



SALUD
SECRETARÍA DE SALUD



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO HOSPITAL
GENERAL DE MEXICO "DR. EDUARDO LICEAGA"

SERVICIO DE NEUMOLOGÍA

TESIS DE POSGRADO

**"Análisis de los cambios morfológico-nucleares en neutrófilos inducidos por el suero
de pacientes con COVID 19 severo y moderado"**

PARA OBTENER EL GRADO DE:

ESPECIALISTA EN NEUMOLOGÍA

Tipo de investigación

Retrospectivo

Tipo de financiamiento

PROPIOS DEL HOSPITAL

Tipo de apoyo que se solicitará

PROPIOS DEL HOSPITAL GENERAL DE MEXICO

PRESENTA:

DR. EDGAR JONATHAN MUÑOZ TORRES

ASESOR DE TESIS

DR. ALEJANDRO HERNANDEZ SOLIS

MIGUEL ANGEL RIVERO SILVA

PROFESOR TITULAR DEL CURSO DE NEUMOLOGIA:

DR. FRANCISCO PASCUAL NAVARRO REYNOSO

CIUDAD DE MEXICO, SEPTIEMBRE 2022





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.



SALUD
SECRETARÍA DE SALUD



HOSPITAL
GENERAL
de MÉXICO

DR. EDUARDO LICEAGA

RESUMEN ESTRUCTURADO

Introducción: La pandemia por COVID-19 desató una emergencia sanitaria mundial, debido a la elevada capacidad de transmisión y la velocidad de propagación de SARS-CoV-2, en el 15-30% de los hospitalizados conllevó a cuadros clínicos graves que necesitaron de cuidados intensivos, el estudio de los elementos del sistema inmune resultó crucial para el conocimiento de los mecanismos involucrados en la patología y el posible tratamiento. Aunque los neutrófilos no son la principal estirpe celular involucrada en respuesta a virus, desempeñan funciones de primera línea que determinan el curso de una infección, en el caso específico de COVID-19 su estudio podría permitir elucidar los estadios de la infección. **Objetivo:** Describir las modificaciones en la morfología nuclear que los neutrófilos de pacientes con COVID-19 presentan y la respuesta de los neutrófilos de donadores sanos a la incubación con suero de pacientes COVID-19. **Metodología y métodos:** Se realizó un estudio transversal retrospectivo y analítico, cualitativo, experimental de laboratorio e inductivo, con muestreo por conveniencia en la unidad de Neumología y Cirugía de Tórax del HGM Dr. Eduardo Liceaga, las muestras de sangre periférica de pacientes con COVID-19 se procesaron para recuperar el paquete celular y el suero, del paquete celular se recuperaron los neutrófilos, se adhirieron y se tiñeron para observar el material nuclear, mientras el suero se usó para probar el efecto sobre el material nuclear de neutrófilos de donadores sanos o neutrófilos autólogos. **Resultados:** Se corroboró que el suero de personas sanas no modifica la morfología nuclear de los neutrófilos, los neutrófilos de pacientes con COVID-19 muestran modificaciones en la morfología nuclear después de 30 min de adherencia y el suero de pacientes con COVID-19 altera la morfología de los neutrófilos de donadores sanos lo que se refleja en el aumento del área nuclear y en el porcentaje de NETs. Aunque la severidad no conlleva necesariamente a una diferencia estadísticamente significativa en dichos cambios. Además, el suero de pacientes con COVID-19 provoca mayoritariamente NETosis diferenciándose del efecto del suero de pacientes con tuberculosis pulmonar activa que provoca en su mayoría descondensación de la cromatina. **Conclusiones:** Los neutrófilos de los pacientes con COVID-19 circulan en un estado de preactivación y mediante el análisis de los cambios en la morfología nuclear no es posible diferenciar entre los estadios de severo o moderado, además el fenómeno predominante en los neutrófilos de donadores sanos estimulados con suero de pacientes COVID-19 es la NETosis, diferenciándose claramente de la descondensación de la cromatina que el suero de pacientes con tuberculosis pulmonar activa provoca.

Palabras clave: COVID-19, SARS-CoV-2, neutrófilos, NETs, suero.



SALUD
SECRETARÍA DE SALUD



ANTECEDENTES

En diciembre de 2019 en la provincia de Wuhan, China se detectaron extraños casos de una infección respiratoria aguda de alta propagación y vertiginosa evolución clínica que resultaba en una elevada mortalidad (1), el 13 de enero de 2020 se presentaron fuera de China los primeros casos. Para el 11 de marzo la Organización Mundial de la Salud (OMS) declaró un estado de pandemia debido al número tan alto de casos, la población mundial entro en emergencia sanitaria, mientras tanto la comunidad científica internacional iniciaba un proceso de investigación acelerada sin precedentes sobre el agente etiológico de la enfermedad, la patología y el cuadro clínico; se logró identificar que se trataba de un coronavirus (SARS-CoV-2) de alta virulencia, la enfermedad desarrollada por este virus recibió el nombre de COVID-19 (2).

Etiología

El agente causal de COVID-19 como se menciona es SARS-CoV-2 (Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2) un virus de ARN monocatenario positivo y envuelto, perteneciente a la familia *Coronaviridae*, subfamilia *Coronavirinae* y género β -coronavirus, el genoma de este coronavirus es de alrededor de 30 kilobases de longitud (3), se caracteriza por la presencia de la glicoproteína transmembranaria S que forma homotrimeros, y a la cual debe el nombre de "coronavirus" por la distribución a manera de corona en la cápside, la glicoproteína S es reconocidos por el receptor para Enzima Convertido de Angiotensina 2 (ACE 2) distribuido ubicuamente en varios órganos humanos (4).

De acuerdo con los análisis del genoma el virus llego al humano mediante una zoonosis, muy probablemente se transmitió del murciélago al pangolín y de este hospedero intermediario al humano (5), a través del tiempo los humanos hemos tenido contacto con otros coronavirus, tales como MERS-CoV (Síndrome Respiratorio de Oriente Medio por Coronavirus) con letalidad mayor pero con capacidad disminuida de propagación y SARS-CoV (6).

En gran medida SARS-CoV-2 puede deber su elevado potencial de transmisión a que el pico de carga viral se da en la primera semana de infección y no coincide estrictamente con la presencia de síntomas claros de la patología, a esto se le conoce como transmisión pre sintomática (7,8).



SALUD
SECRETARÍA DE SALUD



HOSPITAL
GENERAL
de MÉXICO

DR. EDUARDO LICEAGA

Patología

La transmisión de SARS-CoV-2 se da de individuo a individuo a través de las microgotas expulsadas por las personas hospederas del virus al toser, hablar o estornudar, y su posterior inhalación por individuos sanos (9), después de un periodo de incubación se infecta el tracto respiratorio superior, permitiendo al virus continuar la infección por las vías respiratorias; además de esta vía de contagio hay estudios que demuestran la capacidad de SARS-CoV-2 para infectar la mucosa conjuntival, colocándola como otra posible ventana de entrada al hospedero (10). Se ha propuesto la transmisión mediante fómites, ya que SARS-CoV-2 permanece viable en superficies como acero inoxidable, plástico y vidrio a temperatura y humedad baja (11).

El riesgo de contraer la infección estriba en distintos factores, principalmente la distancia y el tiempo de exposición al foco de infección esto tomando en cuenta la transmisión mediante microgotas, las comorbilidades juegan un papel importante en determinar el curso de la enfermedad (12).

La entrada del virus hacia las células depende de la subunidad S1 de la glicoproteína S que se une al receptor para ACE-2 el cual media la fusión de la membrana viral y celular, permitiendo la entrada del virus a las células, mientras que la subunidad S2 se ha colocado como el principal blanco antiviral (13,14). El receptor para ACE-2 se expresa abundantemente en las células del epitelio respiratorio, en específico las células del epitelio alveolar de tipo II, aunque tiene una distribución ubicua (esófago superior, íleon, riñón, vejiga y miocardio), la distribución tan amplia del receptor se asocia con la capacidad del virus para causar daño multiorgánico (15). La disfunción orgánica se explica además por la lesión isquémica y la desregulación del sistema inmune (16).

Podemos dividir la infección por SARS-CoV-2 en dos etapas desde el punto de vista patológico: la primera consiste en una fase temprana correspondiente a la replicación viral con daño al tejido causado directamente por el virus y un estadio tardío en la cual el sistema inmune del hospedero recluta neutrófilos, monocitos y linfocitos hacia el sitio de infección primaria, estos leucocitos a su vez liberan citocinas proinflamatorias como TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12 e IFN- γ que promueven una mayor inflamación local y sistémica (17), en los casos de



SALUD
SECRETARÍA DE SALUD



COVID-19 severo se ha descrito la activación descontrolada del sistema inmune llevando a una tormenta de citocinas que en los casos más fatídicos culmina en sepsis (18,19).

Cuadro clínico

El cuadro clínico sugestivo de COVID-19 tiene una presentación heterogénea, los síntomas pueden manifestarse en la primera semana de infección, aunque regularmente son evidentes después de la primera semana posterior al contagio, primariamente se caracteriza por: fiebre (del 8% al 99%), tos (del 59% al 82%), fatiga (del 44% al 70%), anorexia (del 40% al 84%), dificultad para respirar (del 31% al 40%) y mialgias (del 11% al 35%). También han sido notificado otros síntomas inespecíficos, como dolor de garganta, congestión nasal, dolor de cabeza, diarrea, náusea y vómitos; en niños principalmente hay reportes de algunos síntomas gastrointestinales e infección asintomática (20,21).

La infección severa se desarrolla en el 75 % de los casos, evolucionando generalmente hacia neumonía en la segunda o tercera semana de infección, los síntomas presentes en la neumonía son: fiebre, tos, disnea, taquipnea, y en algunos casos evoluciona hasta neumonía grave, incluida una disminución en la saturación de oxígeno (22). Los signos clínicos de la neumonía grave incluyen fiebre, tos, disnea, taquipnea y más 1 de los siguientes:

- Frecuencia respiratoria superior a 30 respiraciones por minuto.
- Dificultad respiratoria grave.
- SpO2 inferior al 90% con aire ambiente.

Aunque el diagnóstico puede ser clínico, las imágenes de tórax (radiografía, tomografía computarizada o ecografía) ayudan al diagnóstico, además permiten identificar o excluir complicaciones pulmonares, siendo las opacidades en vidrio esmerilado (OVE) las manifestaciones radiológicas más frecuentes del COVID-19, las OVE con engrosamiento intersticial reticular en la tomografía computarizada se asocian a DAD de fase media y el patrón de consolidación se relaciona con DAD de fase tardía (23). Mientras que el DAD avanza los pacientes se alejan de la recuperación y las características se acercan más al SDRA (Síndrome de Dificultad Respiratoria Aguda) que se clasifica:



SALUD
SECRETARÍA DE SALUD

 HOSPITAL
GENERAL
de MÉXICO
DR. EDUARDO LICEAGA

- SDRA leve: 200 a 300 mmHg de PaO₂/FiO₂ (con Presión positiva al final de la expiración (PEEP) o Presión positiva continua en la vía aérea (CPAP) de 5 cmH₂O o más).
- SDRA moderado: 100 a 200 mmHg de PaO₂/FiO₂ (con PEEP de 5 cmH₂O o más).
- SDRA grave: < 100 mmHg de PaO₂/FiO₂(con PEEP de 5 cmH₂O o más).

Ya se mencionó que SARS-CoV-2 es una infección viral de distribución sistémica, si bien el blanco principal son las vías respiratorias y de hecho las lesiones pulmonares agudas acompañadas de coagulopatía son la principal causa de muerte en los pacientes con COVID-19 grave. Tomando en cuenta las alteraciones pulmonares y la hipoxemia progresiva causadas es posible dividir el daño pulmonar en las siguientes etapas morfológicas (23):

1. Etapa temprana con edema, daño epitelial incipiente, capilaritis y endotelitis (0-1 días).
2. Etapa de daño alveolar difuso exudativo (DAD) (1-7 días).
3. Etapa de organización (1-varias semanas).
4. Etapa fibrótica del DAD (semanas-meses).



SALUD
SECRETARÍA DE SALUD



Epidemiología

De acuerdo con el *COVID-19 Map - Johns Hopkins Coronavirus Resource Center*, desde el inicio de la pandemia al 30 de junio de 2022 se estiman 546,785,542 casos de COVID-19 a nivel mundial y con un total de 6,334,456 muertes. La región de las Américas fue sacudida con la misma severidad que el resto del mundo, reportándose al 28 de junio de 2022, un aproximado de 162,418,958 casos acumulados y un estimado de 2,759,793 muertes (25).

Para México el panorama fue crítico, estimándose al 28 de junio de 2022 en total 6,279,487 de casos y 339,622 defunciones. Como es de notarse se trata de una epidemia que ha provocado una alta tasa de contagios y elevada mortalidad en la población mundial (26).

Estadísticamente se estima que el 40% de las personas infectadas con COVID-19 lo cursarán como asintomáticas; mientras que del 60 % de los pacientes sintomáticos el 20% serán hospitalizados, y de ellos solamente 15-30% necesitarán cuidados intensivos (23), lo cual influyó en el colapso de los sistemas de salud que en determinado momento se vieron rebasados por el número de pacientes internados.

Evolución de la pandemia

A raíz de este fenómeno mundial causado por el SARS-CoV-2 surgieron múltiples aristas de emergencia, una de ellas fue la vacunación considerada como un eslabón crucial en la prevención primaria. En México existe una serie de vacunas aprobadas para uso de emergencia y se enlistan en la Tabla 1.



Tabla 1. Estatus regulatorio de las vacunas contra el SARS-CoV-2 en México. Tomada de *Información de la vacuna – Vacuna Covid*, n.d.

Vacuna (farmacéutica)	Plataforma de diseño	Dosis de esquema completo	Fase de ensayo clínico	Estatus regulatorio en México	Fecha de autorización
BNT162b2 (Pfizer, Inc./BioNTech)	ARN mensajero	2	IV	Autorizada para uso de emergencia	11/12/2020
				Ampliación de uso en niñas y niños de 12 a 17 años	24/06/2021
AZD1222 Covishield (AstraZeneca)	Vector viral no replicante	2	IV	Autorizada para uso de emergencia	04/01/2021
Gam-COVID-Vac (Centro Nacional Gamaleya)	Vector viral no replicante	2	III	Autorizada para uso de emergencia	02/02/2021
CoronaVac (Sinovac Research and Development Co)	Virus inactivado	2	IV	Autorizada para uso de emergencia	09/02/2021
Ad5-nCoV Covidecia (CanSino Biologics Inc)	Vector viral no replicante	1	IV	Autorizada para uso de emergencia	09/02/2021
BBV152 Covaxin (Bharat Biotech International Limited)	Virus inactivado	2	III	Autorizada para uso de emergencia	06/04/2021
Ad26.COV2-S (Janssen-Cilag)	Vector viral no replicante	1	III	Autorizada para uso de emergencia	27/05/2021

La vacunación inicio a finales del año 2020, primero para personal de salud de primera línea seguido por el resto del equipo de salud y los grupos etarios más vulnerable entre ellos los adultos de más de 60 años, seguido de aquellas personas con comorbilidades y finalmente la población restante (28). La vacunación redujo la mortalidad hasta en un 90% y también los casos severos, tras múltiples ensayos clínicos a finales del 2021 se inició la aplicación de una dosis de refuerzo (tercera dosis) y la combinación de diferentes vacunas para este refuerzo (29).

Los principales tratamientos para el tratamiento de la infección por SARS-CoV-2 son la inmunomodulación, la anticoagulación, antiinflamatorios esteroideos y el soporte ventilatorio mecánico (23).



Neutrófilos

Los neutrófilos comprenden la población de leucocitos más abundante en circulación, además de ser la primera línea de defensa forman la conexión entre la respuesta inmune innata con la respuesta inmune adaptativa (30), se consideran células de vida media muy corta, aunque recientemente se ha demostrado que son capaces de sobrevivir por periodos de hasta 5.4 días, cambiando totalmente la idea que se tenía de esta estirpe (31), han sido descrito distintos fenotipos en los neutrófilos mostrando que se trata de una población heterogénea, inclusive funcionalmente (32).

Dentro de las principales funciones que desempeñan los neutrófilos se encuentra la fagocitosis y la desgranulación, durante la fagocitosis se producen especies reactivas de oxígeno (ROS) mediante la NADPH oxidasa 2 (NOX 2) que se sitúa estratégicamente en el fagosoma, liberando el peróxido de hidrógeno y superóxido dentro del fagosoma (33).

También como una función primordial de los neutrófilos se encuentra la producción de Trampas Extracelulares de Neutrófilo lo que se denomina como NETosis, este fenómeno consiste en la liberación de la cromatina, histonas, mieloperoxidasa, elastasa de neutrófilo, entre otras proteínas granulares hacia el espacio extracelular en respuesta a distintos estímulos como pueden ser microorganismos y estímulos inflamatorios, debido al alto contenido de DNA expulsado se forma una especie de red, que permite mantener atrapados a los microorganismos y también a las demás moléculas liberadas desde el citosol, se ha propuesto que este mecanismo funciona como mediador de la activación del sistema de coagulación, conocido actualmente como inmunotrombosis (34–36).

Actualmente se reconocen dos tipos de NETosis: la lítica y la vital, los estímulos pueden ser de origen diferente, pero ambas comparten los mecanismos iniciales de activación del neutrófilo, en la NETosis no hay activación de caspasas, ni fragmentación del ADN como ocurre en la apoptosis, además la ruptura de la envoltura nuclear ocurre al inicio del proceso y no en etapas tardías lo que diferencia este proceso de la necrosis (37).

Neutrófilos en COVID-19

Se está realizando una cantidad significativa de ensayos clínicos para evaluar posibles terapias dirigidas a los neutrófilos en COVID-19 esto ya que se ven involucrados como en otras



SALUD
SECRETARÍA DE SALUD

 HOSPITAL
GENERAL
de MÉXICO
DR. EDUARDO LICEAGA

enfermedades respiratorias en la inflamación exacerbada (38). Se sabe que la NETosis intravascular en la infección por COVID-19 podría desempeñar un papel importante en las complicaciones de la vasculatura, donde la enfermedad trombótica provoca daños en los órganos (39).

Aunque no hay evidencia de que los virus puedan usar los neutrófilos para establecer infecciones productivas, varios virus han sido detectados dentro de los neutrófilos, estando en posibilidades incluso de activar a los neutrófilos hasta la producción de NETs (40). Sin embargo, los mecanismos exactos subyacentes a este fenómeno no están completamente caracterizados, este proceso ocurre muy probablemente mediante los Receptores de Reconocimiento de Patrones (PRR) presentes en los endosomas o en la superficie de los neutrófilos (41).

Referente al efecto que el suero tiene sobre los neutrófilos hay poca información, en específico existen reportes sobre el efecto del suero de pacientes con tuberculosis pulmonar activa sobre los neutrófilos de donadores sanos, donde se ha observado que induce la producción de NETs y además modifica las propiedades inmediatas del neutrófilo como la producción de ROS y actividad fagocítica (42,43)



SALUD
SECRETARÍA DE SALUD



PLANTEAMIENTO

El COVID-19 desato una emergencia sanitaria global, se trata de una enfermedad infecciosa altamente contagiosa y con un cuadro clínico complejo, en el 10-15 % de los casos lleva a desarrollar síndrome de dificultad respiratoria aguda (ARDS), resultando en estadios clínicos difíciles de controlar, trayendo un aumento en la mortalidad.

Los pacientes presentan múltiples afecciones: inflamación pulmonar con daño, niveles séricos de citocinas inflamatorias elevados, micro trombosis, entre otras. Para entender la patología es crucial conocer el papel de las células del sistema inmune, entre ellas los neutrófilos son la población más abundante en circulación, desempeñando funciones muy importantes entre las que destaca la producción de trampas extracelulares de neutrófilo (NETs), se ha demostrado que la neutrofilia está asociada a una mayor severidad de la enfermedad por SARS-CoV-2. En algunas otras enfermedades las NETs han sido asociadas al daño de los órganos y en este caso podrían tener relación con la severidad del COVID-19.

Conocer las modificaciones morfológico-nucleares que los neutrófilos de pacientes con COVID-19 severo y moderado presentan nos dará una idea de cómo se encuentran estas células en circulación, además, observar el efecto del suero de pacientes con COVID-19 severo y moderado causa en neutrófilos de donadores sanos permitirá identificar si los componentes presentes en el suero influyen en estos cambios morfológico-nucleares ed los neutrófilos.

¿Cómo modifica el suero de los pacientes con COVID-19 severo y moderado la morfología nuclear de los neutrófilos de donadores sanos?



SALUD
SECRETARÍA DE SALUD

 HOSPITAL
GENERAL
de MÉXICO
DR. EDUARDO LICEAGA

JUSTIFICACIÓN

Durante la pandemia el conocimiento de la inmunopatología del COVID-19 creció de manera exponencial en un corto tiempo, dada la emergencia sanitaria que causó, aunque esta patología comienza una fase de control sigue siendo trascendental conocer el papel que las células de la respuesta inmune desempeñan. Realizar este proyecto permite al Hospital General de México Dr. Eduardo Liceaga continuar contribuyendo al conocimiento de esta patología que ha sido de gran importancia mundial.

Los neutrófilos destacan por ser la primera estirpe celular en reclutarse desde el torrente sanguíneo lugar donde son predominantes hacia el sitio de infección, por lo tanto, comprender de manera sistémica su comportamiento es sumamente importante en la infección por SARS-CoV-2. El suero es un fluido sistémico que al igual que los neutrófilos circulantes se encuentra en el torrente sanguíneo, probablemente los neutrófilos estén siendo activados desde este punto lo cual favorezca una respuesta más efectiva o intensa a la infección. En la tuberculosis pulmonar activa ya se ha estudiado el efecto del suero y se ha observado que tiene la capacidad de inducir modificaciones morfológico-funcionales en los neutrófilos.

HIPOTESIS

Los neutrófilos de pacientes con COVID-19 severo y moderado tienen alteraciones morfológico-nucleares que se manifiestan desde la adherencia y el suero de estos mismos pacientes es capaz de alterar diferencialmente la morfología nuclear de los neutrófilos de donadores sanos.



SALUD
SECRETARÍA DE SALUD



OBJETIVOS

Objetivo general

Describir las modificaciones en la morfología nuclear que los neutrófilos de pacientes con COVID-19 presentan y como los neutrófilos de donadores sanos responden a la incubación con suero de pacientes con COVID-19.

Objetivos específicos

- Analizar las alteraciones de los neutrófilos de pacientes con COVID-19 severo y moderado después de la adherencia..
- Analizar las modificaciones morfológico-nucleares en los neutrófilos de donadores sanos al ser estimulados con el suero de pacientes con COVID-19 severo y moderado.
- Comparar los cambios morfológicos nucleares que induce el suero de pacientes COVID-19 y el suero de pacientes con tuberculosis pulmonar activa.
- Relacionar el estado clínico de los pacientes con COVID-19 con los cambios en la morfología nuclear de sus neutrófilos y los que induce el suero sobre neutrófilos de donadores sanos.





SALUD
SECRETARÍA DE SALUD



HOSPITAL
GENERAL
de MÉXICO

DR. EDUARDO LICEAGA

METODOLOGÍA

TIPO DE ESTUDIO

El presente trabajo consiste en.

POBLACIÓN

La información de los expedientes de los pacientes con COVID-19 o tuberculosis que sean incluidos en el estudio será tomada de la base de datos del Hospital General de México “Dr. Eduardo Liceaga”. Los sueros de pacientes con tuberculosis fueron tomados de alícuotas conservadas a -70 °C recolectadas previamente a la pandemia. Mientras que la sangre periférica de personas sanas provino de banco de sangre directamente.

TAMAÑO DE LA MUESTRA

Se hará un muestre por conveniencia, en la que se incluirán a los pacientes que hayan sido ingresados en el periodo de marzo del 2021 a la fecha en la unidad de Neumología y Cirugía de Tórax por COVID-19. Los sueros de pacientes con tuberculosis que cumplan con los criterios de inclusión serán tomadas de la colección ya antes descrita.

El número de muestras no cumplirá con los criterios de una distribución normal ya que estará determinado por la capacidad de muestras que fue posible recuperar en los tiempos establecidos del cronograma de actividades, por lo cual el análisis estadístico se hará con pruebas no paramétricas.

CRITERIOS DE INCLUSIÓN, NO INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN

Se excluyeron de este protocolo todas aquellas muestras escasas, lipémicas o hemolizadas, así como las muestras con el historial clínico incompleto. En la tabla 2 se presentan los criterios de inclusión y no inclusión.



Tabla 2. Criterios de inclusión y no inclusión.

Pacientes con COVID-19	
Inclusión	No inclusión
<ul style="list-style-type: none">• Adultos mayores de 18 años.• Ambos sexos.• Diagnosticados por PCR para COVID-19.	<ul style="list-style-type: none">• Diagnosticados con VIH.• Con enfermedades autoinmunes.
Pacientes con Tuberculosis	
Inclusión	No inclusión
<ul style="list-style-type: none">• Adultos mayores de 18 años.• Ambos sexos.• Diagnosticados con tuberculosis por PCR y baciloscopia.	<ul style="list-style-type: none">• Diagnosticados con VIH.• Con enfermedades autoinmunes.• Con enfermedades crónicas distintas a tuberculosis.
Personas Sanas (Banco de sangre)	
Inclusión	No inclusión
<ul style="list-style-type: none">• Adultos mayores de 18 años.• Ambos sexos.• Clínicamente sanos al momento de la toma de muestra.	<ul style="list-style-type: none">• Diagnosticados con VIH.• Con enfermedades autoinmunes.





DEFINICIÓN DE LAS VARIABLES

Tabla 3. Operacionalización de las variables. No aplica (NA)

Variable	Definición Operacional	Tipo de Variable	Valores
COVID-19 severo	Se define como Signos clínicos de neumonía (fiebre, tos, disnea, respiración rápida) más 1 de los siguientes: - Frecuencia respiratoria superior a 30 respiraciones por minuto. - Dificultad respiratoria grave. - SpO2 < 90% al aire ambiente	Cualitativa	NA
COVID-19 moderado	Se define como Signos clínicos de neumonía (fiebre, tos, disnea, respiración rápida) sin signos de neumonía grave, incluida una SpO2 ≥ 90% al aire ambiente.	Cualitativa	NA
Tuberculosis pulmonar activa	Enfermedad causada por <i>M. tuberculosis</i> que daña a los pulmones de la cual ya fue descrito el efecto del suero sobre los neutrófilos.	Cualitativa	NA
Tamaño del núcleo	Área de los núcleos medida con el software Image J	Cuantitativa	Pixeles ²



Porcentaje de células	Del total de células por campo se cuentan aquellas que presenten determinada característica.	Cuantitativa	Porcentaje (%)
NETosis	Liberación de todo el material nuclear en trampas extracelulares de neutrófilo.	Cualitativa	NA
Descondensación de la cromatina	Aumento en el tamaño del núcleo por la descompactación de la cromatina.	Cualitativa	NA





PROCEDIMIENTOS

Obtención de sueros y neutrófilos.

Con la finalidad de aprovechar al máximo las muestras de los pacientes, para del mismo tubo separar el suero y los neutrófilos, se tomó la muestra de sangre periférica en tubos Vacutainer con EDTA de individuos de los tres grupos de estudio (COVID-19, tuberculosis y sanos) que cumplieron los criterios de inclusión y no inclusión propuestos en la Tabla 1. Inicialmente la muestra se centrifugó a 1500 rpm durante 10 min, separándose en la parte superior del tubo el plasma y en la parte inferior el paquete celular.

El plasma fue recuperado cuantitativamente en tubos cónicos de 15 ml, por cada mililitro de plasma se le adicionaron 10 μ l de una solución de CaCl_2 2.5 M se dejó en refrigeración durante 4 horas, después de este periodo se centrifugó a 3000 rpm por 5 min para separar la fibrina del suero, con precaución se retiró la fracción de suero resultante y se conservó a -20 °C en alícuotas de 100 μ l debidamente etiquetadas hasta su uso, hacer alícuotas de este volumen evitó el uso de muestras con más de un ciclo de congelación.

El paquete celular fue homogenizado para transferir 2 ml sobre un volumen igual de Polymorphprep cuidando que se mantengan los estratos, posteriormente se centrifugó a 1500 rpm durante 60 min a 25 °C. Mediante este gradiente de densidad es posible obtener una capa rica en neutrófilos que se recuperó en tubos cónicos de 15 ml usando una pipeta de transferencia, se agregó cbp 12 ml de PBS-G, se centrifugó a 1200 rpm durante 5 min a 25 °C, se decantó evitando llevarse el paquete celular y se repitió el lavado. Después de lavar el botón celular fue resuspendido en un volumen final de 1 ml, los neutrófilos se contaron usando la cámara de Neubauer y una suspensión diluida 1:10 con líquido de Turk, finalmente se ajustó con PBS-G la suspensión original para tener una concentración de 1×10^6 Neu/ml la cual será usada en los experimentos posteriores.

En el caso de los neutrófilos de personas sanas sobre los que se probó el efecto de los sueros fueron separados por este mismo protocolo, pero directamente de la sangre completa que se obtiene en los tubos para Vacutainer con EDTA.



Monocapa de neutrófilos sin estímulo

En portaobjetos con 3 pozos esterilizados en cajas de Petri se colocaron 40 μl de la suspensión de neutrófilos a 1×10^6 Neu/ml de los pacientes con COVID-19 por triplicado en cada portaobjeto y de personas sanas en otro portaobjeto, de modo que cada pozo contenía 40,000 Neu, un pozo con células de donador sano fue estimulado con 5 μl de PMA como control positivo de la producción de NETs. Los neutrófilos ya colocados en los portaobjetos fueron incubados por un lapso de 4 horas a $37^\circ\text{C} / 5\% \text{CO}_2$, pasada la incubación se retiró cuidadosamente el sobrenadante con una jeringa para evitar llevarse la monocapa y se agregaron 100 μl de para formaldehído al 2 % en PBS durante 5 min para fijar las células, transcurrido este periodo se lavó por inmersión en un vaso Coplin con agua.

Monocapa de neutrófilos sanos estimulada con sueros

Usando portaobjetos con 3 pozos esterilizados en cajas de Petri se adicionaron 40 μl de la suspensión de neutrófilos de personas sanas a 1×10^6 Neu/ml, se permitió la adherencia de los neutrófilos durante 30 min, posteriormente se les retiro el sobrenadante cuidadosamente para ser sustituido por 40 μl del suero de pacientes con COVID-19, pacientes con tuberculosis o donadores sanos, como control positivo de producción de NETs en el suero de algunos donadores sanos se agregaron 5 μl de PMA, una vez colocado el suero sobre las monocapas de neutrófilos fueron incubados a $37^\circ\text{C} / 5\% \text{CO}_2$ durante un periodo de 4 horas, pasada la incubación se retiró con cautelosamente el sobrenadante evitando llevarse la monocapa y se agregaron 100 μl de para formaldehído al 2 % en PBS durante 5 min para fijar los neutrófilos, pasado este periodo se lavó por inmersión en un vaso Coplin con agua.

Tinción de monocapas

Las monocapas se tiñeron con 100 μl por pozo del colorante de Hoechst 33258 (excitación: 352 nm y emisión: 461 nm) diluido 1:1000 en PBSSG durante 2 min (el colorante de Hoechst es permeable a la célula y permite teñir el DNA). El análisis de las monocapas se realizó por



SALUD
SECRETARÍA DE SALUD



HOSPITAL
GENERAL
de MÉXICO

DR. EDUARDO LICEAGA

microscopía de fluorescencia buscando cambios en la morfología nuclear de los neutrófilos. Las imágenes se analizaron empleando el software Image J.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se aplicará estadística descriptiva usando la media y desviación estándar, se iniciará con la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk, a los datos que se ajusten a una distribución normal se les aplicará la prueba t de Student, cuando no entren en una distribución normal se aplicará una prueba de ANOVA de una vía y posteriormente la prueba de Dunn. El valor para determinar la presencia de diferencia estadísticamente significativa será $p < 0.05$.

ASPECTOS ETICOS Y DE BIOSEGURIDAD

Este proyecto fue aprobado por el Comité de Ética en Investigación (CEI) del Hospital General de México "Dr. Eduardo Liceaga" (HGM) (DI/18/406/05/100), se realizó con estricto apego a la Norma Oficial Mexicana NOM-006-SSA2-2013 y a los principios de la Declaración de Helsinki (World Medical Association, 2013). Se tomarán las muestras de pacientes que den el debido consentimiento informado para el protocolo.





SALUD
SECRETARÍA DE SALUD



HOSPITAL
GENERAL
de MÉXICO

DR. EDUARDO LICEAGA

RELEVANCIA Y EXPECTATIVAS

Es importante conocer el estado de los neutrófilos en la inmunopatología del COVID-19 y como parte sumamente innovadora se observará el efecto que el suero de estos pacientes tiene sobre los neutrófilos de donadores sanos, además de comparar dichos cambios con los provocados por el suero de pacientes con tuberculosis pulmonar activa, este protocolo servirá de Tesis para obtener el grado de Especialista en Medicina en el Área de Neumología y Cirugía de Tórax del Hospital General de México.

RECUROS DISPONIBLES

Humanos:

1 medico adscrito al servicio de Neumología y Cirugía de Tórax.

1 médico residente de Neumología.

Materiales:

Unidad hospitalaria de tercer nivel, Servicio de Endocrinología del Hospital General de México “Dr. Eduardo Liceaga”. Equipos de laboratorio y de microscopia de fluorescencia.

1 computadora MacBook Air con Image J, Graphpad Prism y paquetería básica de Office.

Financieros:

Propios de la institución.

RECURSOS NECESARIOS

Los disponibles en el Hospital General de México “Dr. Eduardo Liceaga”.





SALUD
SECRETARÍA DE SALUD



RESULTADOS

En la Figura 1 y Figura 2 se presentan neutrófilos de donadores sanos incubados con suero sano y las alteraciones que el suero de pacientes con COVID-19 severo causa sobre la morfología de los neutrófilos de donadores sanos, finalmente las alteraciones que los neutrófilos de sangre periférica de pacientes con COVID-19 tienen después de 30 min de adherencia en presencia de suero autólogo. Mientras las modificaciones que el suero de pacientes con COVID-19 moderado provocan en los neutrófilos de donaros sanos, así como las alteraciones que los neutrófilos de los pacientes con COVID19 moderado presentan desde los 30 min de adherencia se presentan en la Figura 3 y 4.

En los neutrófilos de donadores sanos incubados con el suero de pacientes COVID-19 severo y moderado es evidente que los cambios predominantes son la descondensación de la cromatina y la producción de NETs, aunque a simple vista no es posible observar cambios entre ambos grupos es de resaltarse que para ambos casos los neutrófilos de los pacientes ya vienen en un estado de preactivación que se pone de manifiesto ya que con 30 min de adherencia las células de los pacientes ya tienen un aumento notorio su área nuclear por a descondensación de la cromatina y en algunos casos llegando hasta la producción de NETs.

Empleando el software Image J, se analizó el área nuclear obteniéndose el gráfico presentado en la Figura 5, en el cual se muestran juntos los datos de pacientes COVID-19 moderado y severo, son claras las diferencias en el área nuclear en píxeles^2 entre los neutrófilos incubados con suero de donadores sanos y aquellos incubados en presencia del suero de pacientes COVID-19, así como las células de donadores sanos y las células de pacientes con COVID-19, esto se comprueba por diferencias estadísticamente significativas.



SALUD
SECRETARÍA DE SALUD



Al analizar por separado los moderados y severos se obtiene la Figura 6, en la cual también se obtienen claras diferencias estadísticamente significativas entre los neutrófilos de donadores sanos y aquellos de pacientes con COVID-19, aunque estadísticamente no existe una diferencia entre las áreas nucleares de los neutrófilos de pacientes con COVID-19 moderado y severo.

El porcentaje de NETs que provocan los sueros de pacientes con COVID-19 se presentan en la Figura 7, es claro el porcentaje elevado de NETs en los Neu de donadores sanos estimulados con el suero de pacientes COVID-19, mientras que los sueros de donadores sanos no provocan estas modificaciones en la morfología nuclear de los neutrófilos, y que por sí solos los neutrófilos de pacientes COVID-19 ya están en un estado de preactivación. Al realizar un gráfico del efecto de los sueros de pacientes COVID-19 y relacionarlo con los cambios que por sí solos los neutrófilos del mismo paciente presentan, se observa que aquellos sueros que inducen mayores cambios en los neutrófilos provienen de pacientes en los que sus neutrófilos presentan un menor porcentaje de NETosis, para saber si esto se relaciona con la severidad se analizó por separado a severos y moderados.

La Figura 8 muestra los cambios que el suero de pacientes con COVID-19 severo y moderado provocan en la morfología nuclear de los neutrófilos, aunque no hubo una diferencia estadísticamente significativa entre moderados y severos la tendencia descrita con anterioridad sigue presente en ambos grupos.



CONTROL (NEU)

NEU DONADOR + SUERO COVID19

NEU COVID AUTOLOGOS SIN ESTIMULO

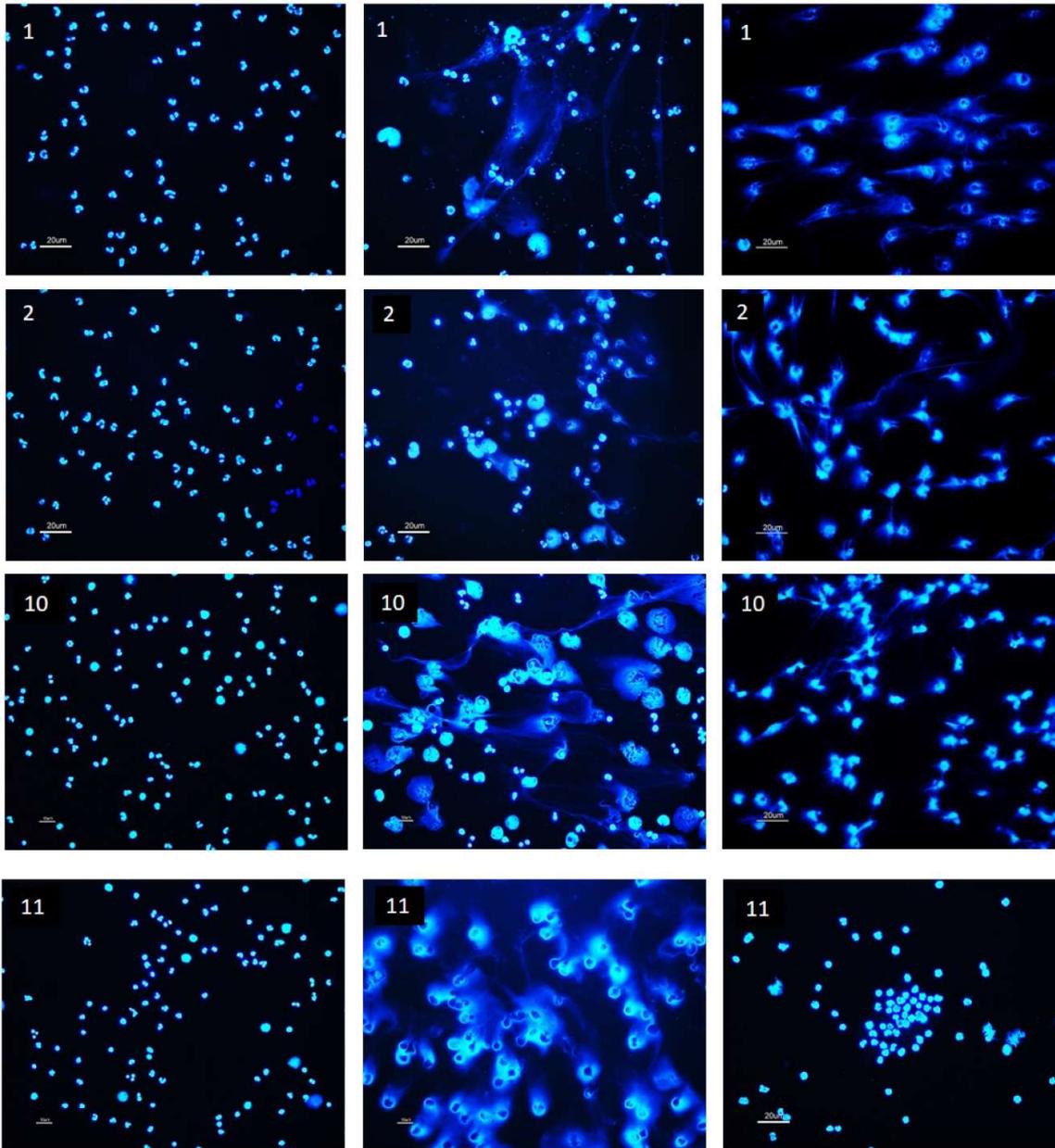


Figura 1.

Micrografía de neutrófilos incubados con suero de pacientes con **COVID-19 severo**. En la primera columna: neutrófilos de donadores sanos incubados 4 horas con suero de donadores sanos, en la segunda columna: neutrófilos de donadores sanos incubados 4 h en presencia de suero de pacientes con COVID-19 severo, en la tercera columna: neutrófilos de pacientes con COVID-19 severo después de 30 min de adherencia en presencia de suero autólogo. Cada fila



representa un conjunto de imágenes provenientes de un experimento independiente con un sujeto distinto. Tinción con Hoechst (40 X).

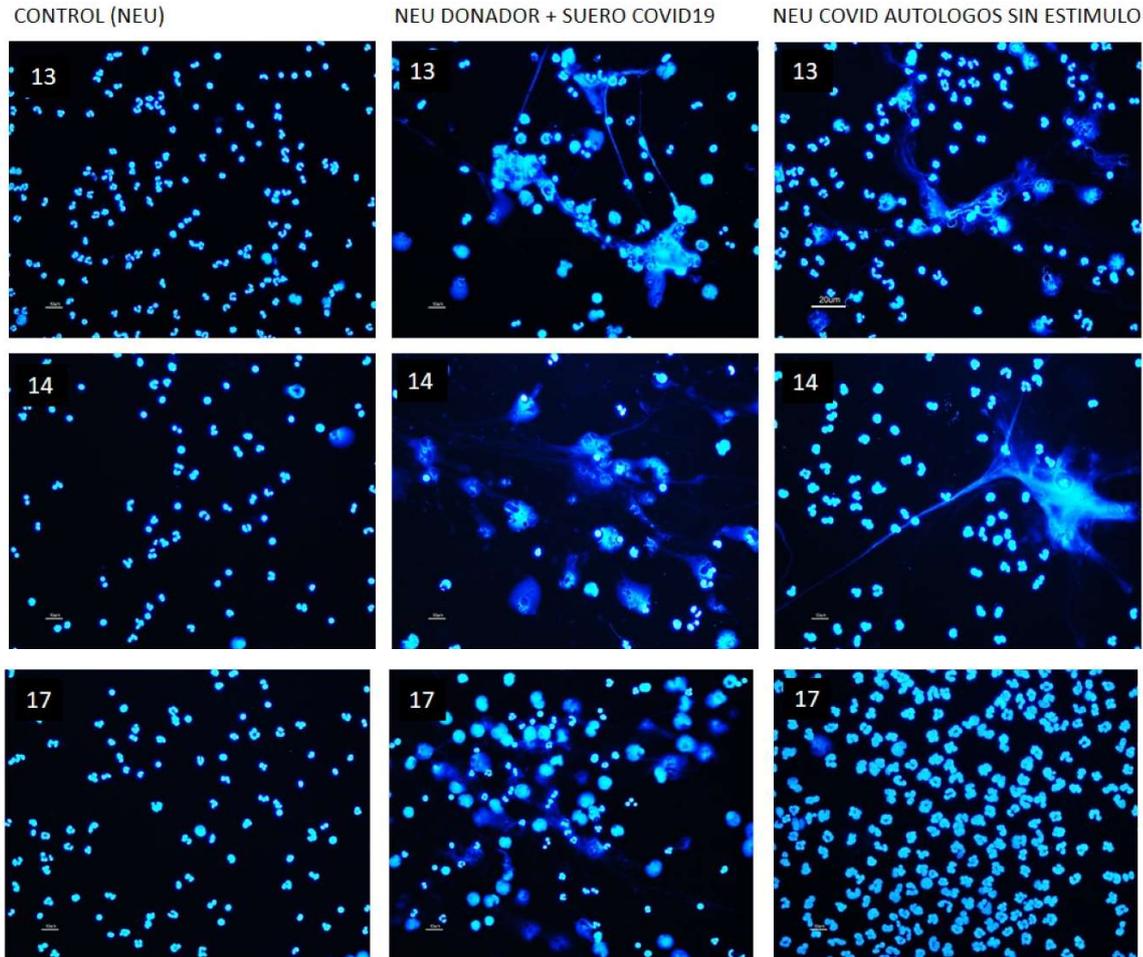


Figura 2.

Micrografía de neutrófilos incubados con suero de pacientes con **COVID-19 severo**. En la primera columna: neutrófilos de donadores sanos incubados 4 horas con suero de donadores sanos, en la segunda columna: neutrófilos de donadores sanos incubados 4 h en presencia de suero de pacientes con COVID-19 severo, en la tercera columna: neutrófilos de pacientes con COVID-19 severo después de 30 min de adherencia en presencia de suero autólogo. Cada fila representa un conjunto de imágenes provenientes de un experimento independiente con un sujeto distinto. Tinción con Hoechst (40 X).

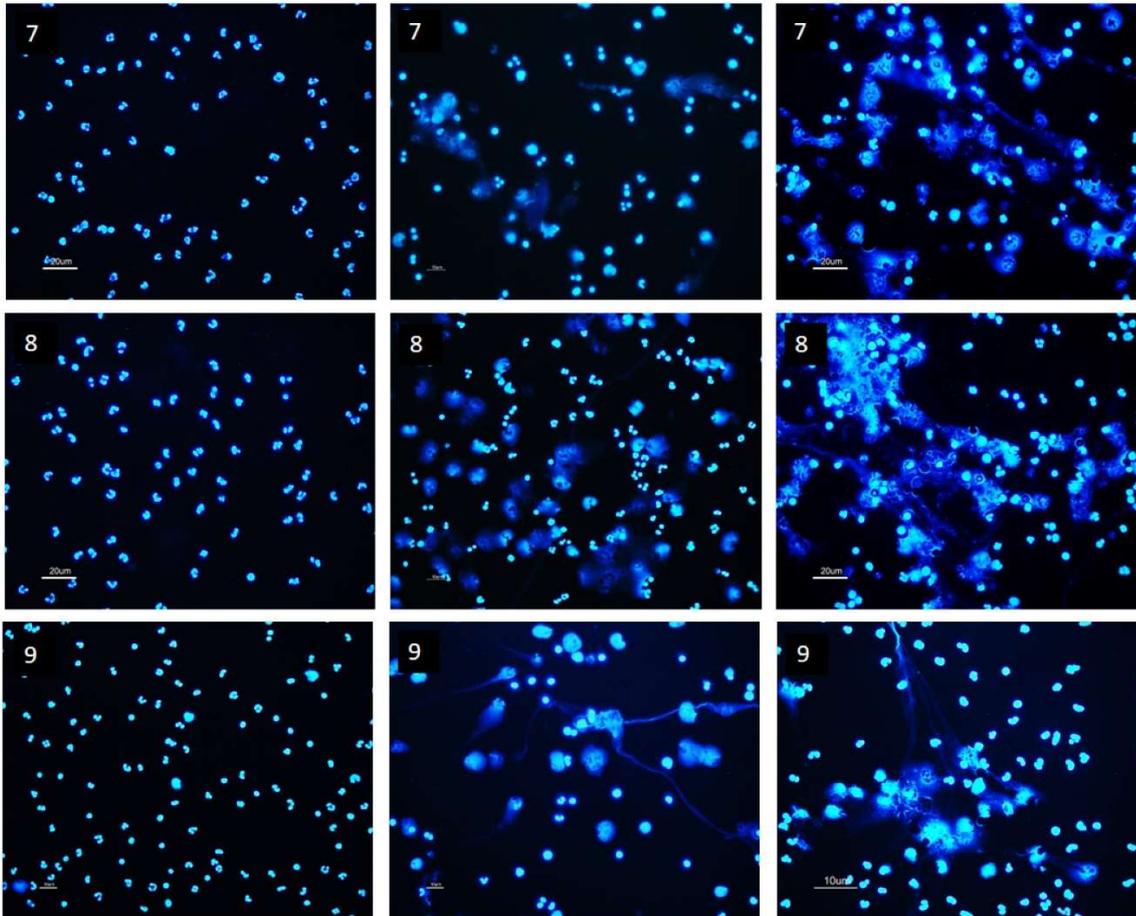


Figura 3 Micrografía de neutrófilos incubados con suero de pacientes con **COVID-19 moderado**. En la primera columna: neutrófilos de donadores sanos incubados 4 horas con suero de donadores sanos, en la segunda columna: neutrófilos de donadores sanos incubados 4 h en presencia de suero de pacientes con COVID-19 moderado, en la tercera columna: neutrófilos de pacientes con COVID-19 moderado después de 30 min de adherencia en presencia de suero autólogo. Cada fila representa un conjunto de imágenes provenientes de un experimento independiente con un sujeto distinto. Tinción con Hoechst (40 X).

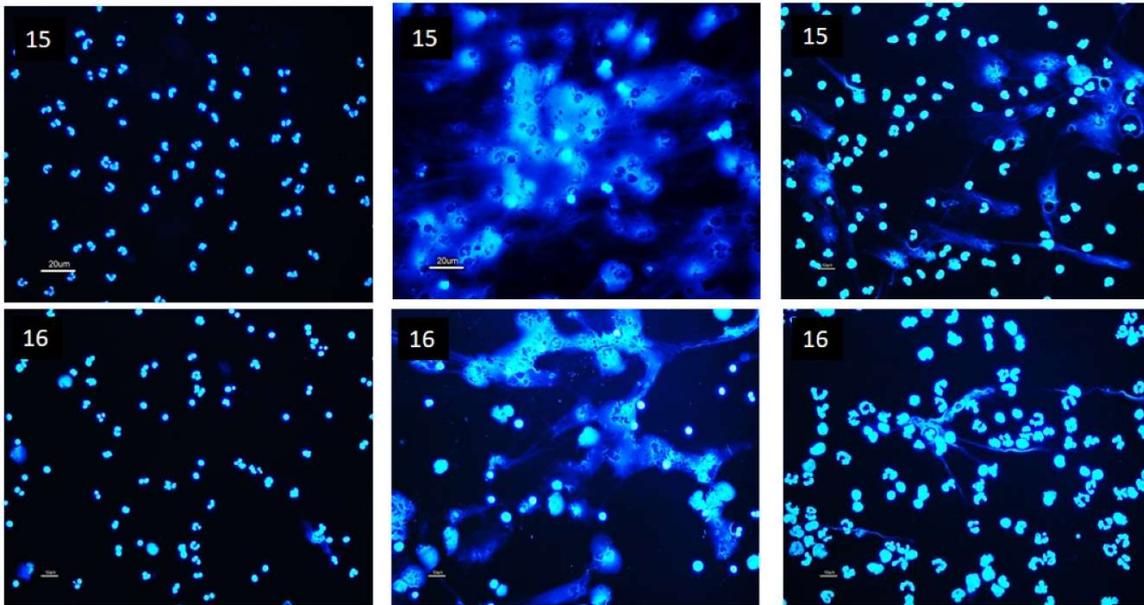


Figura 4. Micrografía de neutrófilos incubados con suero de pacientes con **COVID-19 moderado**. En la primera columna: neutrófilos de donadores sanos incubados 4 horas con suero de donadores sanos, en la segunda columna: neutrófilos de donadores sanos incubados 4 h en presencia de suero de pacientes con COVID-19 moderado, en la tercera columna: neutrófilos de pacientes con COVID-19 moderado después de 30 min de adherencia en presencia de suero autólogo. Cada fila representa un conjunto de imágenes provenientes de un experimento independiente con un sujeto distinto. Tinción con Hoechst (40 X).



SALUD
SECRETARÍA DE SALUD



HOSPITAL
GENERAL
de MÉXICO

DR. EDUARDO LICEAGA

Se comparó el efecto que tiene el suero de pacientes COVID-19 sobre los neutrófilos de donadores sanos con los cambios que provoca el suero de pacientes con tuberculosis pulmonar activa, las imágenes resultantes se muestran en la Figura 9 de manera representativa ya que para ambos casos se analizó un total de 10 sueros distintos. Se observa que ambos grupos de sueros provocan modificaciones nucleares en los neutrófilos, al analizar el área nuclear en píxeles² se obtuvo la Figura 10, es evidente que en los neutrófilos incubados con el suero de pacientes con tuberculosis se encuentra aumentada el área nuclear mientras que en los incubados con el suero de pacientes COVID-19 pareciera estar disminuida, de hecho son diferentes en términos estadísticos, si conjuntamos las imágenes podríamos ver que aunque el área en los tuberculosos está aumentada, en los COVID-19 el área se disminuye porque gran parte de las células tienden a formar NETs y al analizar las imágenes la presencia de NETs no se cuantifican como área nuclear para evitar el fondo.

Sin embargo, se observa que no prevalece el mismo fenómeno para ambos grupos de sueros, por lo cual fue necesario obtener el porcentaje de cada tipo de modificaciones. Entre estos cambios predominantemente estuvo la descondensación de la cromatina que podría ser compatible con el fenómeno de apoptosis temprana y la producción de NETs, en la Figura 11 se presenta el porcentaje de cada uno de estos cambios, al analizar los porcentajes se obtienen diferencias estadísticas entre el porcentaje de NETosis y de descondensación de la cromatina que cada grupo de sueros provoca.

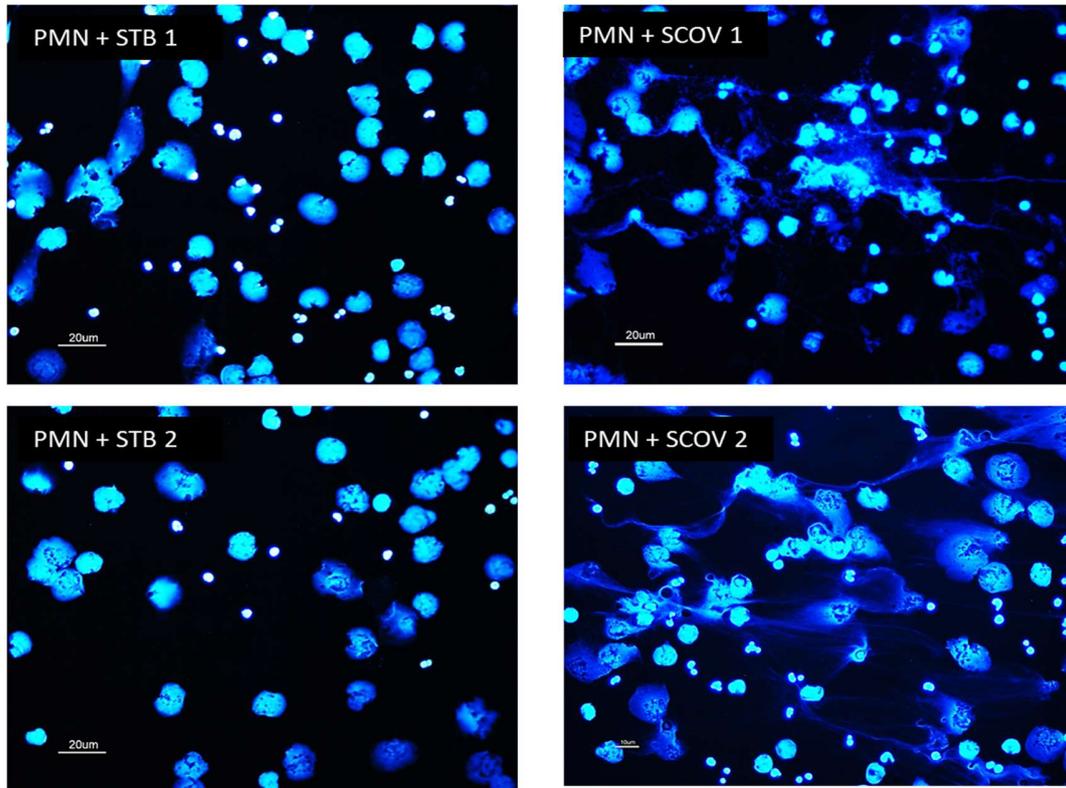


Figura 9. Micrografía de neutrófilos de donadores sanos en presencia del suero de pacientes con COVID-19 (PMN+SCOV) o suero de pacientes con tuberculosis pulmonar activa (PMN+STB). Tinción con Hoechst (40 X).



SALUD
SECRETARÍA DE SALUD

 HOSPITAL
GENERAL
de MÉXICO
DR. EDUARDO LICEAGA

DISCUSIÓN

La pandemia por COVID-19 trajo consigo una suma de esfuerzos de diversas organizaciones gubernamentales y de sector privado para su control, se permitió el acceso libre a información relacionada en los distintos repositorios de investigación, esto con la finalidad de permitir la contención del virus, mediante el desarrollo de una vacuna eficiente y la implementación de tratamientos que permitirán una mejor intervención en el curso de la infección (44).

El Hospital General de México “Dr. Eduardo Liceaga” por su parte formó parte de los principales centros hospitalarios que brindaron atención de primer nivel a ciudadanos que contrajeron la infección por SARS-CoV-2 en estadios moderados y severos, además se realizaron investigaciones en colaboración con diversos centros de investigación que permitieron aportar al desarrollo del conocimiento en los diversos frentes de la pandemia; en este punto destacamos la importancia de la presente investigación que contribuye directamente al conocimiento del papel que desempeñan los neutrófilos circulantes en los pacientes con COVID-19 severo y moderado, a través del análisis de los cambios en la morfología nuclear.

En la literatura hay escasos reportes del efecto que tiene el suero de pacientes con alguna patología sobre los neutrófilos en estudios ex vivo, en uno de ellos se demuestra que el suero de personas sanas, es decir que no cursan con alguna infección, después de ser adicionado a neutrófilos ya adheridos en una superficie de vidrio no provoca cambios en la morfología nuclear del neutrófilo, mientras que el suero de pacientes con tuberculosis pulmonar activa provoca un aumento en tamaño nuclear e incluso en ciertos casos hay presencia de NETs.



SALUD
SECRETARÍA DE SALUD



Lo que observamos fue que el suero de pacientes con COVID-19 inducía un aumento en el área nuclear de los neutrófilos de donadores sanos en comparativa con el nulo efecto que tienen los sueros de donadores sanos sobre la morfología nuclear de los neutrófilos de donadores sanos (Figura 5), además este aumento no fue dependiente del estadio de la enfermedad (Figura 6), al analizar los neutrófilos de los pacientes con COVID-19 después de 30 min de adherencia (Figura 5 y Figura 6), es claro que esta estirpe celular se encuentre en un estado ya alterado, representado por el aumento en el área nuclear, sin embargo no existe una diferencia estadísticamente significativa entre las alteraciones de los neutrófilos de pacientes COVID-19 severos o moderados.

De acuerdo a lo anterior, aunque los pacientes se encuentran en estadios distintos de la infección, los componentes o mediadores involucrados en la preactivación de los neutrófilos circulantes no se ven afectados, lo cual es justificable por los mecanismo inmunológicos que permiten la regulación de la activación celular; ya que si no existiera este control de la activación celular, los neutrófilos en torrente sanguíneo mediante los mecanismos efectores que poseen provocarían un efecto deletéreo lejos de proteger frente a la infección.

Si bien el área nuclear nos permie comparar el grado de alteración que sufren los neutrófilos en su morfología nuclear, al momento de cuantificar el área en píxeles² se excluyen la NETosis ya que por la intensidad de las redes de cromatina liberadas estas no son cuantificadas al momento del análisis, por ello se hizo el conteo del porcentaje de neutrófilos en NETosis (Figura 7 y Figura 8), aunque no fue el único fenómeno presente ya que también se observó en ciertos casos descondensación de la cromatina, picnosis e incluso apoptosis pero en porcentajes sumamente bajos.



SALUD
SECRETARÍA DE SALUD



HOSPITAL
GENERAL
de MÉXICO

DR. EDUARDO LICEAGA

Los neutrófilos de donadores sanos incubados con el suero de donadores sanos no inducía la producción de NETs, por su parte el suero de pacientes COVID-19 severo y moderado inducía la producción de NETs primordialmente, y los neutrófilos de pacientes con COVID-19 severo y moderado desde los 30 min de adherencia también se dirigían hacia NETosis (Figura 7), interesantemente aquellos sueros que inducían porcentajes más elevados de NETosis en los neutrófilos de donadores sanos, sus respectivos neutrófilos de ese paciente después de 30 min de adherencia mostraban menores porcentajes de NETs, por lo cual se procedió a analizar si dependía del estadio del paciente (Figura 9) pero no hubo diferencia estadísticamente significativa y se seguía observando este fenómeno de porcentajes invertidos.

La relación inversa entre el porcentaje de NETs que presentan los neutrófilos de pacientes con COVID-19 en comparativa con las NETs que el suero del mismo paciente provoca sobre sus propios neutrófilos, nos da una idea más cercana a lo que está afrontando el paciente con COVID-19, y aunque no depende del estadio (severo o moderado) podría estar involucrado en los casos de inmunotrombosis. Además refleja que aquellos pacientes en los que se observa una mayor cantidad de NETosis en sus neutrófilos han perdido la capacidad de regular este tipo de muerte celular que exacerba la inflamación, ya que los neutrófilos de donadores sanos con ese mismo suero aún mantienen porcentajes bajos de NETs; paradójicamente se observa que los neutrófilos de pacientes con COVID-19 que muestran menores porcentajes de NETs con suero autólogo, ese mismo suero en neutrófilos de donadores sanos induce una mayor producción de NETs lo cual sugiere que los mecanismos reguladores de la presencia de NETosis en circulación no dependen estrictamente de los componentes presentes en el suero.



SALUD
SECRETARÍA DE SALUD



HOSPITAL
GENERAL
de MÉXICO

DR. EDUARDO LICEAGA

Lo ya mencionado nos lleva a resaltar la importancia de la regulación en los mecanismos efectores de los neutrófilos en la inmunopatología de COVID-19. El daño al tejido en los pacientes con COVID-19 promueve la liberación de sustancias proinflamatorias que se colectan y circulan en el suero de los pacientes, alterando la morfología nuclear de los neutrófilos circulantes y como en el caso de la tuberculosis pulmonar activa afectan también las funciones fagocíticas y microbicidas de los neutrófilos. La presencia persistente de NETs se ha relacionado con autoinmunidades como el lupus eritematoso sistémico y con enfermedad respiratorias, es causa además de trombosis y alteraciones vasculares, destacando la relevancia funcional de los neutrófilos en COVID-19.

Al realizar una comparativa entre los cambios que producen los sueros de pacientes con tuberculosis pulmonar activa contra los que ocasiona el suero de pacientes con COVID-19 se observó que los cambios nucleares fueron similares e incluyeron apoptosis, NETosis, picnosis y descondensación de la cromatina, sin embargo fue muy claro que el porcentaje sugerente de apoptosis predominó en el caso de los sueros de tuberculosis pulmonar activa, mientras las imágenes indicativas de NETosis prevalecieron en el caso de los sueros de los pacientes con COVID-19. Lo anterior es producto inequívoco de la diferencia etiológica de las enfermedades y que los componentes presentes en los sueros de pacientes con tuberculosis pulmonar activa y pacientes con COVID-19 difieren; ya sea por las concentraciones, la presencia o ausencia de cierto componente.





SALUD
SECRETARÍA DE SALUD



HOSPITAL
GENERAL
de MÉXICO

DR. EDUARDO LICEAGA

CONCLUSIONES

- La morfología nuclear de los neutrófilos de pacientes con COVID-19 se encuentre alterada desde la adherencia, lo cual es sugerente de un estado de preactivación en el torrente sanguíneo.
- El suero de pacientes con COVID-19 contiene sustancias que provocan en los neutrófilos de donadores sanos NETosis principalmente y estos cambios podrían estar afectando la funcionalidad de la estirpe celular en los pacientes que cursan la infección.
- El suero de pacientes con COVID-19 contiene sustancias que activan diferencialmente a los neutrófilos de donadores sanos hacia NETosis principalmente, en comparación con el suero de pacientes con tuberculosis pulmonar activa que dirige a los neutrófilos mayoritariamente a la descondensación de la cromatina, impactando directamente en la inmunopatología.
- No es posible establecer mediante los cambios en la morfología nuclear diferencias en el efecto que tiene el suero de pacientes con COVID-19 severo con el suero de pacientes con COVID-19 moderado.



SALUD
SECRETARÍA DE SALUD



HOSPITAL
GENERAL
de MÉXICO

DR. EDUARDO LICEAGA

REFERENCIAS:

1. Zhu N, Zhang D, Wang W, Li X, Yang B, Song J, et al. A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *N Engl J Med* [Internet]. 2020 Feb 20 [cited 2022 Jun 30];382(8):727–33. Available from: <https://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa2001017>
2. Ahsan H, Arif A, Ansari S, Khan FH. The emergence of Covid-19: evolution from endemic to pandemic. <https://doi.org/10.1080/1532181920211991947> [Internet]. 2021 [cited 2022 Jul 13];43(1):22–32. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/15321819.2021.1991947>
3. Li G, Fan Y, Lai Y, Han T, Li Z, Zhou P, et al. Coronavirus infections and immune responses. *J Med Virol* [Internet]. 2020 Apr 1 [cited 2022 Jul 13];92(4):424–32. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31981224/>
4. Velavan TP, Meyer CG. The COVID-19 epidemic. *Trop Med Int Heal*. 2020 Mar 1;25(3):278–80.
5. Andersen KG, Rambaut A, Lipkin WI, Holmes EC, Garry RF. The proximal origin of SARS-CoV-2. *Nat Med* 2020 264 [Internet]. 2020 Mar 17 [cited 2022 Jun 30];26(4):450–2. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41591-020-0820-9>
6. Gorbalenya AE, Baker SC, Baric RS, de Groot RJ, Drosten C, Gulyaeva AA, et al. The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. *Nat Microbiol* 2020 54 [Internet]. 2020 Mar 2 [cited 2022 Jun 30];5(4):536–44. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41564-020-0695-z>
7. Cevik M, Tate M, Lloyd O, Maraolo AE, Schafers J, Ho A. SARS-CoV-2, SARS-CoV, and MERS-CoV viral load dynamics, duration of viral shedding, and infectiousness: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Microbe*. 2021 Jan 1;2(1):e13–22.
8. Buitrago-Garcia D, Egli-Gany D, Counotte MJ, Hossmann S, Imeri H, Ipekci AM, et al. Occurrence and transmission potential of asymptomatic and presymptomatic SARS-CoV-2 infections: A living systematic review and meta-analysis. *PLoS Med* [Internet].





- 2020 Sep 1 [cited 2022 Jul 12];17(9). Available from:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32960881/>
9. Li Q, Guan X, Wu P, Wang X, Zhou L, Tong Y, et al. Early Transmission Dynamics in Wuhan, China, of Novel Coronavirus–Infected Pneumonia. *N Engl J Med* [Internet]. 2020 Mar 26 [cited 2022 Jun 30];382(13):1199–207. Available from:
<https://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa2001316>
 10. Hui KPY, Cheung MC, Perera RAPM, Ng KC, Bui CHT, Ho JCW, et al. Tropism, replication competence, and innate immune responses of the coronavirus SARS-CoV-2 in human respiratory tract and conjunctiva: an analysis in ex-vivo and in-vitro cultures. *Lancet Respir Med* [Internet]. 2020 Jul 1 [cited 2022 Jul 12];8(7):687–95. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32386571/>
 11. van Doremalen N, Bushmaker T, Morris DH, Holbrook MG, Gamble A, Williamson BN, et al. Aerosol and Surface Stability of SARS-CoV-2 as Compared with SARS-CoV-1. *N Engl J Med* [Internet]. 2020 Apr 16 [cited 2022 Jul 12];382(16):1564–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32182409/>
 12. Guallar MP, Meiriño R, Donat-Vargas C, Corral O, Jouvé N, Soriano V. Inoculum at the time of SARS-CoV-2 exposure and risk of disease severity. *Int J Infect Dis* [Internet]. 2020 Aug 1 [cited 2022 Jul 12];97:290–2. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32553720/>
 13. Banerjee S, Wang X, Du S, Zhu C, Jia Y, Wang Y, et al. Comprehensive role of SARS-CoV-2 spike glycoprotein in regulating host signaling pathway. *J Med Virol* [Internet]. 2022 [cited 2022 Jul 12]; Available from:
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jmv.27820>
 14. Shah P, Canziani GA, Carter EP, Chaiken I. The Case for S2: The Potential Benefits of the S2 Subunit of the SARS-CoV-2 Spike Protein as an Immunogen in Fighting the COVID-19 Pandemic. *Front Immunol* [Internet]. 2021 Mar 9 [cited 2022 Jul 12];12. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33767706/>
 15. Xu H, Zhong L, Deng J, Peng J, Dan H, Zeng X, et al. High expression of ACE2



SALUD
SECRETARÍA DE SALUD



HOSPITAL
GENERAL
de MÉXICO

DR. EDUARDO LICEAGA

- receptor of 2019-nCoV on the epithelial cells of oral mucosa. *Int J Oral Sci* [Internet]. 2020 Dec 1 [cited 2022 Jul 13];12(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32094336/>
16. Coopersmith CM, Antonelli M, Bauer SR, Deutschman CS, Evans LE, Ferrer R, et al. The Surviving Sepsis Campaign: Research Priorities for Coronavirus Disease 2019 in Critical Illness. *Crit Care Med* [Internet]. 2021 [cited 2022 Jul 13];49(4):598–622. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33591008/>
 17. Azkur AK, Akdis M, Azkur D, Sokolowska M, van de Veen W, Brügggen MC, et al. Immune response to SARS-CoV-2 and mechanisms of immunopathological changes in COVID-19. *Allergy* [Internet]. 2020 Jul 1 [cited 2022 Jul 13];75(7):1564–81. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32396996/>
 18. Wang J, Jiang M, Chen X, Montaner LJ. Cytokine storm and leukocyte changes in mild versus severe SARS-CoV-2 infection: Review of 3939 COVID-19 patients in China and emerging pathogenesis and therapy concepts. *J Leukoc Biol* [Internet]. 2020 Jul 1 [cited 2022 Jul 13];108(1):17–41. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32534467/>
 19. Koçak Tufan Z, Kayaaslan B, Mer M. COVID-19 and Sepsis. *Turkish J Med Sci* [Internet]. 2021 Dec 17 [cited 2022 Jul 13];51(SI-1):3301–11. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34590796/>
 20. Chan JFW, Yuan S, Kok KH, To KKW, Chu H, Yang J, et al. A familial cluster of pneumonia associated with the 2019 novel coronavirus indicating person-to-person transmission: a study of a family cluster. *Lancet (London, England)* [Internet]. 2020 Feb 15 [cited 2022 Jul 13];395(10223):514–23. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31986261/>
 21. Guan W, Ni Z, Hu Y, Liang W, Ou C, He J, et al. Clinical characteristics of 2019 novel coronavirus infection in China. *medRxiv* [Internet]. 2020 Feb 9 [cited 2022 Jul 13];2020.02.06.20020974. Available from: <https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2020.02.06.20020974v1>
 22. Velavan TP, Meyer CG. The COVID-19 epidemic. *Trop Med Int Heal* [Internet]. 2020



SALUD
SECRETARÍA DE SALUD



HOSPITAL
GENERAL
de MÉXICO

DR. EDUARDO LICEAGA

- Mar 1 [cited 2022 Jul 13];25(3):278. Available from: /pmc/articles/PMC7169770/
23. Cruz Vega F, Athié Gutiérrez C, Pérez Torres E, editors. Enfermedad por el nuevo coronavirus SARS--CoV--2 [Internet]. Vol. 1. Ciudad de México: Editorial Alfil; 2022 [cited 2022 Jul 13]. Available from:
<https://www.amc.org.mx/clinicasquirurgicas/XXIV/ClinXXIV-Vol1.pdf>
 24. COVID-19 Map - Johns Hopkins Coronavirus Resource Center [Internet]. [cited 2022 Jun 30]. Available from: <https://coronavirus.jhu.edu/map.html>
 25. Brote de enfermedad por el Coronavirus (COVID-19) - OPS/OMS | Organización Panamericana de la Salud [Internet]. [cited 2022 Jun 30]. Available from:
<https://www.paho.org/es/temas/coronavirus/brote-enfermedad-por-coronavirus-covid-19>
 26. COVID-19 Tablero México - CONACYT - CentroGeo - GeoInt - DataLab [Internet]. [cited 2022 Jun 30]. Available from: <https://datos.covid-19.conacyt.mx/>
 27. Información de la vacuna – Vacuna Covid [Internet]. [cited 2022 Jul 13]. Available from:
<http://vacunacovid.gob.mx/wordpress/informacion-de-la-vacuna/>
 28. Grupo Técnico Asesor de Vacunación Covid-. Priorización inicial y consecutiva para la vacunación contra SARS-CoV-2 en la población mexicana. Recomendaciones preliminares. Salud Publica Mex [Internet]. 2020 Dec 24 [cited 2022 Jul 13];63(2, Mar-Abr):288–309. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33989472/>
 29. Chenchula S, Karunakaran P, Sharma S, Chavan M. Current evidence on efficacy of COVID-19 booster dose vaccination against the Omicron variant: A systematic review. J Med Virol [Internet]. 2022 Jul 1 [cited 2022 Jul 13];94(7):2969–76. Available from:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35246846/>
 30. Silvestre-Roig C, Hidalgo A, Soehnlein O. Neutrophil heterogeneity: implications for homeostasis and pathogenesis. Blood [Internet]. 2016 May 5 [cited 2019 Mar 30];127(18):2173–81. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27002116>
 31. Pillay J, Den Braber I, Vrisekoop N, Kwast LM, De Boer RJ, Borghans JAM, et al. In vivo labeling with 2H2O reveals a human neutrophil lifespan of 5.4 days. Blood [Internet]. 2010 Jul 29 [cited 2022 Jul 8];116(4):625–7. Available from:



<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20410504/>

32. Garley M, Jablon´ska E, Jablon´ska J. Heterogeneity Among Neutrophils. Arch Immunol Ther Exp (Warsz). 2018;66:21–30.
33. Winterbourn CC, Kettle AJ, Hampton MB. Reactive Oxygen Species and Neutrophil Function. Annu Rev Biochem [Internet]. 2016 Jun 2 [cited 2019 Mar 30];85(1):765–92. Available from: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-biochem-060815-014442>
34. Azzouz D, Palaniyar N. ApoNETosis: discovery of a novel form of neutrophil death with concomitant apoptosis and NETosis. Cell Death Dis [Internet]. 2018;9(8):0–2. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41419-018-0846-9>
35. Cavalcante-Silva LHA, Carvalho DCM, Lima É de A, Galvão JGFM, da Silva JS d. F, Sales-Neto JM de, et al. Neutrophils and COVID-19: The road so far. Int Immunopharmacol. 2021 Jan 1;90:107233.
36. Schechter MC, Buac K, Adekambi T, Cagle S, Celli J, Ray SM, et al. Neutrophil extracellular trap (NET) levels in human plasma are associated with active TB. PLoS One [Internet]. 2017 Aug 1 [cited 2021 Sep 20];12(8):e0182587. Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0182587>
37. Mutua V, Gershwin LJ. A Review of Neutrophil Extracellular Traps (NETs) in Disease: Potential Anti-NETs Therapeutics. Clin Rev Allergy Immunol [Internet]. 2021 Oct 1 [cited 2022 Jul 13];61(2):194–211. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32740860/>
38. Al-Kuraishy HM, Al-Gareeb AI, Al-hussaniy HA, Al-Harcana NAH, Alexiou A, Batiha GES. Neutrophil Extracellular Traps (NETs) and Covid-19: A new frontiers for therapeutic modality. Int Immunopharmacol [Internet]. 2022 Mar 1 [cited 2022 Jul 13];104. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35032828/>
39. Borges L, Pithon-Curi TC, Curi R, Hatanaka E. COVID-19 and Neutrophils: The Relationship between Hyperinflammation and Neutrophil Extracellular Traps. Mediators Inflamm [Internet]. 2020 [cited 2022 Jul 13];2020. Available from:



SALUD
SECRETARÍA DE SALUD



HOSPITAL
GENERAL
de MÉXICO

DR. EDUARDO LICEAGA

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33343232/>

40. Blanch-Ruiz MA, Ortega-Luna R, Gómez-García G, Martínez-Cuesta MÁ, Álvarez Á. Role of Neutrophil Extracellular Traps in COVID-19 Progression: An Insight for Effective Treatment. *Biomedicines* [Internet]. 2021 Dec 23 [cited 2022 Jul 13];10(1). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/35052711>
41. Zhu Y, Chen X, Liu X. NETosis and Neutrophil Extracellular Traps in COVID-19: Immunothrombosis and Beyond. *Front Immunol* [Internet]. 2022 Mar 2 [cited 2022 Jul 13];13. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35309344/>
42. Rojas-Espinosa O, Rivero-Silva M, Hernández-Solís A, Arce-Paredes P, Arce-Mendoza A, Islas-Trujillo S. Sera from patients with tuberculosis increase the phagocytic-microbicidal activity of human neutrophils, and ESAT-6 is implicated in the phenomenon. *Int J Mycobacteriology*. 2021 Jul 1;10(3):271–8.
43. Juárez-Ortega M, Rojas-Espinosa O, Muñoz-Salazar R, Becerril-Villanueva E, Hernández-Solís A, Arce-Paredes P, et al. Sera from patients with active pulmonary tuberculosis and their household contacts induce nuclear changes in neutrophils. *Infect Drug Resist*. 2018;11:1685–702.
44. Open access to facilitate research and information on COVID-19 [Internet]. [cited 2022 Sep 6]. Available from: <https://en.unesco.org/covid19/communicationinformationresponse/opensolutions>



Anexo 1 “Información del expediente clínico de los pacientes con COVID-19”

NUMERO	GRAVEDAD	DIMERO D INGRESO	FERRITINA INGRESO	PCR INGRESO	RX INGRESO
7	MODERADO	305	543	91	
8	MODERADA	1250	104	1.89	
9	MODERADA	1380	154	67	
15	MODERADA	956	200	53	





NUMERO	GRAVEDAD	DIMERO D INGRESO	FERRITINA INGRESO	PCR INGRESO	RX INGRESO
16	MODERADA	832	727	103	
1	SEVERA	1128	1017	75	
2	SEVERA	1249	2955	309	
10	SEVERA	2004	1538	271	
11	SEVERA	3489	1365	94	
13	SEVERA	1437	842	173	
14	SEVERA	904	1030	67	





17	SEVERA	1849	923	85	
----	--------	------	-----	----	--

Anexo 2 “Pruebas estadísticas empleadas”

En todos los casos a excepción de la Figura 10 se aplicó la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk y de acuerdo con esto se asignaron pruebas no paramétricas debido a que los resultados no se ajustaban a distribuciones normales. Después se aplicó la prueba de Kruskal-Wallis y en los casos donde se presentaba una diferencia estadísticamente significativa se buscó entre que grupos mediante la comparación múltiple de Dunn y usando la diferencia media de rangos se asignó la significancia (ns, *, **, *** o ****).

En el caso único de la Figura 10 el resultado de la prueba de Kruskal-Wallis arrojó que los datos se ajustaban a una distribución normal por lo cual se usó la prueba t de Student y se obtuvo el valor de p graficado.