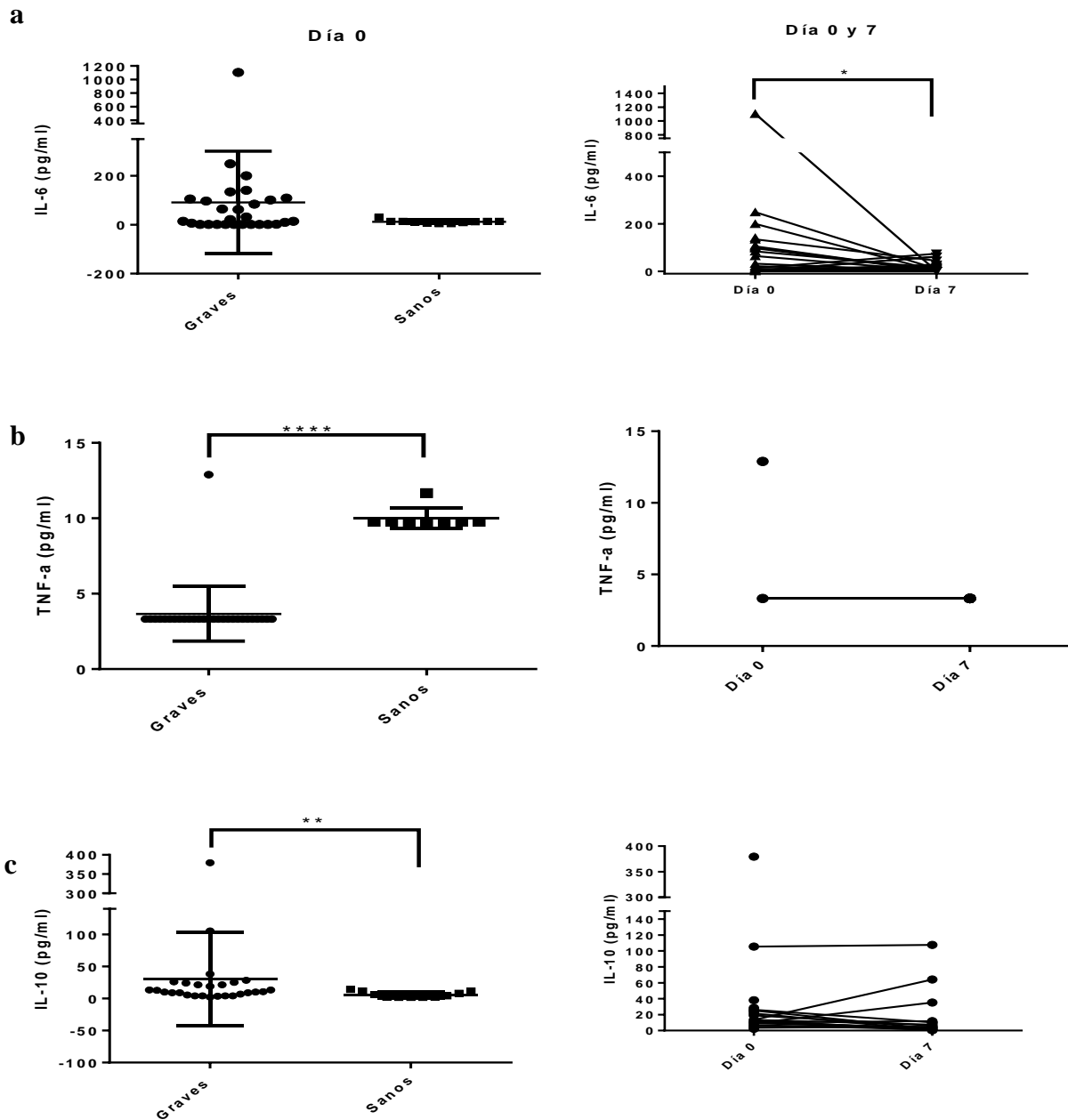


Figura 1. Cuantificación de citocinas IL-6, TNF-a e IL-10 en pacientes COVID-19 por citometría de flujo. Comparación de citocinas IL-6 y voluntarios sanos, en el la cual no se observa diferencia significativa, en el seguimiento de los pacientes al día 7, se presenta una disminución significativa $p= 0.05$ (a); en b, se muestra la cuantificación para TNF-a en pacientes COVID-19 y voluntarios sanos con una diferencia significativa de $p= 0.001$, en el seguimiento se mantuvo en los mismos niveles al día 7; la IL-10 aumenta en pacientes COVID-19 en comparación con voluntarios sanos (c), al seguimiento al día 7 no hay diferencia significativa. Prueba t-student seguida de Mann-Whitney.

La evolución de los pacientes se evaluó mediante la escala SOFA y esta se relacionó con la concentración de las citocinas en suero de los pacientes, para determinar si existía una inferencia de estas con la evolución de los pacientes, obteniendo nula correlación (Fig. 2), las citocinas estudiadas en este trabajo no tienen inferencia en la evolución de los pacientes COVID-19. Sin embargo, se realizó un modelo de Regresión logística binaria para englobar la participación de las 3 citocinas con el desenlace de la enfermedad, tomando dos resultados, mejoría y deceso (tabla 2), el modelo descartó a TNF-a, con lo que se puede inferir que esta no contribuye con el desenlace de la enfermedad, mismo que podemos corroborar con la correlación individual e incluso con el seguimiento de los pacientes, ya que no hay cambio en las concentraciones. Para la IL-6 el modelo explica que entre más concentración de IL-6 tiene un paciente mayor probabilidad de desenlace negativo (fallecer) tendrá ($p=0.16$), además, la IL-10 marcó una tendencia positiva (mejoría) en el modelo, es decir, cuanto mayor sea la presencia de IL-10, la probabilidad de sobrevivir es alta.

Tabla 1. Correlación de las citocinas IL-6, TNF-a e IL-10 con el desenlace de la enfermedad. Modelo de regresión logística binaria, donde explica un modelo de probabilidades de desenlace negativo si el valor de IL-6 es elevado $p= 0.016$ y un desenlace favorable para los niveles bajos de IL-10 como tendencia.

	B	Error estándar	Wald	gl	Sig.	Exp(B)	95% C.I. para EXP(B)	
							Inferior	Superior
IL6	.039	.016	5.756	1	.016	1.039	1.007	1.073
IL10	-.046	.055	.723	1	.395	.955	.858	1.062

DISCUSIÓN

En esta emergencia sanitaria se han sumado todos los esfuerzos por contener la pandemia, se ha visto necesaria integrar de manera oportuna la atención médica con la investigación, para encontrar herramientas que permitan, valorar y manejar adecuadamente a los pacientes COVID-19. Se han querido describir biomarcadores biológicos que pronostiquen la evolución de los pacientes o su desenlace; se ha considerado al antagonista de la IL-6 como un posible tratamiento para la COVID-19, ya que se ha observado que una elevación moderada, cerca de los 80 pg/ml es suficiente para identificar pacientes con riesgo de falla respiratoria y muchos estudios muestran que al tratar pacientes con su antagonista el porcentaje de mortalidad baja.¹¹ Nuestros resultados no pueden concordar con lo reportado a este respecto, ya que, los pacientes incluidos en este estudio están en estadio grave, por definición operacional, no requieren ventilación mecánica y no presentan aun síntomas de falla respiratoria, sin embargo, aporta información sobre la consideración en la presencia de IL-6 en suero de los pacientes al ingreso al hospital como un factor determinante para un desenlace fatal, donde para los pacientes fallecidos los niveles de IL-6 están por arriba de los 80 pg/ml, y los sobrevivientes por debajo de los 64 pg/ml y considerar el tratamiento con algún antagonista de la IL-6 en estos pacientes. Por otra parte, la IL-10 se encuentra elevada con respecto a los voluntarios sanos, lo cual corresponde por lo ya reportado en la literatura, donde se observa un incremento de esta citocina en la primera semana de evolución del paciente.¹² Varios estudios han reportado una relación de este incremento en la citocina IL-10 con la severidad de la enfermedad,^{13,14,15} sin embargo, en nuestro estudio esto no se cumple, pues nuestros resultados arrojan que no hay dicha relación,

como ya lo habían reportado en un estudio realizado en Francia y otro en Irlanda en el cual tampoco encontraron relación, ni significancia.^{16,17} En el seguimiento de los pacientes, se ha reportado que la IL-10 recae en el curso de 2-3 semanas, en nuestro estudio no se pudo corroborar esto ya que el seguimiento es a los 7 días.^{18, 19}

El papel de TNF-a en COVID-19 esta siendo estudiado como modular de la respuesta inflamatoria e incluso como tratamiento junto con la IL-6, desafortunadamente en nuestro estudio esta citocina no resulto en ningún cambio en el seguimiento de los pacientes, sin embargo sus valores son significativamente menos que los voluntarios sanos, lo cual no concuerda con la mayoría de los resultados reportados, sería importante aumentar el numero de pacientes en todas las variables para que la estadística sea representativa. Además, es de vital importancia buscar estas citocinas en el pulmón y observar el efecto que hacen el, a la IL-10 y TNF-a se les considera como protectoras del tejido pulmonar²⁰, incluso se ha reportado este efecto en modelos animales con ventilación mecánica.

CONCLUSIÓN

No se encontraron correlaciones entre las citocinas IL-6, IL-10 y TNF- α con la evolución de la enfermedad, sin embargo, se observa que a mayores concentraciones de IL-6 mas probabilidades de deceso tienen los pacientes COVID-19, y esto concuerda clínicamente al tener niveles bajos en los sobrevivientes contra los decesos. Se resalta la necesidad de aumentar el numero de pacientes con la finalidad de mayor potencia estadística. Este estudio es una aproximación a los marcadores de riesgo que serán de vital ayuda en el manejo de pacientes COVID-19.

REFERENCIAS

1. Velavan TP, Meyer CG. The COVID-19 epidemic. *Trop Med Int Health* 2020;25:278-80.
2. Wu D, Wu T, Liu Q, Yang Z. The SARS-CoV-2 outbreak: what we know. *Int J Infect Dis* 2020.
3. Yokota, S., Miyamae, T., Kuroiwa, Y., & Nishioka, K. (2021). Novel Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) and Cytokine Storms for More Effective Treatments from an Inflammatory Pathophysiology. *Journal of Clinical Medicine*, 10(4), 801.
4. Ramasamy, S., & Subbian, S. (2021). Critical Determinants of Cytokine Storm and Type I Interferon Response in COVID-19 Pathogenesis. *Clinical Microbiology Reviews*, 34(3).
5. Peddapalli, A., Gehani, M., Kalle, A. M., Peddapalli, S. R., Peter, A. E., & Sharad, S. (2021). Demystifying Excess Immune Response in COVID-19 to Reposition an Orphan Drug for Down-Regulation of NF- κ B: A Systematic Review. *Viruses*, 13(3), 378.
6. Allegra, A., Di Gioacchino, M., Tonacci, A., Musolino, C., & Gangemi, S. (2020). Immunopathology of SARS-CoV-2 infection: immune cells and mediators, prognostic factors, and immune-therapeutic implications. *International journal of molecular sciences*, 21(13), 4782.
7. Pearce, L., Davidson, S. M., & Yellon, D. M. (2020). The cytokine storm of COVID-19: a spotlight on prevention and protection. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 24(8), 723-730.
8. Tay, M. Z., Poh, C. M., Rénia, L., MacAry, P. A., & Ng, L. F. (2020). The trinity of COVID-19: immunity, inflammation and intervention. *Nature Reviews Immunology*, 20(6), 363-374.
9. Schön, M. P., Berking, C., Biedermann, T., Buhl, T., Erpenbeck, L., Eyerich, K., ... & Steinbrink, K. (2020). COVID-19 and immunological regulations—from basic and translational aspects to clinical implications. *JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft*, 18(8), 795-807.
10. Ragab, D., Salah Eldin, H., Taeimah, M., Khattab, R., & Salem, R. (2020). The COVID-19 cytokine storm; what we know so far. *Frontiers in immunology*, 11, 1446.
11. Herold T., Jurinovic V., Arnreich C., Hellmuth J.C., von Bergwelt-Baildon M., Klein M. 2020. Level of IL-6 Predicts Respiratory Failure in Hospitalized Symptomatic COVID-19 Patients. medRxiv. April 1
12. Herold T., Jurinovic V., Arnreich C., Hellmuth J.C., von Bergwelt-Baildon M., Klein M. 2020. Level of IL-6 Predicts Respiratory Failure in Hospitalized Symptomatic COVID-19 Patients. medRxiv. April 1
13. World Health Organization . 2019. Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS-CoV)<https://www.who.int/emergencies/mers-cov/en/>
14. Woo P.C., Lau S.K., Huang Y., Yuen K.Y. Coronavirus diversity, phylogeny and interspecies jumping. *Exp. Biol. Med. (Maywood)* 2009;234:1117–1127.
15. Xu X., Yu C., Qu J., Zhang L., Jiang S., Huang D. Imaging and clinical features of patients with 2019 novel coronavirus SARS-CoV-2. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*. 2020;(47):1275–1280.
16. Zhu N., Zhang D., Wang W., Li X., Yang B., Song J. A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. *N. Engl. J. Med.* 2020;(382):727–733
17. Liao M., Liu Y., Yuan J., Wen Y., Xu G., Zhao J., Cheng L., Li J., Wang X., Wang F., Liu L. Single-cell landscape of bronchoalveolar immune cells in patients with COVID-19. *Nat. Med.* 2020;12(May):1–3
18. Weiss S.R., Leibowitz J.L. Coronavirus pathogenesis. *Adv. Virus Res.* 2011;81:85–164.
19. Channappanavar R., Fehr A.R., Vijay R., Mack M., Zhao J., Meyerholz D.K. Dysregulated type I interferon and inflammatory monocyte-macrophage responses cause lethal pneumonia in SARS-CoV-infected mice. *Cell Host Microbe*. 2016;19:181–193
20. Han H., Yang L., Liu R., Liu F., Wu K.L., Li J. Prominent changes in blood coagulation of patients with SARS-CoV-2 infection. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2020 doi: 10.1515/cclm-2020-0188

ANEXO

Anexo 1. Carta de consentimiento informado



**INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
UNIDAD DE EDUCACIÓN, INVESTIGACIÓN
Y POLITICAS DE SALUD
COORDINACIÓN DE INVESTIGACIÓN EN SALUD**

**Carta de consentimiento informado para participación en
protocolos de investigación (adultos)**

Nombre del estudio:	“Efecto de las citocinas IL-10, IL-6 y TNF alfa en suero de pacientes con inflamación sistémica por COVID-19 y su relación con la evolución de la enfermedad”
Patrocinador externo (si aplica):	NO APLICA
Lugar y fecha:	
Número de registro institucional:	
Justificación y objetivo del estudio:	<p>A usted se le invita a participar en este estudio por que cumple con los criterios de inclusión, que dentro de ellos es presentar la enfermedad COVID-19, generada por el virus SARS-CoV2 (Coronavirus).</p> <p>Nuestro objetivo es conocer si un tipo de células de defensa (linfocitos T) y los niveles de anticuerpos llamados IgG (unas moléculas que se elevan durante la infección), se asocian con el desenlace de la enfermedad.</p> <p>Al igual que usted, otras personas más serán invitadas a participar. Su participación en este estudio es completamente voluntaria. Por favor lea la información que le proporcionamos, y haga las preguntas que desee antes de decidir si desea o no participar.</p>
Procedimientos:	<p>Si usted acepta participar ocurrirá lo siguiente:</p> <p>Le pediremos que nos permita tomarle de su brazo dos muestras de sangre, una al inicio de su evaluación por el servicio de emergencia/urgencias. La cantidad de sangre que le tomaremos en cada ocasión equivale a una cucharada sopera regular (6mL). También requerimos que nos otorgue autorización para tomar algunos datos de su expediente clínico que nos permitan saber detalles del proceso infeccioso.</p> <p>De cada una la muestra de sangre, tomaremos una pequeña parte y la pondremos en contacto con moléculas (anticuerpos sintéticos) que al unirse o no a las células (linfocitos) en su sangre indican el tipo de célula, conjuntamente, se medirán la cantidad de anticuerpos que ha producido en respuesta a la infección.</p>
Posibles riesgos y molestias:	<p>Dolor o moretón en el brazo donde entra la aguja para tomar la sangre. En este estudio más allá del dolor mínimo asociado con la toma de sangre, las molestias son la recopilación de la información mediante el cuestionario y la toma de signos vitales. La información recopilada de su expediente clínico será tomada bajo absoluta reserva y no se manipularán sus datos personales ya que no son necesarios para el análisis.</p>
Posibles beneficios que recibirá al participar en el estudio:	<p>Aunque directamente no obtendrá ningún beneficio de los datos obtenidos, estos permitirán verificar si la activación de las células mieloides pueden o no servir como indicadores de los pacientes a complicarse o resolver más rápido la enfermedad y orientar la vigilancia selectivamente en un futuro para otras personas que lleguen a padecer de COVID-19 o enfermedades parecidas.</p>
Información sobre resultados y alternativas de tratamiento:	<p>Usted recibirá el tratamiento adecuado para resolver la infección respiratoria que padece, independientemente que resulte ser por COVID-19 u otro agente infeccioso diferente a SARS CoV2, en el remoto caso de presentarse complicaciones asociadas a su participación en el presente estudio, el IMSS otorgará y cubrirá todas las atenciones requeridas.</p> <p>Si a Usted le interesan conocer sus resultados de lo que analizamos de su sangre y células de defensa, puede contactar al responsable del proyecto, el Dr. Constantino III Roberto López Macías al teléfono 55 56 276900 ext. 21476</p>
Participación o retiro:	<p>Su participación en este estudio es completamente voluntaria. Si usted decide no participar, seguirá recibiendo la atención médica brindada por el IMSS, se le ofrecerán los procedimientos establecidos dentro de los servicios de atención médica del IMSS. Es decir, que, si usted no desea participar en el estudio, su decisión, no afectará su relación</p>

con el IMSS y su derecho a obtener los servicios de salud u otros servicios que recibe del IMSS. Si en un principio desea participar y posteriormente cambia de opinión, usted puede abandonar el estudio en cualquier momento. El abandonar el estudio en momento que quiera no modificará de ninguna manera los beneficios que usted tiene como paciente atendido en el IMSS. Para los fines de esta investigación sólo utilizaremos la información que usted nos ha brindado desde el momento en que acepto participar y hasta el momento en el cual nos haga saber que ya no desea participar.

Privacidad y confidencialidad:

La información que obtengamos de su expediente clínico será guardada de manera confidencial, para garantizar su privacidad. Cuando los resultados de este estudio sean publicados o presentados en conferencias no se dará información que pudiera revelar su identidad. Su identidad será protegida y ocultada. Para proteger su identidad le asignaremos un número que utilizaremos para identificar sus datos, y usaremos ese número en lugar de su nombre en nuestras bases de datos.

Declaración de consentimiento:

Después de haber leído y habiéndome explicado todas mis dudas acerca de este estudio:

No acepto participar en el estudio.

Si acepto participar y que se tome la muestra solo para este estudio.

Si acepto participar y que se tome la muestra para este estudio y estudios futuros, conservando su sangre hasta por seis meses tras lo cual se destruirá la misma.

En caso de dudas o aclaraciones relacionadas con el estudio podrá dirigirse a:

Investigadora o Investigador Responsable: Dr. Eduardo Ferat Osorio, División de Investigación en Salud, Unidad de Investigación Médica en Inmunoquímica y Servicio de Gastrocirugía, Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI. IMSS. Tel: 56276900 ext. 21476

Colaboradores:

Dr. Jorge Alberto Carmona Meza. Teléfono: 7442080373

En caso de dudas o aclaraciones sobre sus derechos como participante podrá dirigirse a: Comité Local de Ética de Investigación en Salud del CNIC del IMSS: Avenida Cuauhtémoc 330 4° piso Bloque "B" de la Unidad de Congresos, Colonia Doctores. México, D.F., CP 06720. Teléfono (55) 56 27 69 00 extensión 21230, correo electrónico: comité.eticainv@imss.gob.mx

Nombre y firma del participante

Nombre y firma de quien obtiene el consentimiento

Testigo 1

Testigo 2

Nombre, dirección, relación y firma

Nombre, dirección, relación y firma

Este formato constituye una guía que deberá completarse de acuerdo con las características propias de cada protocolo de investigación, sin omitir información relevante del estudio.

Clave: 2810-009-013

ANEXO 2. CARTA DE RECOLECCIÓN DE DATOS

Nombre del paciente						
Número de afiliación						
Teléfono						
Edad						
Género		Masculino		Femenino		
Peso (kg)						
Talla (m)						
Comorbilidades	Comorbilidades (índice de Charlson)					
	Diabetes	Si (1)	No (0)	Hipertensión Arterial	Si (1) No	
	Complicación crónica de DM	Si (1)	No (0)	Dislipidemia	Si (1) No	
	Enfermedad arterial periférica	Si (1)	No (0)	Insuficiencia cardiaca IV	Si (1) No	
	Enfermedad vascular cerebral	Si (1)	No (0)	Cardiopatía isquémica /IAM	Si (1) No	
	Demencia	Si (1)	No (0)	Insuficiencia renal crónica	Si (1) No	
	Epilepsia	Si (1)	No (0)	Insuficiencia hepática aguda	Si (1) No	
	Enf. Tejido conectivo	Si (1)	No (0)	Cirrosis hepática	Si (1) No	
	Hipotiroidismo	Si (1)	No (0)	Lupus	Si (1) No	
	inmunosupresión	Si (1)	No (0)	infección VIH /SIDA	Si (1) No	
	RCP previo a ingreso	Si (1)	No (0)	EPOC	Si (1) No	
	Linfoma	Si (1)	No (0)	Leucemia	Si (1) No	
	Tumor solido	Si (1)	No (0)	Úlcera gastroduodenal	Si (1) No	
	Tabaquismo	Si (1)	No (0)	Exposición humo	Si (1) No	
	Medicación Crónica					
Diagnóstico de ingreso						
Fecha ingreso a TRIAGE						
Fecha de ingreso a unidad COVID						
Fecha de inicio de síntomas						
Síntomas iniciales		Si	No		Si	
Otros síntomas	Fiebre			Fatiga		
	Disnea			Diarrea		
	Tos			Náuseas		
	Rinorrea			Hiposmia/anosmia		
	Expectoración			Artralgias		
	Mialgias			Cefalea		
	Artralgias			Dolor torácico		
	Disgeusia			Otros, especifique		
Laboratorios	Parámetro		Ingreso		Días 3-7	Día
	Hemoglobina					
	Leucocitos totales					
	Linfocitos totales					
	Neutrófilos totales					
	Plaquetas					
	Creatinina					
	Glucosa					
	Bilirubinas totales					
	DHL					
	Proteína C reactiva					
	Procalcitonina					
	Dímero D					
	Fibrinógeno					
	CK total					
Uresis (ml/kg/hora)						
Lactato						

ANEXO 3. CARTA DE BIOSEGURIDAD

CARTA DE ANUENCIA POR EL COMITÉ DE BIOSEGURIDAD PARA EFECTUAR EL ESTUDIO, CON IMPLICACIONES DE BIOSEGURIDAD

Quien suscribe Dr. Eduardo Ferat Osorio con número de matrícula 874301, adscrito a la División de Investigación, y Servicio de Gastrocirugía del Hospital de Especialidades “Dr Bernardo Sepúlveda Gutiérrez”, Centro Médico Nacional “Siglo XXI”, hace constar que el protocolo titulado: “Asociación de niveles séricos de quimiocinas con el desenlace y días de estancia hospitalaria de pacientes con Síndrome Agudo Respiratorio Severo por COVID19” , del cual es responsable, TIENE IMPLICACIONES DE BIOSEGURIDAD debido a que se trabajará con (marcar las opciones que apliquen):

- (X) Material biológico infecto-contagioso: **Tejido sanguíneo de pacientes con COVID19**
- () Cepas patógenas de bacterias o parásitos: __ (bacteria o parásito) _____ () Virus: __ (virus) _____
- () Material radiactivo: __ (radioisótopo(s)) _____
- () Animales y/o células y/o vegetales genéticamente modificados: (tipo de material) _____
- () Sustancias tóxicas, peligrosas o explosivas: (tipo de material) _____
- () Material que puede poner en riesgo la salud o la integridad física del personal de salud o los derechohabientes del IMSS o afectar al medio ambiente: _____ (tipo de material) _____
- () Animales (de laboratorio, granja o vida silvestre): _____
- () Trasplante de células, tejidos u órganos _____
- () Terapia celular _____

Asimismo, declara que conoce, ha leído y cumplirá las normas, reglamentos y manuales de bioseguridad que apliquen al proyecto (consultar: “Bioseguridad en la Investigación en Salud” de la página web de la Coordinación de Investigación en Salud del I.M.S.S.)

(Enlistar los documentos que apliquen):

- a) NOM-087-ECOL-SSA1-2002, aplicando todas las especificaciones descritas para la protección de los binomios ambiental-salud, ambiental-residuos peligrosos, así como el manejo y clasificación de Residuos Peligrosos Biológico-Infecciosos (RPBI) de manera adecuada, por lo cual esta normatividad será respetada en su totalidad en la presente propuesta de investigación.

También manifiesta que existe evidencia documental auditable de que:

- a) Se cuenta con los permisos y/o licencias oficiales que se requieran para llevar a cabo el trabajo propuesto.
- b) Las instalaciones de los laboratorios involucrados se encuentran en estado satisfactorio de operación y son adecuadas para llevar a cabo el trabajo propuesto.
- c) El equipo a utilizar se encuentra en estado satisfactorio de operación.
- d) Existen dispositivos personales de protección que se encuentran en estado satisfactorio de operación.
- e) Los involucrados en el proyecto, incluyendo a los estudiantes que participen en el mismo, han recibido la capacitación necesaria para trabajar con el material señalado anteriormente.
- f) Se mantendrán las condiciones adecuadas de instalaciones, equipo y personal durante el desarrollo del proyecto y que el protocolo se suspenderá en caso de haber alguna irregularidad.



Dr. Eduardo Ferat Osorio Investigador Titular A.
División de Investigación en Salud, Unidad de Investigación Médica en Inmunoquímica y Servicio de Gastrocirugía
Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI. IMSS. Tel: 56276900 ext. 21476
Correo electrónico: eduardoferat@me.com