



Universidad Nacional Autónoma de
México

FACULTAD DE CIENCIAS

**“Expresión de CD39 y CD73 en
leucocitos de sangre periférica como
moléculas reguladoras del proceso
inflamatorio en pacientes con SIRS-
sepsis”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
BIÓLOGO

PRESENTA

María Fernanda Camargo Juárez

DIRECTORA DE TESIS

Dra Lourdes Andrea Arriaga Pizano



Ciudad Universitaria, CDMX., 2023



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.

HOJA DE DATOS DEL JURADO

1. Datos del alumno.

Apellido Paterno: Camargo
Apellido materno: Juárez
Nombre (s): María Fernanda
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
Número de cuenta: 313243679

2. Datos del Asesor.

Dra.
Nombre(s): Lourdes Andrea
Apellido paterno: Arriaga
Apellido materno: Pizano

3. Datos del Sinodal 1

Dra.
Nombre(s): Gisela Edith
Apellido paterno: Rangel
Apellido materno: Yescas

4. Datos del Sinodal 2

Dra.
Nombre(s): Martha Verónica
Apellido paterno: Ponce
Apellido materno: Castañeda

5. Datos del Sinodal 3

Dra.
Nombre(s): Lourdes Andrea
Apellido paterno: Arriaga
Apellido materno: Pizano

6. Datos del Sinodal 4

Dr.
Nombre(s): Ismael
Apellido paterno: Mancilla
Apellido materno: Herrera

7. Datos del Sinodal 5

Dr.
Nombre(s): José Luis
Apellido paterno: Ramos
Apellido materno: Balderas

3. Datos de la tesis.

Título de la tesis: Expresión de C39 y C73 en leucocitos de sangre periférica como moléculas reguladoras del proceso inflamatorio en pacientes con SIRS-sepsis.
Número de páginas: 62 pp.
2022

AGRADECIMIENTOS

A mi directora de tesis, la Dra. Lourdes Andrea Arriaga Pizano, por darme la oportunidad de integrarme a su laboratorio en el cual culmino este escrito. También le agradezco por el tiempo dedicado, su asesoría, retroalimentación y consejos dados tanto de manera profesional como personalmente durante todo este trayecto, esperando esto sólo sea el comienzo de un largo camino de aprendizaje.

A mis padres, los cuales han sido una parte esencial desde el comienzo de este proyecto. Ambos han estado para mí apoyándome y alentándome a seguir adelante con lo que me he propuesto a lo largo de mi vida. No sabría cómo agradecer toda la dedicación, paciencia, consejos y esfuerzos que dieron para que yo llegará hasta la culminación de un objetivo más, no obstante, espero la vida nos dé más para poder compartir más logros a su lado, los amo.

A mis compañeros de laboratorio: a la M. en C. Teresita por ser una persona clave en la realización de este escrito, no creo poder encontrar la forma de agradecerle toda la dedicación y tiempo que pusiste en mí, en darme fuerzas y ánimos, siendo así una inspiración para siempre intentarlo hasta el último momento. De igual manera siempre recordaré todos esos desvelos y risas que pasamos juntas, te quiero.

A mi QFB favorito: Emmanuel por todos los buenos momentos que pasamos en el laboratorio, por todo el tiempo compartido, por impartir conmigo tu gran conocimiento, tanto en la parte teórica como en la parte práctica, sin duda eres una persona maravillosa en todos los sentidos.

A la M. en C. Edna por el tiempo impartido en asesoramiento, el conocimiento compartido, las dudas aclaradas en el laboratorio, por todos los buenos momentos pasados tanto fuera como dentro del 1416, por los consejos y por todo el apoyo que me has brindado.

A mi amiga Anaid, compartimos muy buenos momentos, tanto dentro como fuera de la facultad, gracias por todas tus porras, ánimos y confianza que pusiste en mí, sigamos compartiendo nuestros logros como lo hemos hecho hasta ahora.

A mi amiga Lucero, el camino sin previo aviso nos juntó y no sabe cuan infinitamente agradecida estoy, siempre lo diré su amistad es demasiado valiosa para mí, siento que he crecido junto contigo en muchos ámbitos, hemos estado la una para la otra tanto en los tiempos buenos como en los malos. Usted ha sido mi gran consejera en los momentos serios y no tan serios. Es una persona maravillosa que se merece todo por lo que tanto esfuerzo ha trabajado, realmente la admiro y la quiero demasiado.

A Antonio, por todo tu apoyo, tu tiempo dedicado en mí, por todas esas veces que siempre me has querido aconsejar, por las cosas buenas y también por las malas puesto que con ello hemos obtenido un crecimiento. Así mismo gracias por las risas, por las palabras de aliento, por darme fuerzas, por confiar en que tan capaz soy, por enseñarme que la palabra “rendirse” no es una opción. Siempre estaré plenamente agradecida y espero poder seguir compartiendo buenos momentos contigo.

A mis compañeros del trabajo, los cuales tuve el placer de conocer en esta etapa de mi vida, agradeciéndoles por darme la oportunidad de seguir adelante en mi propedéutico, por darme ánimos y palabras de aliento durante este trayecto de trabajar/estudiar a la vez, por las risas, por su esfuerzo y dedicación en que desarrollará nuevas habilidades, pero lo más importante, por enseñarme que puedo explotar más mis capacidades para llegar a ser mejor en muchos ámbitos, de corazón, muchas gracias.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	vi
ÍNDICE DE TABLAS	vii
ABREVIATURAS	viii
RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN.....	2
1.1 <i>Inductores y potenciadores de la Inflamación</i>	2
1.2 <i>Tipos de respuesta inflamatoria</i>	4
1.3 <i>Síndrome de Respuesta Inflamatoria Sistémica</i>	6
1.4 <i>Sepsis</i>	8
1.4.1 <i>Fisiopatología de la sepsis</i>	10
1.4.2 <i>Resolución inmunológica de sepsis</i>	14
1.4.3 <i>La adenosina como un mediador pro-resolutivo en la sepsis</i>	16
1.5 <i>Sistema purinérgico y participación de CD39-CD73 en la respuesta inflamatoria y sepsis</i>	17
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	22
3. JUSTIFICACIÓN	23
4. Pregunta de investigación	24
5. Objetivo general	24
5.1 Objetivos particulares.....	24
6. Hipótesis.....	24
7. MÉTODO	25
7.1 <i>Diseño del estudio</i>	25
7.2 <i>Universo de trabajo</i>	25
7.3 <i>Población de Estudio</i>	25
7.4 <i>Selección de Pacientes</i>	25
7.5 <i>Obtención de las muestras</i>	26
7.6 <i>Recolección de datos clínicos</i>	26
7.7 <i>Inmunofenotipificación de leucocitos</i>	27
7.8 <i>Análisis de datos de citometría de flujo</i>	29
7.9 <i>Análisis Estadístico</i>	32
8. RESULTADOS	33

9. DISCUSIÓN	40
10. RESUMEN DE RESULTADOS.....	48
11. CONCLUSIÓN.....	48
12. ANEXO.....	49
13. Referencias	51

ÍNDICE DE FIGURAS

1. Componentes inflamatorios.....	3
2. Subpoblaciones de monocitos humanos y sus funciones.....	13
3. Interpretación general del funcionamiento del sistema purinérgico mediado por CD39 y CD73.....	18
4. Representación y función de las ectonucleotidasas CD39 y CD73.	19
5. Protocolo general para la inmunofenotipificación de leucocitos.....	29
6. Estrategia general de análisis para la identificación de leucocitos y sus subpoblaciones.	30
7. Estrategia de análisis para la identificación de las subpoblaciones de monocitos.	30
8. Gráficos de puntos para establecer las células con expresión de ectonucleotidasas CD39 y CD73.....	31
9. Caracterización de las células con doble expresión de CD39 y CD73 (CD39+CD73+).	32
10. Expresión de CD39 y CD73 en linfocitos.....	34
11. Expresión de CD39 y CD73 en neutrófilos.	35
12. La expresión de CD39 es mayor en monocitos con pacientes con SIRS.	36
13. La expresión de CD39 en monocitos clásicos es mayor en pacientes con SIRS.	37
14. La expresión de CD39 y CD73 en monocitos intermedios y no clásicos no se modifica en pacientes con SIRS o sepsis respecto a los sujetos sanos.	38
15. En pacientes con sepsis el porcentaje de neutrófilos CD39+CD73+ es menor que en los pacientes con SIRS.	39

ÍNDICE DE TABLAS

1. Criterios de SIRS de la American College of Chest Physicians y la Society of Critical Care Medicine (ACCP/SCCM).....	7
2. Criterios de la puntuación de SOFA.	9
3. Criterios clínicos de qSOFA. (Quick Sequential Organ Failure Assessment)....	10
4. Anticuerpos para la inmunofenotipificación de leucocitos de acuerdo con cada control.	27
5. Panel de anticuerpos utilizados para la inmunofenotipificación.	28
6. Características demográficas de los voluntarios sanos (controles) y pacientes analizados.....	33

ABREVIATURAS

ACCP/SCCM: Sociedad de Medicina de Cuidados Intensivos y la Sociedad Europea de Medicina Intensiva

ADO: Adenosina

ADP: Adenosín difosfato

AF: Autofluorescencia

AMP: Adenosín monofosfato

AnxA1: Anexina 1

ATP: Adenosín trifosfato

CO: Monóxido de carbono

CLR: Receptores de lectina tipo C

DAMP: Patrones moleculares asociados a daño

CD39: ectonucleósido trifosfato difosfohidrolasa-1

CD73: ecto-5'-nucleotidasa

FMO: Fluorescencia menos uno

FCS: Forward Scatter Channel

H₂S: Ácido sulfhídrico

JAK-STAT: Transductor de la Cinasa-S Señal de Jano y activador de la transcripción

IL-1 β : Interleucina 1 beta

IL-6: Interleucina 6

IL-8: Interleucina 8

LXA4: lipoxinas

MAPK: Proteína quinasa activada por mitógenos

NET: Trampas extracelulares de neutrófilos

NK: natural kills

NF-KB: Factor nuclear kappa B

NLR: Receptores tipo NOD

PAMP: Patrones moleculares asociado a patógenos
PRR: Receptores de reconocimiento de patrones
RIG: Gen inducible por ácido retinoico
RLR: Receptores tipo I
ROS: Especies reactivas de oxígeno
RvD1: Resolvinas
SSC: Side Scatter Channel
SDOM: Síndrome de disfunción orgánica múltiple
SIRS: Síndrome de respuesta inflamatoria sistémica
SOFA: Evaluación secuencial de insuficiencia orgánica
qSOFA: Evaluación secuencial rápida de la insuficiencia de órganos
TGF- β : Factor de crecimiento transformador-beta
TNF- α : Factor de necrosis tumoral alfa
TLR: Receptores tipo Toll
UCI: Unidad de Cuidados Intensivos

RESUMEN

SIRS (Síndrome de Respuesta Inflamatoria Sistémica) y sepsis (disfunción orgánica potencialmente mortal causada por una respuesta desregulada del hospedero a la infección), son que corresponden a un proceso de inflamación sistémica, aguda y severa. Ambas se caracterizan por un desbalance en la producción de citocinas e hiperactivación del sistema inmunológico, endotelial y de coagulación. La elevada mortalidad es una de las razones por las cuales se les considera un problema de salud hospitalaria.

En la resolución del proceso inflamatorio, existen diversos mecanismos y uno de ellos es la adenosina, la cual es producida por las ectoenzimas CD39 y CD73 que impulsan un cambio en el entorno proinflamatorio generado por la presencia de ATP hacia un entorno antiinflamatorio inducido por adenosina. Al momento existe poca evidencia tanto en SIRS como en sepsis de la importancia que pueden representar las ectoenzimas CD39 y CD73, así como los cambios en su expresión en las diferentes células del sistema inmunológico presentes en sangre periférica

El objetivo de este trabajo fue determinar en pacientes con SIRS o sepsis, así como sujetos sanos, la expresión de CD39/CD73 de membrana en linfocitos, neutrófilos y monocitos. Para ello propusimos un estudio prospectivo, transversal, comparativo, y observacional, en el que incluimos un total de 14 sujetos, distribuidos en tres grupos: controles (voluntarios sanos) (n=4), pacientes con SIRS (n=4) y pacientes con sepsis (n=6). De cada paciente a partir de una muestra de sangre periférica, mediante inmunofenotipificación se identificaron los linfocitos, neutrófilos y monocitos, así como las subpoblaciones de monocitos clásicos, intermedios y no clásicos. De cada población y subpoblación se determinó el porcentaje de células positivas a CD39 y/o CD73, así como la media de la intensidad de fluorescencia (MIF) para evaluar la expresión relativa de estas ectoenzimas. En nuestros resultados observamos que los pacientes con SIRS y sepsis las ectoenzimas CD39 y CD73 se expresa tanto en linfocitos, neutrófilos, monocitos y sus subpoblaciones. No encontramos diferencias significativas en la expresión de estas moléculas en linfocitos entre las provenientes de sujetos con SIRS o sepsis, ni tampoco respecto a sujetos control. Sin embargo, en células mieloides sí observamos que para neutrófilos hay mayor expresión de CD39 en pacientes con SIRS, pero no así en pacientes con sepsis. Cuando exploramos la coexpresión de CD39 y CD73, solo en el caso de neutrófilos el porcentaje de células fue significativamente menor a los de SIRS ($p < 0.05$). Para el caso de monocitos, encontramos mayor expresión de CD39 en pacientes con SIRS respecto a pacientes con sepsis, y comprobamos que esto era a expensas de los monocitos clásicos. En conclusión, la expresión del sistema CD39/CD73 varía en neutrófilos y monocitos (primordialmente clásicos) de acuerdo con el tipo de inflamación sistémica, estando aparentemente más comprometida en sepsis que en SIRS.

1. INTRODUCCIÓN

La inflamación es la respuesta biológica del sistema inmunológico ante diversos factores nocivos, como son células dañadas, patógenos, compuestos tóxicos o radiación (Medzhitov, 2010). Importante señalar que, dependiendo de la duración de este proceso inflamatorio, la inflamación se puede dividir en inflamación aguda (que dura minutos a horas, incluso algunos días) o crónica (que dura semanas a meses); también es posible clasificar a la respuesta inflamatoria dependiendo la extensión del proceso, pudiendo ser un proceso local (restringido a un órgano, tejido o región en particular) o sistémico (Lawrence and Gilroy, 2007).

En inflamación local, las manifestaciones clásicas (o pentada clínica) incluyen: enrojecimiento, hinchazón (edema), calor, dolor y pérdida de la función. A nivel tisular, estas manifestaciones son causadas por el incremento del flujo sanguíneo hacia la zona afectada, aumento en la permeabilidad vascular que permite la salida desde el torrente circulatorio (extravasación) de líquido proteínas y otros componentes de la sangre, como son los leucocitos que son reclutados hacia los tejidos donde existe esta infección y/o lesión. (Medzhitov, 2010).

En inflamación sistémica las manifestaciones clínicas incluyen fiebre o hipotermia, taquicardia, taquipnea o hipoxia, postración, y leucocitosis ya que en su incluye la activación generalizada tanto del sistema inmunológico, como del endotelio, sistema de complemento y de la coagulación (Basbaum *et al.*, 2009).

1.1 *Inductores y potenciadores de la Inflamación*

Se propone que la respuesta inflamatoria típica requiere de cuatro tipos de moléculas: los inductores, los sensores que los detectan, los mediadores inducidos por los sensores y los receptores en los tejidos diana que responden a estos mediadores inflamatorios (Figura 1). El tipo y el grado de respuesta inflamatoria activada dependerá tanto de la naturaleza del inductor o desencadenante inflamatorio (bacteriano, viral o parasitario) como de su persistencia, de la biodisponibilidad de mediadores, de la señalización asociada a la activación de

receptores y la activación de los mecanismos reguladores del proceso inflamatorio (Medzhitov, 2010).

Así, la respuesta inflamatoria se inicia por el reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs por *Pathogen Associated Molecular Patterns*) o por el reconocimiento de patrones moleculares asociados a daño (DAMPs por *Damage Associated Molecular Patterns*); estos últimos también denominados alarminas. Estos inductores son reconocidos por receptores de reconocimiento de patrones (PRRs por *Pattern Recognition Receptors*), expresados en células inmunes y no inmunes (como fibroblastos o células epiteliales) (William J Janssen and Henson, 2012; Freire and Van Dyke, 2013). Las clases de familias de PRR incluyen los receptores tipo Toll (TLR por *Toll Like Receptors*), receptores de lectina tipo C (CLR por *C-type Lectin-like Receptors*), receptores tipo I (RLR por *Retinoic acid-inducible gene I (RIG-I)-like receptors*) y los receptores tipo NOD (NLR por *nucleotide-binding oligomerization domain (NOD)-like receptors*) (Takeuchi and Akira, 2010).

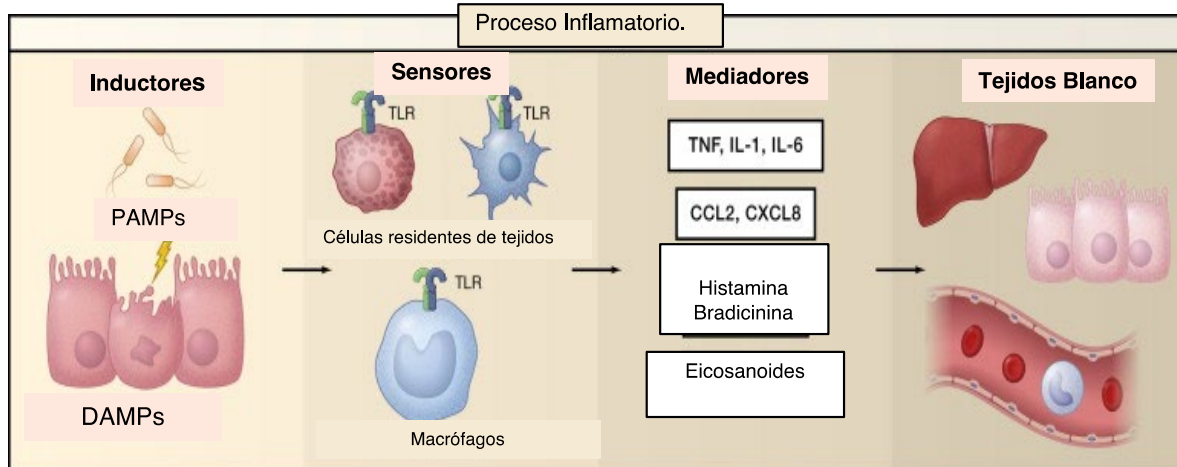


Figura 1. Componentes inflamatorios. La respuesta inflamatoria consta de inductores, sensores, mediadores y tejidos diana. Los inductores inician la respuesta inflamatoria y son detectados por sensores. Los sensores, como los receptores tipo Toll (TLR), se expresan en células centinelas especializadas, como macrófagos residentes de tejidos, células dendríticas y mastocitos induciendo la producción de mediadores (Medzhitov, 2010).

Dependiendo de que PAMPs o DAMPs reconozcan los PRRs, se activan diferentes vías de señalización inflamatorias, (comúnmente las vías de NF- κ B (por *Nuclear*

factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells), MAPK (por *Mitogen-activated protein kinase*) y JAK-STAT (por *Janus kinase-signal transducer and activator of transcription*) dando como resultado la transcripción génica y liberación de citocinas proinflamatorias, quimiocinas y prostaglandinas. Estos y otros mediadores inflamatorios actúan sobre los tejidos diana, incluido el endotelio de los vasos sanguíneos locales induciendo vasodilatación, extravasación de neutrófilos y salida de agua y proteínas hacia el tejido infectado (Medzhitov, 2010). Los neutrófilos y monocitos infiltrados al tejido, así como macrófagos (residentes de tejido al inicio y los derivados de monocitos posteriormente), también liberan mediadores inflamatorios y llevan a cabo los procesos de fagocitosis y estallido respiratorio, lo que elimina a los agentes infecciosos (o potencialmente infecciosos), limitando el daño y promoviendo la reconstitución del tejido afectado al echar a andar los mecanismos de reparación. En algunos casos la incapacidad de contención del daño impide la correcta restitución del tejido, lo que da lugar a la cicatrización (fibrosis) con la consecuente pérdida de la función normal. En otras ocasiones, el daño y los mediadores inflamatorios no pueden ser contenidos, y el proceso inflamatorio se puede extender, tanto en tiempo como espacio (Nathan, 2002; Nduka and Parrillo, 2009).

1.2 Tipos de respuesta inflamatoria

Como ya se mencionó, la respuesta inflamatoria se clasifica de acuerdo con su tiempo de evolución en: a) inflamación aguda y b) inflamación crónica.

La inflamación aguda suele presentarse abruptamente y dura de segundos a horas (máximo 15 h); sus características fundamentales son la exudación de líquido, proteínas plasmáticas e infiltrado celular compuesto principalmente por neutrófilos (Stone, Basit and Burns, 2020).

La respuesta inflamatoria aguda normalmente finaliza una vez que se suprime la agresión desencadenante, se elimina la infección y se repara el tejido dañado (Serhan and Savill, 2005; Lawrence and Gilroy, 2007). Sin embargo, si el proceso inflamatorio no es eliminado o persiste por cualquier otro motivo, es posible que la

fase de resolución no se induzca de manera adecuada y puede sobrevenir un estado inflamatorio crónico. Este estado puede ser causado por infecciones crónicas, daño tisular no reparado, alérgenos persistentes o partículas extrañas no ingeribles (Lawrence and Gilroy, 2007; Furman *et al.*, 2019).

La inflamación crónica suele desarrollarse paulatinamente y puede durar desde días hasta años; caracterizándose por la infiltración de monocitos y linfocitos, así como la proliferación de fibroblastos, fibras de colágeno y formación de tejido conectivo (Ferrero-Miliani *et al.*, 2007; Abdulkhaleq *et al.*, 2018; Suzuki, 2019).

La respuesta inflamatoria crónica en estos casos se localiza típicamente en el sitio donde está presente el inductor inflamatorio y, a menudo, da como resultado diferentes tipos de remodelación tisular local (Medzhitov, 2010), causando daños colaterales a los tejidos y órganos a lo largo del tiempo, llegando a provocar enfermedades graves como asma, aterosclerosis, artritis y cáncer (Chilton, Embry and Mitchell, 2012; Furman *et al.*, 2019).

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

La respuesta inflamatoria local es aquella que se produce en los tejidos vascularizados para defender al hospedero ante cualquier daño causado por lesión, infección o situación de estrés (Barton, 2008; Chen *et al.*, 2018). Este proceso se inicia una vez que las células residentes de tejido (macrófagos, queratinocitos o células epiteliales) detectan los PAMPS y/o DAMPS, liberando quimiocinas y citocinas, aumentando el flujo sanguíneo, la permeabilidad vascular y el reclutamiento de leucocitos activados hacia el sitio afectado (Medzhitov, 2008; William J. Janssen and Henson, 2012; Abdulkhaleq *et al.*, 2018).

Las primeras células atraídas a un sitio de lesión son los neutrófilos, seguidos de los monocitos y linfocitos (células asesinas naturales NK, células T y células B). Los neutrófilos son las primeras células inflamatorias que se acumulan en el sitio afectado, estas células son cruciales como la primera línea de defensa debido a sus funciones fagocíticas y microbicidas; también pueden potenciar la función de las

células presentadoras de antígeno que pueden a su vez activar a las células T y liberar factores localizados para atraer monocitos y células dendríticas. Seguido de los neutrófilos, los monocitos ingresan al sitio inflamatorio, presentando antígenos, fagocitosis y modulando la respuesta inmune al producir citocinas y factores de crecimiento (Freire and Van Dyke, 2013; Abdulkhaleq et al., 2018). Por último, los linfocitos presentan varias funciones efectoras como limitar la expansión de microorganismos, incluidos virus, bacterias y parásitos.

Los leucocitos infiltrantes y las células residentes contendrán a los agentes infecciosos (en caso de que existan), se desharán de las células muertas y favorecerán la restitución o remodelación del tejido. Para ello fagocitan, realizan estallido respiratorio, eliminan cuerpos apoptóticos y participan en la remodelación de la matriz extracelular (Freire and Van Dyke, 2013).

Por otro lado, la respuesta inflamatoria sistémica corresponde a la extensión de la respuesta inflamatoria localizada que no es contenida y favorece la liberación masiva hacia circulación de mediadores inflamatorios. En la respuesta inflamatoria sistémica aguda, además de la activación masiva del endotelio y de los leucocitos circulantes, también se activan las vías del complemento y cascadas de coagulación. Este tipo de inflamación sistémica, da lugar a lo que clínicamente se conoce como síndrome de respuesta inflamatoria sistémica o SIRS (*por Systemic Inflammatory Response Syndrome*) (Riedemann, Guo and Ward, 2003; Iskander et al., 2013).

1.3 Síndrome de Respuesta Inflamatoria Sistémica

El síndrome de respuesta inflamatoria sistémica puede desencadenarse ante diversos eventos abruptos, incluidas quemaduras extensas, isquemia, enfermedades autoinmunes, lesiones que incluyen cirugía y/o infección (Balk, 2014; Caserta et al., 2017). La gravedad de la enfermedad observada en SIRS varía ampliamente, pero deriva en el Síndrome de Disfunción Orgánica Múltiple (SDOM), o bien se suma falla orgánica que pone en peligro la vida, o sea, desarrolla sepsis

(una afección que comparte manifestaciones clínicas comunes con el SIRS) que puede ser letal (Caserta *et al.*, 2017)

El concepto de SIRS provino de la conferencia de consenso por parte de La Sociedad de Medicina de Cuidados Intensivos y la Sociedad Europea de Medicina Intensiva (ACCP/SCCM) en 1992 con el propósito de aclarar las definiciones de sepsis y shock séptico para poder permitir la estandarización de los protocolos de investigación y mejorar su detección clínica (Bone *et al.*, 1992; Bone, Sibbald and Sprung, 1992; Parlato and Cavallion, 2014). El informe de consenso resultante describió el "Síndrome de Respuesta Inflamatoria Sistémica" como la respuesta clínica a un proceso inflamatorio que requiere la presencia de dos o más de los siguientes signos: fiebre o hipotermia, taquicardia, taquipnea o hipoxia y leucocitosis, leucopenia o bandemia (Bone, Sibbald and Sprung, 1992) (Tabla 1).

Tabla 1. Criterios de SIRS de la American College of Chest Physicians y la Society of Critical Care Medicine (ACCP/SCCM).

Síndrome de Respuesta Inflamatoria Sistémica (SIRS)	
Temperatura corporal	> 38 °C o < 36 °C
Frecuencia cardíaca	> de 90 latidos/min
Frecuencia respiratoria	> a 20 respiraciones /min o PaCO₂ < a 32 mmHg (< a 4.3 kPa).
Recuento de leucocitos	> 12,000 /mm³ o < 4,000 células /mm³
Bandemia	Formas inmaduras(bandas) de más del 10%

(Bone, Sibbald and Sprung, 1992).

Ahora bien, durante el SIRS, la activación de del sistema inmunológico se propaga a todo el cuerpo y genera inmunopatología grave (Matsuda and Hattori, 2006; Caserta *et al.*, 2018). Las células inflamatorias activadas migran a los órganos afectados y liberan mediadores inflamatorios secundarios, incluidas especies reactivas de oxígeno (ROS) y de nitrógeno, lo que provoca estrés oxidativo. La migración de células inflamatorias a los tejidos y la activación de las células endoteliales conducen a coagulación intravascular diseminada que agrava el daño orgánico (Hoesel and Ward, 2004; Mote *et al.*, 2009; Zotova, Chereshev and

Gusev, 2016). Los mediadores antiinflamatorios (TGF- β y antagonistas de citocinas) también están presentes en el plasma durante el SIRS, por lo que, las respuestas antiinflamatorias pueden activarse de igual manera durante dicho proceso (Caserta *et al.*, 2018).

Finalmente, si bien en el SIRS no se asocia de forma inicial con infección, la condición puede llevar a disfunción leucocitaria que predisponga a los pacientes al desarrollo de sepsis como complicación (Hoesel and Ward, 2004).

1.4 Sepsis

De acuerdo al consenso del 2016 realizado por la ACCP/SCCM, se le define a la sepsis como "disfunción orgánica potencialmente mortal causada por una respuesta desregulada del hospedero a la infección" (Singer, M. *et al.*, 2016; Rello *et al.*, 2017). Esta nueva definición implica una respuesta no homeostática del hospedero a la infección e incluye el concepto de disfunción orgánica que pone en peligro la vida, requiriendo así la identificación e intervención oportuna en el tratamiento clínico (Huang, Cai and Su, 2019).

La sepsis es un problema de salud importante y uno de los principales factores que contribuyen a la mortalidad y las enfermedades graves a nivel mundial. En 2017, la incidencia global de sepsis se estimó en 48,9 millones de casos y las muertes asociadas correspondieron a 11,0 millones de casos. Por otra parte se espera que la incidencia de la sepsis aumente como resultado del envejecimiento de la población que tiene numerosas comorbilidades y un sistema inmunológico cada vez más susceptible (Rudd *et al.*, 2020).

En México, una revisión nacional reportó que del 50 al 60% de los pacientes que ingresaron al Servicio de Urgencias presentaron sepsis, y de éstos, 10% arribaron con choque séptico, que fue causa de 24.03% del total de las defunciones (Gorordo-Delsol, 2017).

Para el diagnóstico de la sepsis el consenso propone la puntuación SOFA (Sequential Organ Failure Assessment, por sus siglas en inglés), el cual es un

sistema simple, que utiliza parámetros accesibles en la práctica clínica diaria para identificar disfunciones o fallas de los órganos clave como resultado de la sepsis (Singer, M. *et al.*, 2016; Rello *et al.*, 2017). Asumiendo así, que la puntuación SOFA basal es cero en pacientes sin disfunción orgánica pre-existente, mientras que, para definir los criterios clínicos que identifican los pacientes infectados con sepsis, debe existir el aumento de la puntuación en SOFA de 2 puntos o más para representar disfunción orgánica como se observa en la tabla 2 (Evans, 2018).

Tabla 2. Criterios de la puntuación de SOFA.

Órgano o sistema	Puntuación				
	0	1	2	3	4
Respiratorio PaO ₂ /FiO ₂ (mmHg)	≥ 400	< 400	< 300	< 200 con soporte respiratorio	< 100 con soporte respiratorio
Coagulación Plaquetas (10 ³ / μl)	≥ 150	< 150	< 100	< 50	< 20
Hígado Bilirrubinas (mg/dl)	< 1.2	1.2 – 1.9	2.0 – 5.9	6.0 – 11.9	> 12
Cardiovascular PAM o su manejo	PAM ≥ 70mmHg	PAM < 70 mmHg	Dopamina < 5 o dobutamina (cualquier dosis) *	Dopamina 5.1 -15 o epinefrina ≤0.1 o norepinefrina ≤0.1	Dopamina >15 o epinefrina >0.1 o norepinefrina >0.1
Sistema Nervioso Central Escala de coma de Glasgow	15	13-14	10-12	6-9	<6
Renal Creatinina (mg/dL) Gasto urinario (mL/día)	1.2	1.2-1.9	2.0-3.4	3.5-4.9 <500	>5.0 <200

PaO₂: Presión arterial de oxígeno.

FiO₂: Fracción inspirada de Oxígeno.

PAM: Presión arterial media.

* Dosis de catecolaminas se dan en μg/kg/min por lo menos 1 hora.

(Singer *et al.*, 2016)

Otro concepto que introduce este consenso es el qSOFA (Quick Sequential Organ Failure Assessment, por sus siglas en inglés), esta puntuación no requiere pruebas de laboratorio, se realiza de manera rápida y se utiliza para el diagnóstico de

pacientes en quienes se sospecha un cuadro de sepsis probable. Se sugiere que los criterios qSOFA (Tabla 3) pueden ser utilizados de manera inmediata por los clínicos para evaluar la disfunción de órganos y para iniciar o intensificar la terapia en caso de ser necesario (Singer *et al.*, 2016).

Tabla 3. Criterios clínicos de qSOFA. (Quick Sequential Organ Failure Assessment).

Criterios de qSOFA
Estado Respiratorio (Frecuencia respiratoria ≥ 22 /min)
Nivel de conciencia alterado (Escala de Glasgow ≤ 13)
Presión Sanguínea (Presión arterial sistólica ≤ 100 mmHg)

(Singer *et al.*, 2016)

La sepsis es una emergencia médica que describe la respuesta inmunológica sistémica del cuerpo a un proceso infeccioso que puede provocar disfunción orgánica en etapa terminal y la muerte, involucrando anomalías fisiológicas, patológicas y bioquímicas causadas por infecciones bacterianas, fúngicas o virales localizadas frecuentemente en pulmones, abdomen y vías urinarias (Berg and Gerlach, 2018).

1.4.1 Fisiopatología de la sepsis

La sepsis involucra la activación exacerbada de la respuesta inflamatoria, así como del sistema de coagulación, endotelio y complemento, que tendrán repercusiones en diferentes órganos o sistemas como hígado, pulmones y sistema nervioso. A nivel celular y molecular, la patogenia de la sepsis es extremadamente compleja, debido al desequilibrio en la respuesta inflamatoria, disfunción inmunológica, daño mitocondrial, coagulopatía, estrés del retículo endoplásmico, autofagia y otros procesos fisiopatológicos, que finalmente desencadenan disfunción orgánica múltiple (Gyawali, Ramakrishna and Dhamoon, 2019; Huang, Cai and Su, 2019).

El desarrollo de la sepsis está determinado por las características del hospedero y por los factores intrínsecos del patógeno y puede iniciar no sólo a través de la

diseminación directa de patógenos en el torrente sanguíneo, sino también indirectamente como resultado de complicaciones posquirúrgicas, traumas, quemaduras y hemorragias donde se liberan DAMPs (Brady, Horie and Laffey, 2020).

Una vez que en el hospedero se pierde la contención local de la infección por un patógeno, el cuerpo queda expuesto sistémicamente tanto a él como a sus componentes y a diversos productos del tejido dañado; todo ello induce al sistema inflamatorio a volverse hiperactivo, por lo que es necesario que se involucren mecanismos de defensa tanto celulares como humorales. Las células endoteliales y epiteliales, así como células inmunes, producen mediadores proinflamatorios (TNF- α , IL-6, IL-1 β e IL-8), causando la activación y proliferación de leucocitos, activación del sistema del complemento, regulación positiva de las moléculas de adhesión endotelial, expresión de quimiocinas, producción de factor tisular e inducción de reactantes de fase aguda (Pop-Began *et al.*, 2014; Gyawali, Ramakrishna and Dhamoon, 2019; Huang, Cai and Su, 2019).

Otras células que son cruciales durante la respuesta inmunológica son los leucocitos, ya que participan directamente en el sitio de infección para la contención y eliminación del agente patógeno; en el caso específico de sepsis hay activación de los leucocitos en circulación para atacar a los agentes patógenos, esta respuesta es mediada y coordinada tanto por la inmunidad innata como por la inmunidad adaptativa (Ploppa *et al.*, 2010).

La inmunidad innata es esencial para defender al organismo contra los patógenos en las primeras horas o días siguientes a la infección, es mediada por células fagocíticas como los neutrófilos, monocitos y macrófagos, así como de las células NK, mastocitos, eosinófilos, basófilos (Brady, Horie y Laffey, 2020).

Los neutrófilos son esenciales para la contención y erradicación microbiana por su capacidad de eliminar patógenos mediante fagocitosis, formación de trampas

extracelulares de neutrófilos (NETs), estallido respiratorio y/o desgranulación (Delano and Ward, 2016).

Los monocitos son de las principales células efectoras que participan en la sepsis, ya que, regulan la inmunidad tanto innata como adaptativa a patógenos y estímulos estériles endógenos mediante fagocitosis, liberación de especies reactivas de oxígeno, producción de citocinas (TNF- α , IL-6, IL-1 β) y quimiocinas (IL-8), reclutamiento de neutrófilos, presentación de antígenos y activación de linfocitos (Nedeva, Menassa and Puthalakath, 2019; Radzyukevich, Kosyakova and Prokhorenko, 2021).

La población de monocitos se divide en tres subpoblaciones caracterizadas por la expresión diferencial del receptor de lipopolisacárido (LPS) CD14 y del receptor Fc γ -III (CD16), por lo que tenemos entonces a los monocitos clásicos (CD14⁺CD16⁻), monocitos intermedios (CD14⁺CD16⁺), y monocitos no clásicos (CD14⁻CD16⁺); sus capacidades funcionales están condicionadas por la expresión de dichos receptores y de otras moléculas; por ejemplo, los monocitos clásicos tienen actividad microbiana, fagocitosis, adhesión y migración en el endotelio; los monocitos intermedios participan en el reconocimiento de PAMPs, presentación de antígeno, síntesis de citocinas y regulación de apoptosis y los monocitos no clásicos contribuyen en la presentación de antígeno, respuesta antivirales y antitumoral (figura 2) (Radzyukevich, Kosyakova and Prokhorenko, 2021).

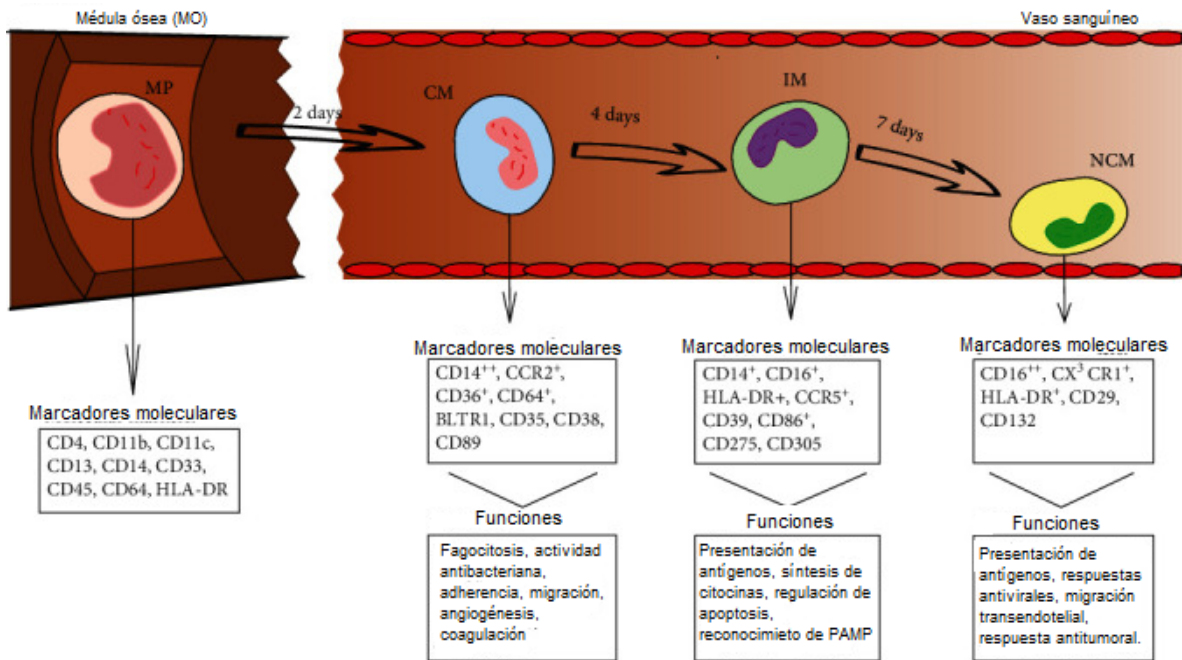


Figura 2. Subpoblaciones de monocitos humanos y sus funciones. Los monocitos humanos maduran en la médula ósea y posteriormente se liberan a la circulación como monocitos clásicos; progresivamente, los monocitos clásicos ($CD14^+CD16^-$) dan lugar a monocitos no clásicos ($CD14^-CD16^+$) a través de un paso intermedio de monocitos ($CD14^+CD16^+$). Cada subpoblación presenta funciones especializadas que se involucran en el proceso inflamatorio (modificado de Radzyukevich, Kosyakova and Prokhorenko, 2021).

La respuesta inmune adaptativa está mediada por células llamadas linfocitos y sus productos, los cuales expresan receptores muy diversos, capaces de reconocer un enorme número de antígenos (Rimmelé *et al.*, 2016).

Los linfocitos desempeñan un papel clave en la respuesta inmunológica adaptativa del tipo proinflamatorio, con la aparición de un fenotipo regulador.

El sistema inmunológico adaptativo se caracteriza por presentar respuestas a la exposición a microorganismos infecciosos, siendo capaz de reconocer antígenos únicos y utilizar la memoria inmunológica para mejorar la respuesta inmune después de exposiciones posteriores de los mismos antígenos aumentando en magnitud y capacidades defensivas (Brady, Horie and Laffey, 2020).

Todas estas poblaciones de leucocitos se ha observado que están involucradas en diferentes patologías inflamatorias, tales como la sepsis donde particularmente neutrófilos, monocitos y linfocitos tienden a cambiar sus capacidades funcionales;

por ejemplo, en los neutrófilos existe un estado retardado de apoptosis que conduce a disfunción continua y daño por la liberación de neutrófilos inmaduros, mostrando claros déficits en sus funciones (Delano and Ward, 2016; Nedeva, Menassa and Puthalakath, 2019). Por otra parte, se ha reportado que los monocitos presentan disminución de la expresión del receptor de superficie celular HLA-DR, así como de la producción de citocinas proinflamatorias tales como TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-12 después de la exposición a LPS (Delano and Ward, 2016; Radzyukevich, Kosyakova and Prokhorenko, 2021), también se ha observado que los pacientes con sepsis presentan evidencia de apoptosis masiva de linfocitos, tanto en sangre periférica como en tejido linfoide, lo que resulta en linfopenia que se asocia claramente con la mortalidad y además favorece la aparición de infecciones secundarias (Cao, Yu and Chai, 2019; Huang, Cai and Su, 2019; Nedeva, Menassa and Puthalakath, 2019).

Conforme avanza el proceso inflamatorio, se producen mediadores antiinflamatorios (IL-10, Lipoxinas, Resolvinas), cuyo objetivo es contrarrestar los efectos proinflamatorios, estos mediadores suprimen la activación de vías proinflamatorias, reduciendo la activación de genes y la generación de mediadores proinflamatorios, por lo que el estado hiperinflamatorio inicial de la sepsis se compensa con una respuesta antiinflamatoria (Hoesel and Ward, 2004).

1.4.2 Resolución inmunológica de sepsis

Es importante entender que la resolución de la inflamación es crucial para poder evitar pérdida de la función orgánica y así garantizar un retorno adecuado de la homeostasis tisular, por tanto, el interés por comprender el mecanismo que se lleva a cabo en la resolución inmunológica de la inflamación tiene gran relevancia.

Durante muchos años, la resolución de la inflamación se consideró un fenómeno pasivo, simplemente asociado con la eliminación de los estímulos inflamatorios, el fin de la producción de quimioatrayentes, la dilución de los gradientes de quimiocinas a lo largo del tiempo y la prevención de un mayor reclutamiento de leucocitos (Sugimoto *et al.*, 2019). Sin embargo, la resolución de la expresión de

citocinas proinflamatorias no empieza días después de que se ha dado el episodio de sepsis, sino que, la respuesta inflamatoria y antiinflamatoria ocurren simultáneamente durante esta patología, donde el resultado temprano se caracteriza por una respuesta hiperinflamatoria (Hotchkiss *et al.*, 2009; Delano and Ward, 2016). Esta resolución requiere de mediadores pro-resolutivos que se desencadenan como parte de la respuesta del hospedero, durante la fase inflamatoria con el fin de llevar a cabo la homeostasis tisular actuando sobre sus receptores específicos para detener el reclutamiento de leucocitos polimorfonucleares, promover la apoptosis (o muerte celular programada), y activar la eliminación de células apoptóticas (Serhan and Savill, 2005; Ortega-Gómez, Perretti and Soehnlein, 2013).

Los mediadores anti-inflamatorios son de naturaleza muy diversa e incluyen: mediadores lipídicos especializados como son las lipoxinas (LXA4), resolvinas (RvD1), protectinas y maresinas (Serhan *et al.*, 2015); proteínas y péptidos como anexina A1 (AnxA1), hormona adrenocorticotrópica, péptidos de quemerina y galectina-1 (Perretti and D'Acquisto, 2009); mediadores gaseosos como ácido sulfhídrico (H₂S) y monóxido de carbono (CO) (Wallace *et al.*, 2015); neuromoduladores (acetilcolina y otros neuropéptidos) (Mirakaj *et al.*, 2014; Serhan, 2014).; así como una purina endógena denominada: adenosina (ADO) (Haskó and Cronstein, 2013).

En particular, el papel de la adenosina como molécula de señalización extracelular fue establecido por primera vez por Drury y Szent-Györgvi en 1929 quien demostró que la adenosina (extraída del músculo cardíaco) es un potente agente inotrópico negativo (reduce la fuerza de los latidos) y un vasodilatador coronario (Haskó and Cronstein, 2004), y actualmente algunos estudios han demostrado que atenúa la inflamación en diferentes modelos de enfermedad como infección gástrica y gastritis, donde actúa a través de la activación de su receptor y confirma su papel beneficioso como inmunomodulador (Ernst, Garrison and Thompson, 2010).

1.4.3 *La adenosina como un mediador pro-resolutivo en la sepsis*

La adenosina es un nucleósido de purina endógena que después de liberarse de las células o formarse extracelularmente, se difunde en las células circundantes donde se une a estructuras específicas de la membrana celular llamadas receptores de adenosina (Haskó and Cronstein, 2004). En condiciones basales, las concentraciones extracelulares de adenosina se mantienen en un nivel basal de 30 a 200 nM como resultado del rápido metabolismo y absorción. Sin embargo, sus niveles aumentan significativamente durante condiciones que involucran aumento de la demanda metabólica, hipoxia, daño tisular, celular e inflamación (Haskó and Cronstein, 2013; Antonioli et al., 2014; Pasquini et al., 2021).

Se ha descrito que las concentraciones extracelulares de adenosina (por medio de la desfosforilación de ATP) aumentan rápidamente en respuesta a hipoxia tisular y daño asociado con sepsis (Ledderose et al., 2016); durante la inflamación sistémica o sepsis la adenosina interactúa con receptores expresados en las células inmunes a través de los cuales puede ejercer efectos antiinflamatorios e inmunosupresores (Haskó and Cronstein, 2013), la estimulación de estos receptores disminuye la fagocitosis, liberación de agentes microbicidas y generación de especies reactivas de oxígeno en los neutrófilos (Antonioli et al., 2014; Pasquini et al., 2021), mientras que aumenta la secreción de citocinas antiinflamatorias en macrófagos e induce la apoptosis de linfocitos (Németh et al., 2006).

La producción de adenosina se lleva a cabo a través de diferentes mecanismos, sin embargo, el principal es por medio de la desfosforilación de los nucleótidos de adenina (ATP, ADP, AMP) a adenosina por las ectoenzimas: ecto-nucleósido trifosfato difosforilasas (NTPDases, CD39) y ecto-5'-nucleotidasa (Ecto-5'NTasa, CD73) (Yegutkin, 2008).

El receptor de adenosina demostró que su activación atenúa significativamente el daño tisular de la inflamación sistémica en estudios realizados con ratones knock-out. Sin embargo, aunque la amortiguación de la activación excesiva de las células inmunitarias por los receptores de adenosina puede ser beneficiosa en la fase inicial hiperdinámica de la sepsis y la endotoxemia, los mismos receptores pueden inducir

inmunosupresión. Por lo tanto, el estudio de la liberación de ATP en eventos inflamatorios, y su degradación a adenosina por medio de estas ectoenzimas presentes en la vía de señalización purinérgica se ha convertido en un foco de atención como posible diana terapéutica en el tratamiento de sepsis (Ledderose *et al.*, 2016).

1.5 Sistema purinérgico y participación de CD39-CD73 en la respuesta inflamatoria y sepsis

El sistema purinérgico, es un sistema que depende de las funciones de las células inmunitarias, como son las interacciones célula-célula, la producción de citocinas y quimiocinas, la eliminación de antígenos de superficie, de patógenos intracelulares y la generación de ROS. Los mediadores purinérgicos, como son el ATP y ADO, son liberados en el espacio extracelular en respuesta a trastornos metabólicos u otro tipo de insultos, operando como señales sensoriales y eferentes para dar paso a la respuesta inmune (Antonioli, Pacher, E Sylvester Vizi, *et al.*, 2013).

Una vez que el ATP es liberado en el espacio extracelular, CD39 (ecto-nucleósido trifosfato difosfatohidrolasa 1, E-NTPDase1) convierte el ATP en AMP, y luego CD73 (ecto-5'-nucleotidasa, Ecto5'NTase) hidroliza el AMP en adenosina, por lo que son las principales enzimas metabolizadoras de nucleótidos que regulan la inmunidad y la inflamación como se observa en la figura 3 (Antonioli, Pacher, E Sylvester Vizi, *et al.*, 2013).

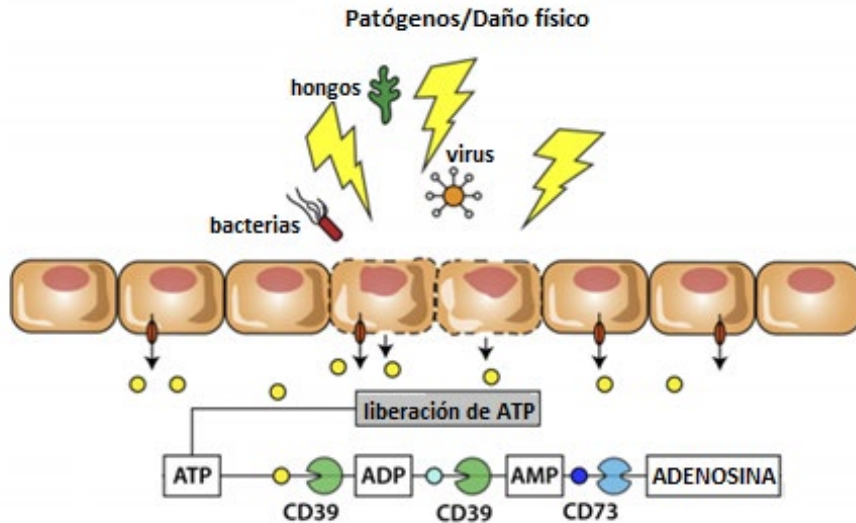


Figura 3. Interpretación general del funcionamiento del sistema purinérgico mediado por CD39 y CD73. Diversos agentes nocivos, ya sean de origen físico o biológico, desencadenan la liberación de ATP por lesiones en la membrana plasmática o por activación de un mecanismo de liberación no lítico. En el medio extracelular, el ATP se degrada gracias a la actividad secuencial de las ecto-nucleotidasas CD39 y CD73, generando adenosina. El ATP extracelular tiene principalmente actividad proinflamatoria, mientras que la adenosina es un potente inmunosupresor (Antonlioli, Pacher, E Sylvester Vizi, et al., 2013).

CD39 es una proteína de membrana integral que fosfohidroliza ATP y ADP de manera menos eficiente, de forma dependiente de Ca^{2+} y Mg^{2+} , para producir AMP; es una proteína de 510 aminoácidos con siete sitios potenciales de glicosilación unidos a N, 11 residuos de Cys y dos regiones transmembrana; estructuralmente, se caracteriza por dos dominios transmembrana, un pequeño dominio citoplasmático que comprende el NH terminal y segmentos COOH-, así como un dominio hidrófobo extracelular grande conformado por cinco dominios altamente conservados, conocido como apirasa regiones conservadas (ACR) 1-5, que son fundamentales para la actividad catabólica de la enzima (figura 4) (Bastid *et al.*, 2013).

CD39 se expresa de forma constitutiva en bazo, timo, pulmón y placenta; en estos órganos se asocia principalmente con células endoteliales y poblaciones de células inmunitarias, como células B, células NK, células dendríticas, células de

Langerhans, monocitos, macrófagos, neutrófilos y células T reguladoras (Dwyer *et al.*, 2007).

Mientras que CD73, es un dímero de dos subunidades idénticas de 548 aminoácidos y 61 kD, ancladas a la membrana plasmática a través de un residuo de serina C-terminal, (Ser 523), unidas a glicosilfosfatidil inositol (GPI). Se sabe que una forma soluble puede desprenderse de la membrana a través de la escisión proteolítica o hidrólisis del anclaje a GPI (ver figura 4). CD73 se encuentra en leucocitos derivados de sangre periférica (linfocitos, neutrófilos, monocitos), así como en colon, cerebro, riñón, hígado, pulmón, corazón, bazo, ganglios linfáticos, timo y médula ósea. (Deaglio and Robson, 2011; Antonioli, Pacher, E Sylvester Vizi, *et al.*, 2013).

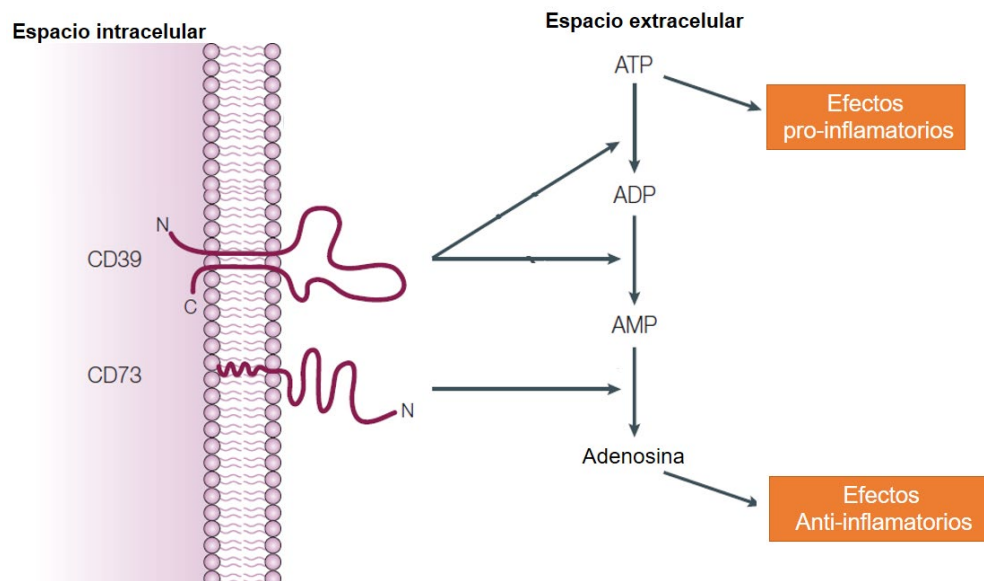


Figura 4. Representación y función de las ectonucleotidasas CD39 y CD73. El ATP extracelular se desfosforila a ADP y a AMP por CD39. El AMP se desfosforila a adenosina por CD73. Modificado de (Salmi and Jalkanen, 2005).

CD39 y CD73 son importantes para mediar la duración, magnitud y composición de la respuesta purinérgica. La expresión y la actividad de CD39 y CD73 experimentan cambios dinámicos de acuerdo con el contexto fisiopatológico en el que están integrados, y se aprecia cada vez más que la alteración de esta maquinaria catabólica puede modular el curso y dictar el resultado de varias condiciones

patofisiológicas, como infecciones, SIDA, enfermedades autoinmunes, aterosclerosis, lesión por isquemia-reperfusión y cáncer (Antonioli, Pacher, E Sylvester Vizi, *et al.*, 2013).

De las diferentes poblaciones de linfocitos se ha reportado que en pacientes con COVID-19 hay cambios en la expresión de las ectoenzimas CD39 y CD73, ya que son moléculas que participan en diferentes fenómenos inflamatorios, y en particular en el trabajo de Ahmadi y colaboradores se demostró mediante citometría de flujo que el porcentaje de expresión de CD73 se redujo en las células T CD8, NK y NKT. Por otra parte, con respecto a la expresión de CD39 en estos mismos pacientes no se observaron diferencias significativas en las diferentes subpoblaciones de linfocitos que se evaluaron (Ahmadi *et al.*, 2020).

Los neutrófilos expresan ampliamente CD39 y CD73, los cuales parecen ser críticos en la regulación de la actividad de los neutrófilos al controlar los gradientes purinérgicos extracelulares, ya que, la actividad inadecuada del eje CD39 / CD73 se ha asociado con la activación amplificada y descontrolada de neutrófilos, funciones quimiotácticas amplificadas y mayor adhesión al endotelio vascular (Pulte *et al.*, 2007). Por otro lado, al regular las concentraciones de purina en el espacio extracelular, el sistema CD39 / CD73 es importante para ajustar la diferenciación y la actividad de los monocitos y macrófagos; en particular, la falta de CD39 conduce a la acumulación de ATP, lo que estimula tanto a macrófagos como monocitos para liberar una gran cantidad de citocinas proinflamatorias, como IL-1 β , IL-18, IL-6 y TNF- α (Zanin *et al.*, 2012).

CD39 y CD73 también participan en la organización del tráfico de leucocitos en respuesta a estímulos quimiotácticos al desencadenar un cambio rápido y dinámico en la concentración pericelular de purinas en la proximidad de células endoteliales e inmunes inflamatorias, éstas enzimas pueden influir en la adhesión de las células inmunitarias a la capa endotelial y dicha adhesión generalmente es estimulada por concentraciones altas de ATP y reducida por niveles aumentados de adenosina (Salmi and Jalkanen, 2005).

Por otro lado, hay evidencia de que la expresión de CD39 en los monocitos regula el secuestro de estas células en el tejido cerebral isquémico e inhibe su quimiotaxis, adhesión y capacidad de trans migración (Hyman *et al.*, 2009). Y Se demostró que la liberación de ATP y la conversión en adenosina por la migración de neutrófilos está polarizada para guiar la migración de los neutrófilos hacia el sitio inflamatorio (Chen *et al.*, 2006).

Finalmente, tanto CD39 como CD73 son un mecanismo importante que puede proteger contra la sepsis ya que la actividad de la ectonucleotidasa aumenta en linfocitos y macrófagos de ratones sépticos (Vuaden *et al.*, 201; Savio *et al.*, 2017) y se ha observado que CD39 disminuyó la inflamación y mejoró la supervivencia de los ratones sépticos debido a su capacidad para eliminar ATP extracelular (eATP) (Csóka *et al.*, 2015). Además, la sobreexpresión de CD39 inhibió la activación del inflammasoma NLRP3, lo que disminuye la inflamación y mitiga la lesión orgánica inducida por sepsis (Yang *et al.*, 2019); además el bloqueo utilizando un enfoque farmacológico de CD73 con el antagonista selectivo de CD73 AMPCP (2 x 2 mg / kg al día) disminuye la supervivencia, el aclaramiento bacteriano y aumentó la producción de citocinas (TNF- α , IL-6, IL-12) y quimiocinas (MCP-1, MIP-1 α) en la sepsis inducida por ligadura y punción cecal (CLP); de igual manera, la delección genética de CD73 aumenta la lesión inflamatoria del pulmón y el riñón inducida por sepsis (Haskó *et al.*, 2011).

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS) es una respuesta del organismo ante lesiones tisulares inespecíficas causados por eventos infecciosos o no infecciosos. Si este SIRS se desencadena por una infección y provoca disfunción orgánica, se define como sepsis. La sepsis es una condición clínica con amplias anomalías fisiológicas y bioquímicas; actualmente se define como la disfunción orgánica potencialmente mortal causada por la respuesta desregulada del hospedero a la infección por lo que es una de las principales causas por las que ingresan pacientes a las unidades de cuidados intensivos.

La SIRS y la sepsis son patologías que corresponden a un proceso de inflamación sistémica aguda y severa. Se caracterizan por un desbalance en la producción de citocinas, exacerbación del daño celular y tisular, activación del sistema inmunológico, endotelial y de coagulación. Puede llegar a provocar síndrome de la disfunción orgánica múltiple e incluso la muerte si no se logra controlar a tiempo. La elevada mortalidad es una de las razones por las cuales se les considera un problema de salud hospitalaria.

Entre los pacientes hospitalizados, se ha reportado que, el 15 % cumplió con al menos dos criterios de SIRS, en los que se informaron tasas de mortalidad más altas. La sepsis también es un problema de salud importante con una alta morbilidad y mortalidad. Aproximadamente 49 millones de personas se ven afectadas por sepsis cada año y se estima que 11 millones de muertes son causadas por este síndrome, lo que representa hasta el 19,7% de todas las muertes a nivel mundial.

A pesar de que los avances sobre la comprensión del origen, la fisiopatología y los mecanismos inmunológicos de la sepsis ha progresado durante las últimas tres décadas, falta conocer con mayor profundidad acerca de esta patología.

3. JUSTIFICACIÓN

En la resolución del proceso inflamatorio, existen diversos mecanismos y uno de ellos es la adenosina, la cual es producida por las ectoenzimas CD39 y CD73 que impulsan un cambio en el entorno proinflamatorio generado por la presencia de ATP hacia un entorno antiinflamatorio inducido por adenosina. Se ha descrito que las concentraciones extracelulares de adenosina (por medio de la desfosforilación de ATP) aumentan rápidamente en respuesta a hipoxia tisular y daño asociado con sepsis; durante la inflamación sistémica o sepsis la adenosina interactúa con receptores expresados en las células inmunes a través de los cuales puede ejercer efectos antiinflamatorios e inmunosupresores. Por tanto, la importancia del estudio y comprensión de los mecanismos de la liberación de ATP en eventos inflamatorios, y su degradación a adenosina a través de estas dos ectoenzimas presentes es relevante y se ha convertido en un foco de atención en el tratamiento de sepsis.

Al momento existe poca evidencia tanto en SIRS como en sepsis de la importancia que pueden representar las ectoenzimas CD39 y CD73, así como los cambios en su expresión en las diferentes células del sistema inmunológico presentes en sangre periférica. Teniendo en cuenta que, a pesar del progreso sustancial en el tratamiento de pacientes con sepsis, esta sigue siendo un importante problema de salud pública tanto en México como a nivel mundial con alta mortalidad hospitalaria resulta relevante comprender mejor acerca de las diferentes moléculas y mecanismos involucrados que podrían contribuir a brindar información eficiente para realizar un mejor diagnóstico de los pacientes que presentan tanto SIRS como sepsis.

4. Pregunta de investigación

¿La expresión de CD39 y CD73 en linfocitos, neutrófilos y monocitos se verá incrementada en pacientes con SIRS y/o pacientes con sepsis?

5. Objetivo general

Determinar en pacientes con SIRS o sepsis, así como sujetos sanos, la expresión de CD39/CD73 de membrana en linfocitos, neutrófilos y monocitos.

5.1 Objetivos particulares

- Determinar en pacientes con SIRS y pacientes con sepsis la expresión de CD39 o CD73 en linfocitos, neutrófilos y monocitos.
- Evaluar la coexpresión de CD39 y CD73 en linfocitos, neutrófilos y monocitos de pacientes con SIRS y pacientes con sepsis
- Evaluar en subpoblaciones de monocitos clásicos, intermedios y no clásicos de pacientes con SIRS y sepsis la coexpresión de CD39 o CD73.

6. Hipótesis

Ha: En pacientes con SIRS y pacientes con sepsis, se verá incrementada la expresión de CD39 / CD73 de membrana en los linfocitos, neutrófilos y monocitos.

Ho: En pacientes con SIRS y pacientes con sepsis, no habrá un incremento en la expresión de CD39/CD73 de membrana en los linfocitos, neutrófilos y monocitos.

7. MÉTODO

7.1 Diseño del estudio

Prospectivo, transversal, comparativo, observacional.

7.2 Universo de trabajo

Se incluyeron pacientes adultos ingresados en la Unidad de Cuidados Intensivos (UCI) del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional "Siglo XXI" del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) y del Hospital General de México con diagnóstico de sepsis de reciente inicio (menos de 48 horas) y pacientes con diagnóstico de SIRS.

7.3 Población de Estudio

- Grupo de voluntarios Sanos (controles)
- Grupo de pacientes con SIRS
- Grupo de pacientes con Sepsis

7.4 Selección de Pacientes

Criterios de inclusión

- Pacientes ingresados en la UCI con diagnóstico de SIRS o sepsis, con menos de 48 horas de evolución de acuerdo con los criterios de la ACCP.
- Pacientes de sexo indistinto.
- Pacientes con edad entre 18 y 60 años.
- Pacientes de quienes se obtuvo directamente o de parte del familiar (representante legal) el consentimiento informado firmado.

Criterios de no inclusión

- Pacientes o familiares que rechazaron participar en el estudio.
- Pacientes con infecciones por HIV, hepatitis B o C, y/o con diagnóstico previo de enfermedades autoinmunes (lupus o artritis reumatoide), tiroideas y oncológicas.

- Pacientes con reacciones alérgicas de menos de 3 meses de evolución secundarios a alérgenos, transfusiones o medicamentos.
- Pacientes que en los tres días al ingreso al protocolo hayan recibido terapia con inmunosupresores o inmunomoduladores.
- Embarazo.
- Pacientes con comorbilidades como diabetes, hipertensión arterial, falla renal o falla hepática.
- Pacientes que, en los quince días previos a su ingreso al proyecto hayan sido sometidos a procedimiento quirúrgico a fin de eliminar focos infecciosos (abscesos, peritonitis, apendicitis, perforación intestinal).

Criterios de exclusión

- Pacientes con expediente clínico incompleto.

Criterios de eliminación

- Pacientes que se retiraron del estudio.
- Pacientes cuyas muestras sanguíneas no fueron factibles de procesar por situaciones inherentes a la toma y/o calidad de la misma.

7.5 Obtención de las muestras

La toma de las muestras se llevó a cabo del catéter central con previa asepsia de la zona y drenado del mismo. Los médicos especialistas colaboradores en el proyecto fueron quienes recolectaron 3 mL de sangre periférica en tubos con heparina de litio como anticoagulante.

7.6 Recolección de datos clínicos

Utilizando una hoja de recolección de datos ver anexo 1 se recabó la información de identificación de cada paciente, así como el diagnóstico, evolución, variables clínicas y de laboratorio que se relacionan con la gravedad de la enfermedad y la evolución de los pacientes. Toda esta información se manejó como información

confidencial, salvaguardando la privacidad de cada persona participante en el estudio.

7.7 Inmunofenotipificación de leucocitos

Para la identificación y clasificación de los leucocitos por inmunofenotipificación, se llevó a cabo el protocolo que se describe en la figura 7. Lo primero que se hizo fue realizar la lisis de los eritrocitos por choque osmótico, agregando 200 µl de sangre periférica en un tubo de citometría donde se adicionaron 1,300 µl de solución de lisis de eritrocitos 10X (cloruro de amonio [NH₄Cl] al 0.5 M) y se dejó incubar durante 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se le adicionó 1 mL de solución amortiguadora de fosfatos (PBS 1X) y se centrifugó la muestra durante 5 minutos a 383 g para la recuperación del concentrado leucocitario. Terminada la centrifugación, se decantó el sobrenadante obteniendo un botón de leucocitos, el cual se resuspendió en PBS 1X para obtener una concentración de 1x10⁶ células/mL. De esta suspensión celular, se tomaron 1x10⁵ células (50 µl) y se colocaron en alguno de los siguientes cuatro tubos de citometría rotulados de la siguiente manera: **AF**: Autofluorescencia, **FMO/CD39**: fluorescencia menos uno/CD39, **FMO/CD73**: fluorescencia menos uno/CD73 y **T**: Panel completo para Inmunofenotipificación (Tinción completa). En cada tubo de citometría se agregó cada uno de los anticuerpos como se muestra en la tabla 4.

Tabla 4. Anticuerpos para la inmunofenotipificación de leucocitos de acuerdo con cada control.

Tubo	Anticuerpo				
	CD45	CD14	CD16	CD39	CD73
AF					
FMO/CD39	+	+	+		+
FMO/CD73	+	+	+	+	
T	+	+	+	+	+

En la tabla 5 se muestra el volumen que se le añadió a cada tubo de cada uno de los anticuerpos empleados en el panel para la inmunofenotipificación de leucocitos.

Tabla 5. Panel de anticuerpos utilizados para la inmunofenotipificación.

Anticuerpo	Fluorocromo	Clona	Marca	Volumen (µL)
αCD45	P. Blue	HI30	Invitrogen	1
αCD14	PE Cy7	M5E2	Biolegend	1
αCD16	APC Cy7	3G8	Biolegend	1
αCD39	FITC	A1	Biolegend	2.5
αCD73	PE	AD2	Biolegend	2.5

α= equivale anti-CD (la especificidad del anticuerpo)

Una vez colocada la muestra en los tubos con los anticuerpos señalados, se incubaron durante 15 minutos en oscuridad a temperatura ambiente. Pasado este período de tiempo se agregaron 300 µl de una dilución 1:10 de solución de lisis y fijado comercial (BD FACS™ Lysing Solution Cat. 349202, San Jose California, EUA) y se dejó incubar por 10 minutos en oscuridad a temperatura ambiente. A continuación, se agregó 1 ml de PBS a cada y se centrifugaron durante 5 min a 383 g; al finalizar y cuidando no agitar el tubo, se decantó el sobrenadante y se resuspendió el botón celular en 50 µl de PBS (Figura 5).

Finalmente, en un citómetro FACS Aria Ilu con configuración B5R2V2 (BD™ Biosciences, San José, CA, USA) se capturaron al menos 5 mil eventos correspondientes a los monocitos (células analizadas individualmente FSC^{med}SSC^{med}CD45^{med}CD14^{+/-}CD16^{-/+}). Este citómetro se encuentra en el Laboratorio Centro de Instrumentos de Citometría de la Coordinación de Investigación en Salud del IMSS. Se ubica en la planta baja del Hospital de Especialidades de CMN "Siglo XXI" del IMSS. Los archivos FCS 3.0 obtenidos se analizaron utilizando el programa de análisis Infinicyt versión 1.8 (Cytognos™, Salamanca, España).

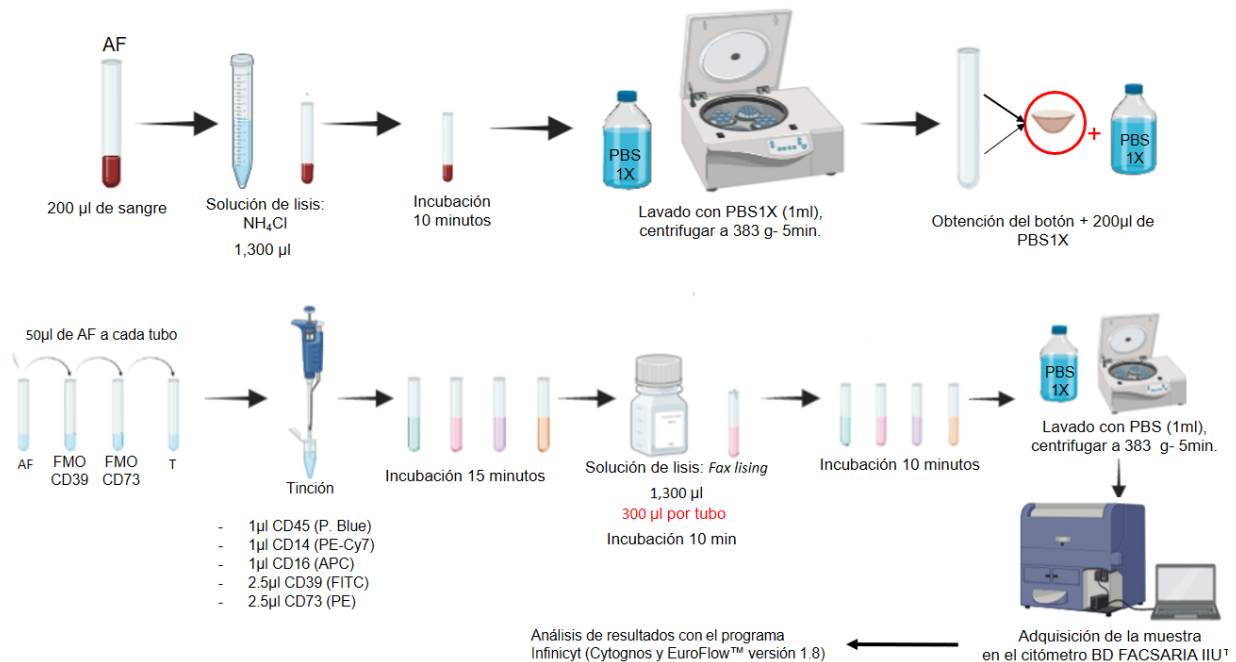


Figura 5. Protocolo general para la inmunofenotipificación de leucocitos. Desarrollo del procesamiento de muestras que se llevó a cabo en voluntarios sanos, pacientes con SIRS y pacientes con sepsis.

7.8 Análisis de datos de citometría de flujo

Como se muestra en la figura 6, utilizando el software Infinicyt, se llevó a cabo el análisis de los datos aplicando el siguiente algoritmo: Para la identificación de leucocitos se seleccionaron los eventos sencillos (células analizadas individualmente sin agregados), en una gráfica con la altura del parámetro del tamaño contra el área del parámetro de tamaño (FCS-H y FCS-A, Figura 6a); además se utilizó una gráfica de tamaño (FSC-A) vs complejidad (SSC-A) para identificar a las células, excluyendo así a los detritus (Figura 6b) y una gráfica de CD45 vs complejidad (SSC) para seleccionar solo a los eventos CD45+ (Figura 6c). Después, a partir de los marcadores celulares (CD45, CD14, CD16), así como de acuerdo con sus características de tamaño y complejidad, se clasificaron los leucocitos en: linfocitos (FSC^{low} , SSC^{low} , $CD45^{hi}$, $CD14^{-}$), neutrófilos (FSC^{hi} , SSC^{hi} , $CD45^{low}$, $CD14^{-}CD16^{+}$) y monocitos totales (FSC^{med} , SSC^{med} , $CD45^{med}$ y la expresión diferencial de CD14 y CD16) (ver figura 6d).

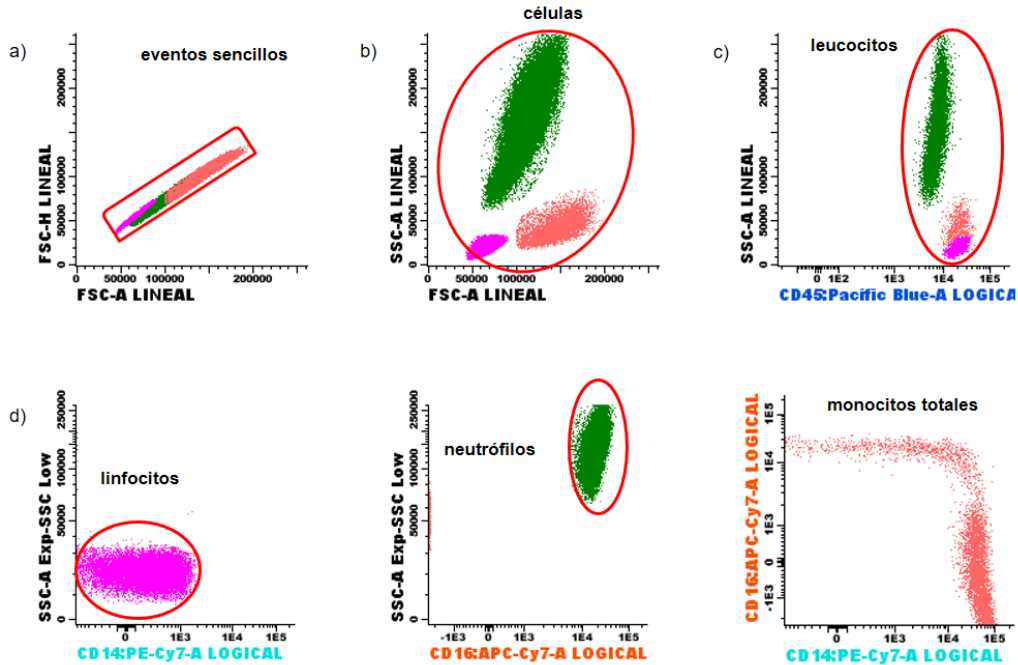


Figura 6. Estrategia general de análisis para la identificación de leucocitos y sus subpoblaciones. a) Selección de eventos sencillos, b) Selección de las células, c) Identificación del patrón correspondiente a leucocitos mediante su complejidad (detector SSC) y la expresión del marcador CD45 (CD45+), d) Selección de las poblaciones de leucocitos mediante su complejidad y la expresión diferencial de los marcadores CD14 y CD16.

Para la identificación de las subpoblaciones de monocitos se utilizó la expresión diferencial de los marcadores CD14 y CD16, subclasificándose como se presenta en la figura 7 en: monocitos clásicos (CD14⁺CD16⁻), monocitos intermedios (CD14⁺CD16⁺) y monocitos no clásicos (CD14⁻CD16⁺).

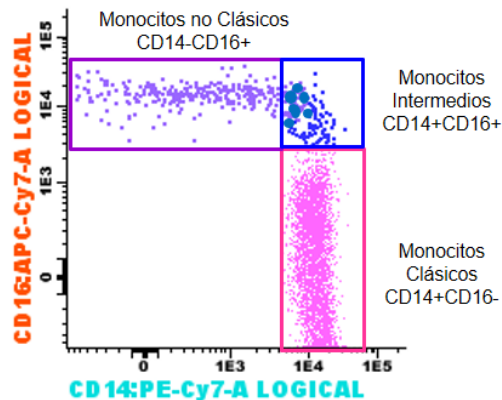


Figura 7. Estrategia de análisis para la identificación de las subpoblaciones de monocitos. Se realizó la selección de las subpoblaciones de monocitos mediante los marcadores CD14 y CD16 en donde se observa a los monocitos clásicos CD14⁺CD16⁻ (identificados con color rosa), los monocitos intermedios CD14⁺CD16⁺ (marcados con color azul) y los monocitos no clásicos CD14⁻CD16⁺ (marcados con color morado).

Una vez identificados linfocitos, neutrófilos, monocitos y sus subpoblaciones se caracterizaron por la expresión diferencial de CD39 y CD73.

Para establecer a las células positivas a CD39 (Figura 8a) o CD73 (Figura 8b) de cada subpoblación (linfocitos, neutrófilos, monocitos y sus subpoblaciones) se utilizó el control de fluorescencia menos uno “FMO” correspondiente.

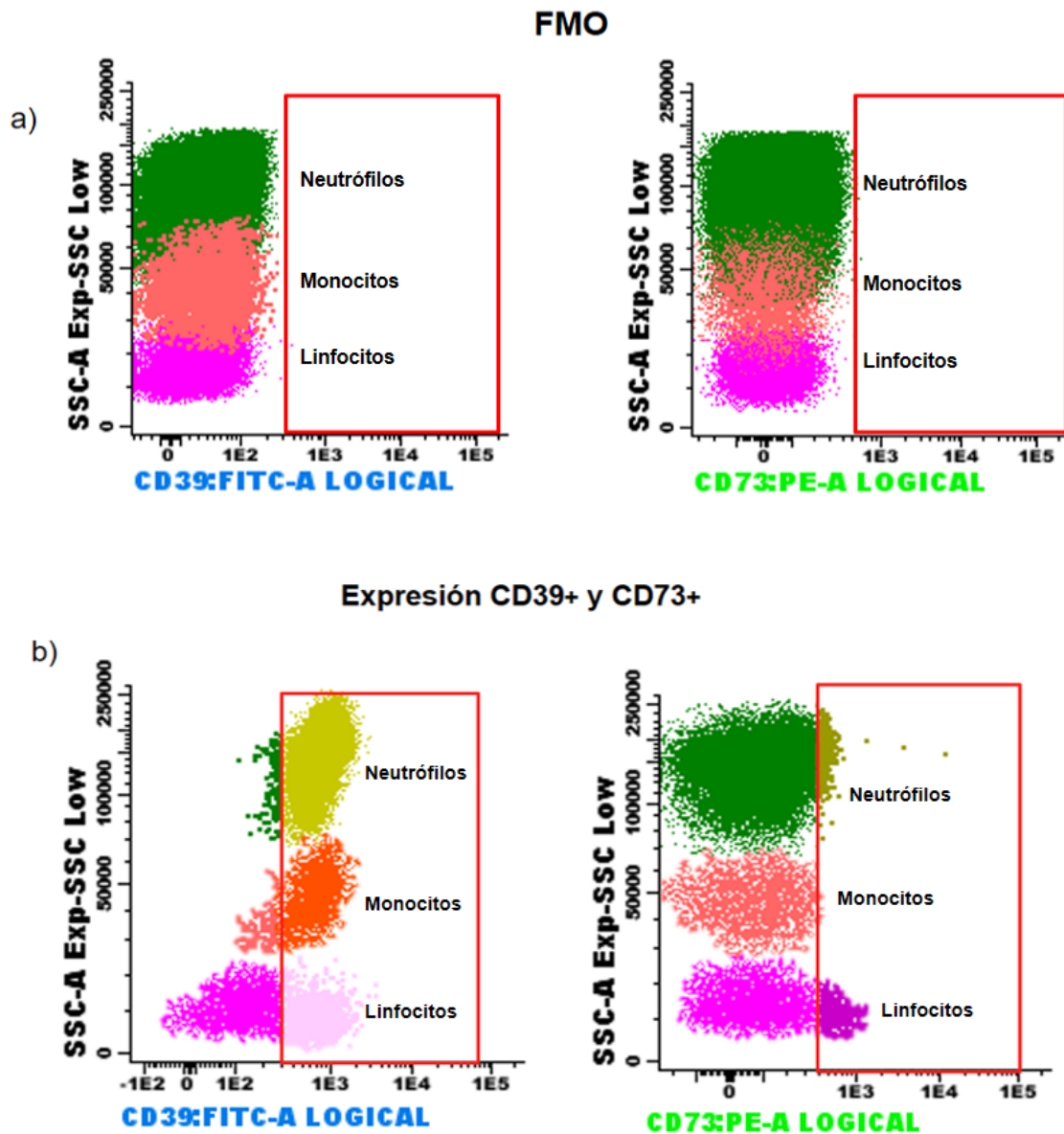


Figura 8. Gráficos de puntos para establecer las células con expresión de ectonucleotidasas CD39 y CD73. Graficando el parámetro complejidad (SSC) vs CD39(a) o CD73(b) se determinó el límite para identificar a las células CD39+ o CD73+ utilizando el control de fluorescencia menos uno (FMO).

Para identificar a las poblaciones dobles positivas ($CD39^+CD73^+$) en cada población de leucocitos y subpoblaciones de monocitos se utilizaron gráficos de puntos (dot plots) con los parámetros CD39 vs CD73 a los que también se les aplicaron los FMO correspondientes para asegurar la selección de únicamente las células que expresaban a estos marcadores.

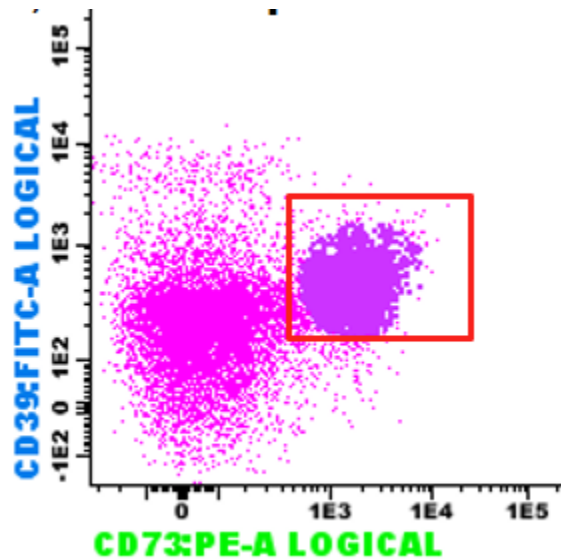


Figura 9. Caracterización de las células con doble expresión de CD39 y CD73 ($CD39^+CD73^+$). A partir de la identificación de los subtipos de leucocitos, de la población de linfocitos se utilizó una gráfica de puntos para identificar, de acuerdo con el control de fluorescencia menos uno (FMO) y controles internos negativos, se estableció la población positiva CD39 y CD73 ($CD39^+CD73^+$).

7.9 Análisis Estadístico

De los datos obtenidos de los inmunofenotipos se les aplicó la prueba U de Mann Whitney, para establecer si existe diferencia en la expresión de marcadores entre los pacientes con SIRS y pacientes con sepsis; se tomaron los porcentajes de é positivas y por otro lado las medias de la intensidad de fluorescencia que se relaciona con la e diferencial.

8. RESULTADOS

Para la presente tesis se incluyeron un total de 16 personas que se distribuyeron en los siguientes subgrupos: controles sanos n=4, pacientes con SIRS, n=4; y pacientes con sepsis, n=6. En la tabla 6 se incluyen las características demográficas de cada grupo, la distribución de género y edad es similar en todos los grupos analizados. Como era de esperarse los sujetos con inflamación sistémica, tanto SIRS como sepsis, presentan diferencias significativas respecto a la frecuencia cardiaca y el número de leucocitos circulantes; los pacientes con SIRS y sepsis presentan taquicardia y leucocitosis.

Tabla 6. Características demográficas de los voluntarios sanos (controles) y pacientes analizados.

	Sanos (n = 4)	Pacientes SIRS (n = 4)	Pacientes Sepsis (n = 6)
Edad	27±9	45	38 ± 13
Género (F:M)	2:2	2:2	3:3
FC (latidos/min)	77 ± 9*	88 ±28	94 ±26
FR (respiraciones/min)	19 ±2	17 ± 2.6	18 ± 5
Temperatura (°C)	36 ± 0.3	36.5 ± 0.5	36 ± 0.4
Leucocitos circulantes (10⁶/mm³)	6.9 ± 1.5*	14.4 ± 3.5	14.7 ± 5.6
Presión Arterial	108/70	122/78	109/65
SOFA	NA	2.0	2.0
APACHE	NA	4.0	9.0

*p<0.05 respecto a pacientes con SIRS o Sepsis. ANOVA

Como se detalla en la sección de material y métodos, con las muestras de sangre periférica, se realizó la inmunofenotipificación de leucocitos para la identificación de linfocitos, neutrófilos, monocitos y subpoblaciones de monocitos, así como la

expresión de CD39/CD73. En cuanto a la expresión de CD39 y CD73, aquí reporta tanto el porcentaje de células que son positivas (%) como la expresión de estas moléculas, expresado como el valor de la media de la intensidad de fluorescencia (MIF).

Para la subpoblación de linfocitos tanto el porcentaje de células CD39+ (Figuro 10a) como su expresión diferencial (Figura 10b) no se modifica entre pacientes con SIRS o sepsis, como tampoco presenta diferencias significativas con los sujetos sanos. En cuanto a la expresión de CD73, aunque hay una tendencia a que el porcentaje de células en menor en los pacientes en comparación con la de sujetos sanos, esta no alcanza diferencia significativa (Figura 10c), como tampoco hay diferencias respecto a la expresión entre los grupos comparados (Figura 10d).

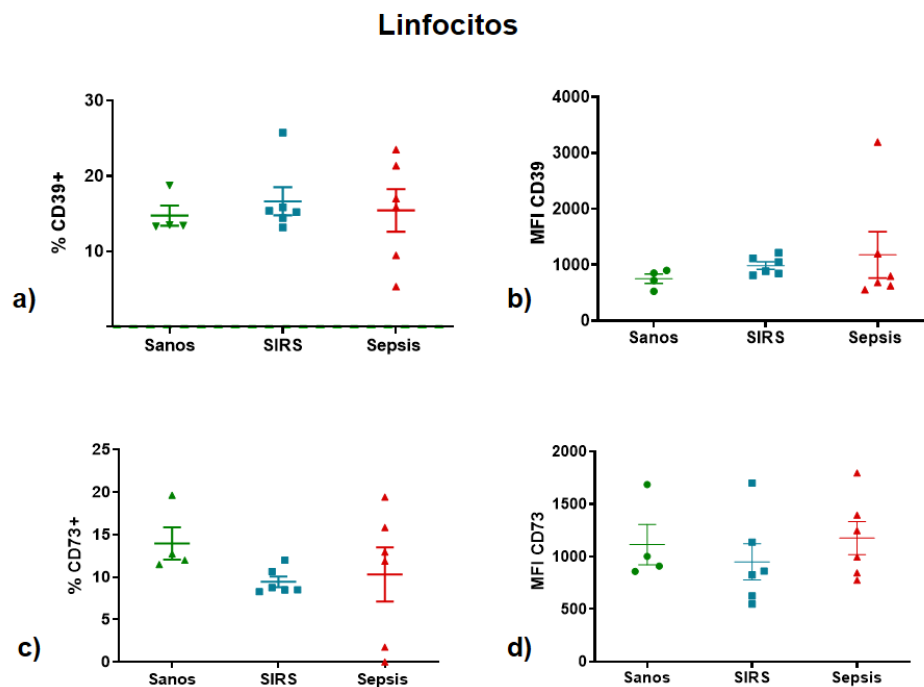


Figura 10. Expresión de CD39 y CD73 en linfocitos. Se muestra el porcentaje de linfocitos totales en los que se expresa CD39 (a) o CD73 (c). Utilizando los valores de la Intensidad media de fluorescencia, se presenta la expresión diferencial de CD39 (b) o CD73 (d) en linfocitos totales. Prueba estadística U de Mann Whitney, Media \pm SEM ($p < 0.05$).

Por la importancia de las células de la inmunidad innata y particularmente de las células mieloides con capacidades fagocíticas, se decidió también comparar tanto

el porcentaje de células positivas como la MIF para la ectoenzima CD39 y para CD73 en neutrófilos, monocitos y sus subpoblaciones.

Para los neutrófilos, como se muestra en la figura 11, si hay diferencias significativas en la expresión tanto de CD39 como CD73. Para CD39 tanto en el porcentaje de células (Figura 11a) como en la MIF (Figura 11b), respecto a pacientes con SIRS, es menor la expresión en los neutrófilos provenientes de pacientes con sepsis ($p < 0.05$). Lo contrario se observa para la expresión de CD73, que en los neutrófilos de pacientes con sepsis es significativamente la MIF, respecto a pacientes con SIRS (Figura 11d).

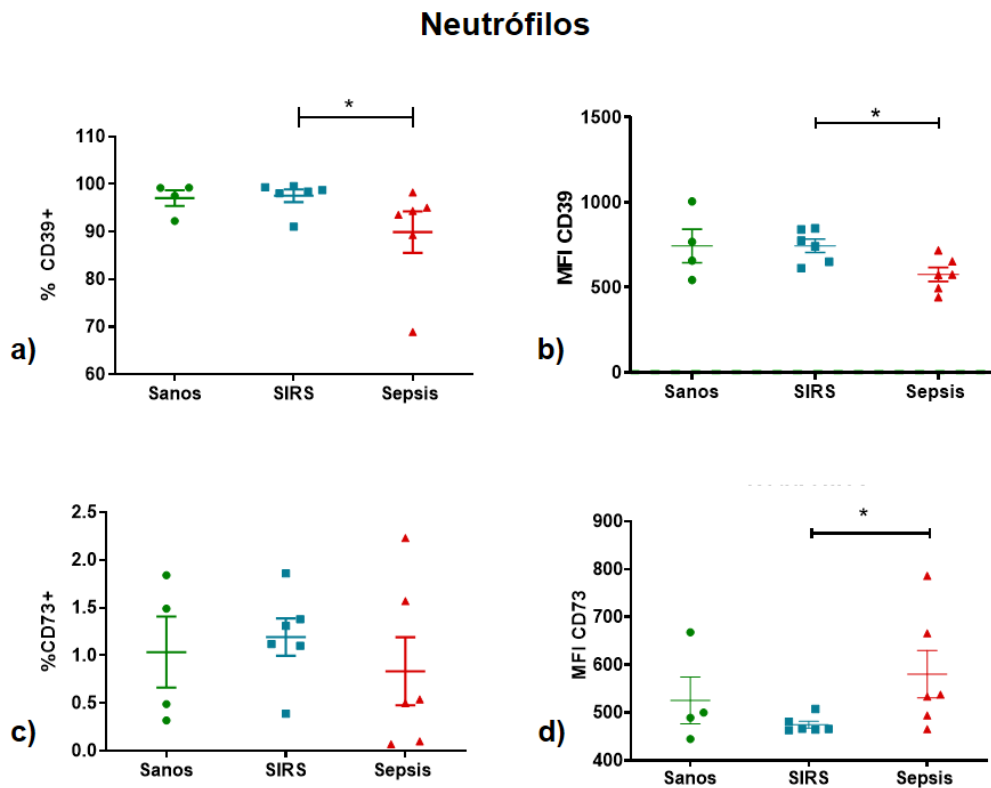


Figura 11. Expresión de CD39 y CD73 en neutrófilos. Una vez identificados los neutrófilos (leucocitos $CD45^{low}$, SSC^{high} $CD16^{+}$) se determinaron: el porcentaje de estos se expresa CD39 (a) o CD73 (c). Utilizando los valores de la Intensidad media de fluorescencia (MIF), se determinó la expresión diferencial de CD39 (b) o CD73 (d) en linfocitos totales. Prueba estadística U de Mann Whitney, Media \pm SEM ($*p < 0.05$).

El otro tipo de células mieloides circulantes relevantes en los procesos de inflamación sistémica son los monocitos. Como se observa en la figura 12, la expresión del porcentaje de células CD39+ o CD73+, así como la expresión de CD73 determinada por la MFI, no presentan diferencias significativas entre los grupos (Figura 12a, c y d). Sin embargo, si hay mayor expresión de CD39 en los monocitos de pacientes con SIRS en comparación de aquellos con sepsis ($p < 0.05$) y la misma tendencia respecto a controles sanos.

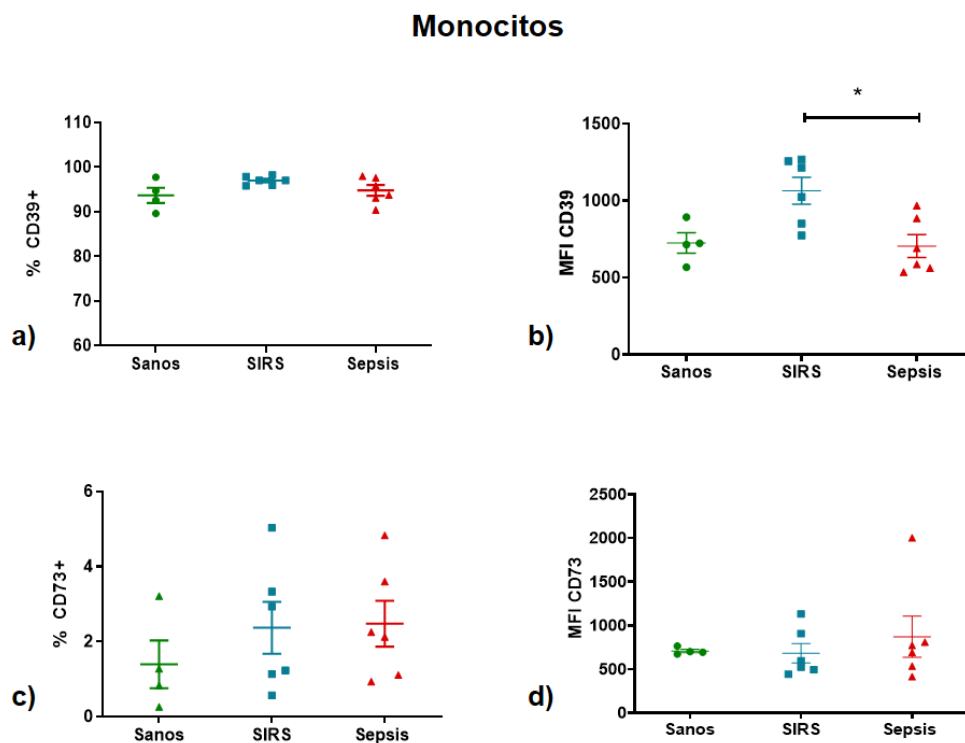


Figura 12. La expresión de CD39 es mayor en monocitos con pacientes con SIRS. Una vez identificados los monocitos, se determinaron los porcentajes de esta subpoblación leucocitaria: a) CD39+ o c) CD73+, en leucocitos obtenidos de pacientes con SIRS, sepsis o sujetos sanos. La expresión diferencial de estas moléculas se determinó por el valor de la media de la intensidad de fluorescencia para b) CD39 o d) CD73. Prueba estadística U de Mann Whitney, Media \pm SEM (* $p < 0.05$).

Ya que en los monocitos totales se observa diferencia estadísticamente significativa en la expresión de CD39 entre los pacientes con SIRS y los pacientes sépticos, se decidió evaluar dicha expresión en cada una de las subpoblaciones de monocitos con la finalidad de determinar si esa diferencia era específica de alguna subpoblación. Como se observa en la figura 13, el porcentaje de monocitos clásicos que expresan CD39 o CD73 (Figura 13a y 13c), así el nivel de expresión de CD73 es la misma en los grupos de pacientes analizados (SIRS y sepsis), así como respecto a las células de voluntarios sanos. Sin embargo, la expresión de CD39, determinada por la MFI es respecto a sujetos sanos significativamente mayor en los monocitos clásicos de pacientes con SIRS, pero no así con los pacientes sépticos.

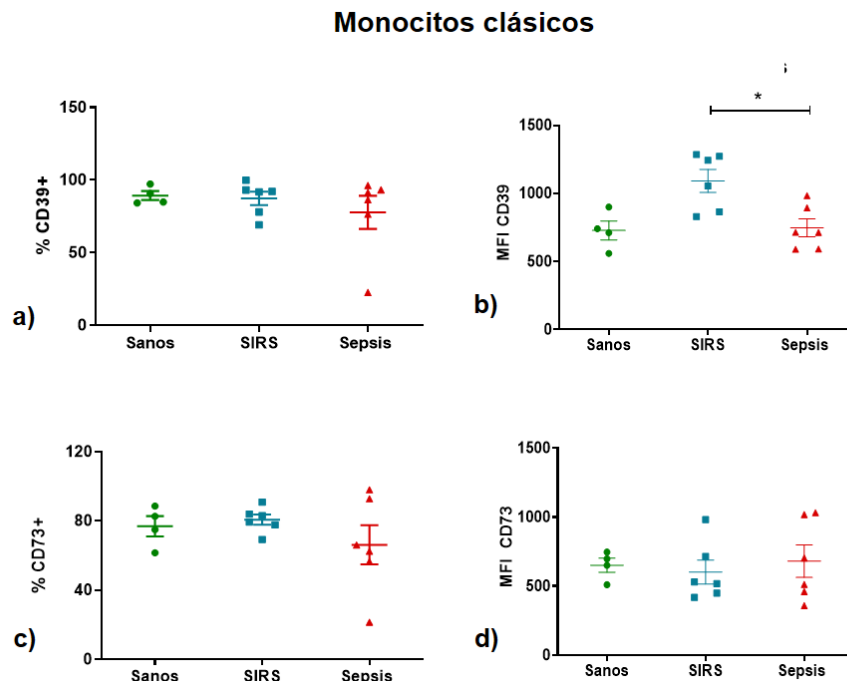


Figura 13. La expresión de CD39 en monocitos clásicos es mayor en pacientes con SIRS. Una vez identificados los monocitos clásicos ($FSC^{med}SSC^{med}CD45^{med}CD14^{+}CD16^{-}$) en muestras de sangre periférica de pacientes con SIRS o sepsis, se determinó el porcentaje de estas células: a) CD39+ o c) CD73+. La expresión diferencial de estas moléculas se determinó por el valor de la media de la intensidad de fluorescencia para b) CD39 o d) CD73. Prueba estadística U de Mann Whitney, Media \pm SEM (* $p < 0.05$).

Como se observa en la figura 14, para monocitos intermedios y no clásicos, no hay diferencias en la expresión de CD39 o CD73 entre las condiciones de los pacientes SIRS o sepsis, ni respecto a controles sanos.

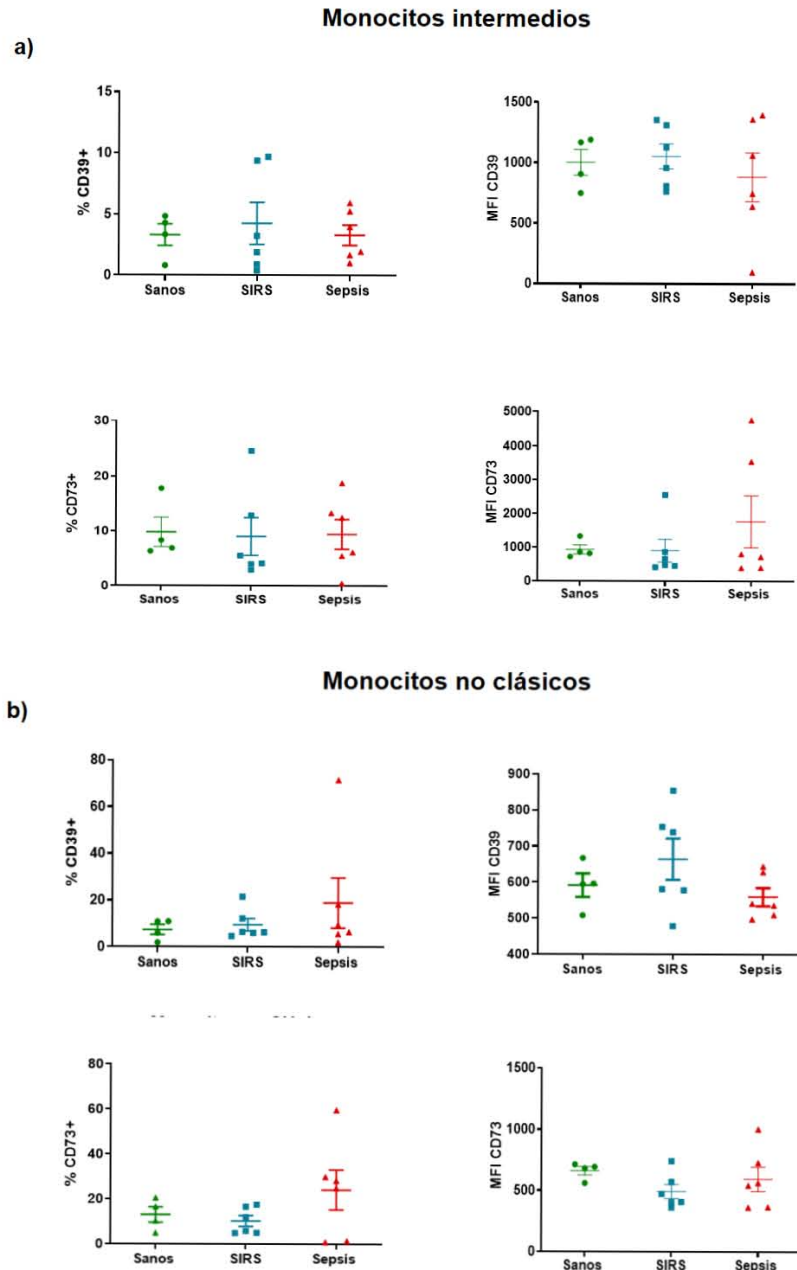


Figura 14. La expresión de CD39 y CD73 en monocitos intermedios y no clásicos no se modifica en pacientes con SIRS o sepsis respecto a los sujetos sanos. Una vez identificados los monocitos intermedios ($FSC^{med}SSC^{med}CD45^{med}CD14^+CD16^+$) en muestras de sangre periférica de pacientes con SIRS o sepsis, se determinó: a) el porcentaje de estas células CD39+ o CD73+ y su expresión diferencial por el valor de la media de la intensidad de fluorescencia (MFI). Esto mismo se determinó para monocitos no clásicos ($FSC^{med}SSC^{med}CD45^{med}CD14^-CD16^+$). Prueba estadística U de Mann Whitney, Media \pm SEM (* $p < 0.05$).

Como se mencionó anteriormente estas ectoenzimas trabajan conjuntamente en la producción de adenosina, por lo que se tuvo el interés en comparar el porcentaje de células CD39+CD73+, o sea doble positivas en las subpoblaciones de leucocitos de pacientes con SIRS o sepsis. Solo en la población de neutrófilos es que se observa un porcentaje significativamente menor de estas células dobles positivas en pacientes con sepsis en comparación a sujetos con SIRS y la misma tendencia respecto a controles sanos. Linfocitos, monocitos y sus subpoblaciones no tuvieron diferencia significativa en la co-expresión de estas ectoenzimas.

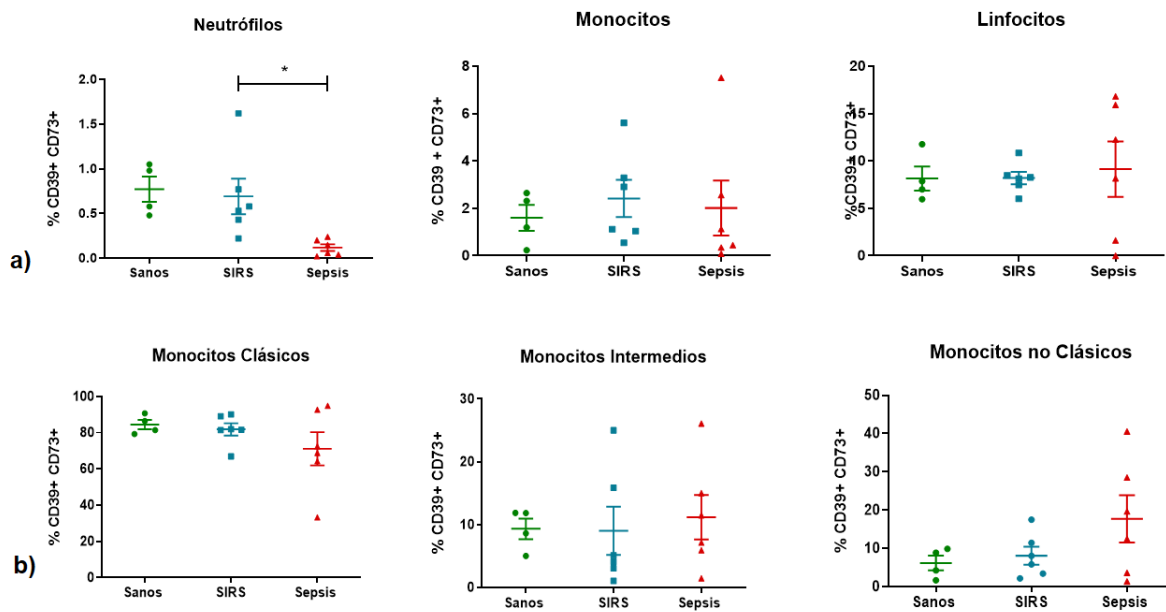


Figura 15. En pacientes con sepsis el porcentaje de neutrófilos CD39+CD73+ es menor que en los pacientes con SIRS. a) Una vez identificados los neutrófilos ($FSC^{het}SSC^{hi}CD45^{low}CD14^{-}CD16^{+}$), monocitos ($FSC^{med}SSC^{med}CD45^{med}CD14^{-/+}CD16^{-/+}$) y linfocitos ($FSC^{low}SSC^{low}CD45^{hi}CD14^{-}CD16^{-}$) en muestras de sangre periférica de pacientes con SIRS o sepsis, se determinó el porcentaje CD39+CD73+. b) en los subtipos de monocitos: clásicos, intermedios y no clásicos se determinó el porcentaje de células CD39+CD73+). Prueba estadística U de Mann Whitney, Media \pm SEM (* $p < 0.05$).

9. DISCUSIÓN

Los síndromes asociados a inflamación sistémica como SIRS y sepsis siguen siendo un desafío en la medicina de emergencia al presentar una alta mortalidad debido a una respuesta inmune desregulada, inestabilidad hemodinámica, disfunción orgánica y supresión inmune prolongada (Kiers *et al.*, 2017).

En estas condiciones de inflamación sistémica existe la liberación de diversos nucleótidos, por ejemplo, ATP o ADP, capaces de actuar como patrones moleculares asociados a daño (DAMPs) que son reconocidos por receptores de reconocimiento de patrones (PRRs), en este caso conocidos como receptores purinérgicos (Idzko, Ferrari and Eltzschig, 2014). Entre algunas de las funciones que presentan estos receptores, se encuentra la conversión de ATP/ADP en adenosina dentro del compartimento extracelular por la actividad de ectonucleotidasas CD39 y CD73, desplazando la actividad proinflamatoria de las células inmunitarias como los leucocitos, impulsadas por ATP hacia un estado antiinflamatorio mediado por adenosina (Antonioli, Pacher, E. Sylvester Vizi, *et al.*, 2013).

Se sabe que las ectoenzimas, específicamente las ectonucleotidasas, desempeñan un papel importante en el tráfico de leucocitos. Sin embargo, CD39 ha sido reconocido como un punto de control crítico en la regulación de la acumulación de leucocitos dentro de los tejidos hipóxicos (Salmi and Jalkanen, 2005). Por otro lado, la expresión de CD73 aumenta en los sitios de inflamación por el IFN- α , y en condiciones hipóxicas, por HIF-1 α (Thompson, *et al.*, 2004; Niemela, *et al.*, 2004.), conduciendo a una mayor producción de adenosina, siendo uno de los mecanismos de protección que aumenta la permeabilidad de las células endoteliales y limita el tráfico de leucocitos a los sitios de inflamación (Salmi, M., and Jalkanen, S., 2005).

Nuestros resultados muestran que en condiciones de inflamación sistémica como es en el caso de SIRS y sepsis el porcentaje de células CD39 y CD73 positivas en linfocitos, neutrófilos, monocitos y sus subpoblaciones se correlaciona con lo realizado por otros autores, Reutershan y colaboradores determinaron la frecuencia CD39 y CD73 en leucocitos (linfocitos, monocitos y neutrófilos) en un modelo murino al que le ocasionaron lesión pulmonar mediante la administración intranasal de LPS

y evaluaron ambas moléculas; ellos observan que dichas ectoenzimas incrementaron significativamente tras la estimulación con LPS, lo cual se asemeja de cierto modo con un modelo de sepsis (Reutershan, et.al., 2008); de igual manera como se reportó en la evaluación de la expresión de estas ectoenzimas en leucocitos residentes en el corazón y leucocitos circulantes en un modelo de isquemia cardiaca, ellos determinaron que hay mayor distribución de granulocitos, monocitos y algunas subpoblaciones de linfocitos que poseen CD39 en comparación con CD73 (Bonner, et.al., 2012); sin embargo en nuestros resultados observamos que específicamente en neutrófilos hay menor % de células CD39 positivas en pacientes con sepsis en comparación con pacientes con SIRS. Esto probablemente pueda estar relacionado con la estrategia de selección de células.

Los neutrófilos son fagocitos profesionales que desempeñan un papel fundamental en la defensa del hospedero contra las infecciones, son importantes para la patogénesis de muchas enfermedades inflamatorias, (Kathryn E Barletta, Ley and Mehrad, 2012) en particular en los neutrófilos se ha demostrado que la adenosina producida por las ectoenzimas CD39 y CD73 es capaz de modular varias de sus funciones, incluidas la adhesión, transmigración, liberación de mediadores inflamatorios, fagocitosis, desgranulación y el estallido respiratorio (Kathryn E Barletta, Ley and Mehrad, 2012).

En los resultados mostrados anteriormente pudimos observar que tanto el porcentaje de neutrófilos CD39+ como la MFI en esta población de leucocitos es menor en los pacientes con sepsis en comparación con los pacientes SIRS. Y al relacionar estos dos grupos de estudio con los sujetos sanos en ambas determinaciones se observó que los pacientes con SIRS no presentan diferencias con respecto a los sanos, mientras que en los pacientes sépticos si se encontró diferencia estadística lo cual nos sugiere que hay menor cantidad de neutrófilos CD39+ y que a su vez se está perdiendo la expresión de esta ectoenzima en la participación de la regulación de la inflamación para el caso de sepsis; esto se podría explicar debido a que se sabe que en un proceso de sepsis los neutrófilos presentan un déficit en sus funciones lo que origina un estado retardado de

apoptosis que conduce a disfunción continua y daño por la liberación de neutrófilos inmaduros (Delano and Ward, 2016; Nedeva, Menassa and Puthalakath, 2019). A su vez esto podría tener relación con Corriden y colaboradores que observaron que la deficiencia de CD39 y receptores de adenosina en ratones presentaba deficiencias en el reclutamiento de los neutrófilos hacia el sitio de daño (Corriden *et al.*, 2008).

En cuanto a nuestros resultados obtenidos para CD73, podemos observar que el porcentaje de leucocitos positivos a esta ectoenzima no presentó diferencia estadística significativa entre nuestros dos grupos de estudio; esto concuerda con lo observado por Böner y cols, donde ellos muestran que hay menor frecuencia de células CD73 en las diferentes poblaciones de leucocitos en sangre periférica. No obstante, al evaluar la MFI de esta ectoenzima se observó que los neutrófilos presentan mayor expresión en pacientes diagnosticados con sepsis en comparación a los pacientes SIRS, lo cual también coincide con lo mostrado por Reutershan y cols, quienes plantean que CD73 incrementa en células que son estimuladas con LPS.

Por otra parte se ha descrito que los neutrófilos coexpresan CD39/CD73, debido a la capacidad que tienen de generar adenosina y recibir retroalimentación autocrina a través de la estimulación del receptor de adenosina (Kathryn E. Barletta, Ley and Mehrad, 2012); esto tiene relación con nuestros resultados mostrados para la coexpresión de las ectoenzimas evaluadas en el presente proyecto, específicamente en neutrófilos, donde observamos que pacientes con sepsis tienen menor porcentaje de neutrófilos que coexpresan CD39 y CD73 en comparación con pacientes con SIRS, lo cual puede ser muy probablemente debido a la desregulación generada por la inflamación sistémica que se cursa durante la sepsis y por lo tanto los neutrófilos pierden algunas de sus funciones, entre las cuales puede encontrarse la regulación del ambiente inflamatorio mediado por CD39 y CD73, a la fecha se ha descrito que neutrófilos no estimulados producen y secretan continuamente una pequeña cantidad de adenosina y que los neutrófilos activados pueden ser una fuente importante de adenosina tisular en un microambiente

inflamatorio (Junger, 2011), además de ello los neutrófilos no solo pueden secretar adenosina directamente e inhibir su degradación, sino que también liberan ATP tras la activación, que luego es procesado por CD39 y CD73 a adenosina (Chen, *et al.*, 2006; Eltzschig, Macmanus, and Colgan, 2018). De igual modo se ha reportado que los neutrófilos pueden coexpresar CD39/CD73 una vez activados en un ambiente proinflamatorio y esto puede propiciar tanto la liberación como la captación de ATP, el cual es degradado por las ectoenzimas CD39 y CD73 para generar adenosina, ésta es captada por receptores de adenosina ubicados en los neutrófilos, teniendo así como consecuencia la modulación de la migración de los neutrófilos hacia el sitio de inflamación (Kathryn E Barletta, Ley and Mehrad, 2012).

Otra de las poblaciones de leucocitos que se encargan de modular el ambiente inflamatorio y que forma parte del vínculo entre el sistema inmune innato y el sistema inmune adaptativo son los monocitos, los cuales son de gran relevancia en la progresión de la inflamación y la inmunosupresión inducida por sepsis. (Auffray, Sieweke and Geissmann, 2009). Específicamente en los monocitos existe evidencia de que la presencia de CD39 inhibe su quimiotaxis, adhesión y capacidad para transmigrar (Hyman *et al.*, 2009), por lo que esto nos puede sugerir que esta ectoenzima participa en la regulación de la inflamación.

Debido a que la población de monocitos es heterogénea, cada subpoblación se caracteriza por funciones específicas, desempeñando su propio papel en la respuesta inmunitaria (Radzyukevich, Kosyakova and Prokhorenko, 2021). Como se ha mencionado anteriormente las subpoblaciones de monocitos son de gran importancia puesto que los monocitos clásicos son altamente fagocíticos, los monocitos intermedios incluyen la producción de ROS, presentación de antígeno, participación en las respuestas inflamatorias y angiogénesis, mientras que los monocitos no clásicos patrullan el endotelio, pueden tener un comportamiento proinflamatorio y secretar citocinas inflamatorias en respuesta a la inflamación (Wong, *et.al.*,2001).

Recientemente, se ha reportado en voluntarios sanos que las tres subpoblaciones de monocitos expresan CD39, sin embargo, la subpoblación que primordialmente

expresa esta ectoenzima son los monocitos intermedios, seguido de los monocitos clásicos y en menor medida los monocitos no clásicos (Hoffmann et al., 2020). Y aunque no se presentó una diferencia significativa del porcentaje de células CD39+ tanto en los monocitos totales (Figura 10) como en las subpoblaciones de monocitos para los dos grupos de estudio (Figura 11), esto coincide con nuestros resultados, ya que, al evaluar la expresión de este marcador para los monocitos totales se observó una mayor expresión en pacientes con SIRS (Figura 12); sin embargo, contrario a los resultados de Hoffmann y colaboradores donde observaron mayor expresión en los monocitos intermedios, en nuestros resultados al realizar la comparación entre nuestros dos grupos de estudio, la subpoblación que presentó mayor expresión de CD39 fue la de los monocitos clásicos en el caso de pacientes con SIRS en comparación con pacientes sépticos, en cuanto a las otras dos subpoblaciones de monocitos no se encontró diferencia estadísticamente significativa (Figura 13). Esta diferencia en la expresión de esta ectoenzima se podría explicar, ya que, en nuestro trabajo se evaluaron las subpoblaciones de monocitos en un modelo de inflamación sistémica, en donde se puede sugerir que el aumento de la expresión en los monocitos clásicos se debe a que se está llevando a cabo la regulación de la inflamación mediada por el aumento de la producción de la desfosforilación de ATP para la generación de adenosina por medio de CD39, permitiendo así que los monocitos clásicos lleven a cabo sus funciones particulares que ya han sido reportados, como son la reparación de tejidos y la respuesta inmune, reconociendo PAMPs y eliminando microorganismos, lípidos y detritus celulares a través de la fagocitosis (Wong et al., 2011; Yang et al., 2014; Ożańska, Szymczak and Rybka, 2020).

En cuanto a lo que se observa en los pacientes con sepsis, tenemos todo lo contrario, ya que ni en los monocitos totales ni en sus diferentes subpoblaciones hubieron cambios en cuanto a la frecuencia y a la expresión de CD39, lo cual se puede relacionar con otros reportes descritos en donde se ha observado que aunque los monocitos tienen como una de sus funciones principales llevar a cabo

el proceso de fagocitosis y activarse para elaborar especies reactivas de oxígeno, óxido nítrico y citocinas, esta población de leucocitos muestra una capacidad muy reducida de responder a LPS en pacientes con sepsis, lo cual está íntimamente relacionado con la gravedad de la enfermedad (Pena *et al.*, 2014) y a su vez la proporción de las subpoblaciones de monocitos varía en diferentes estudios, enfatizando la heterogeneidad de la sepsis (Radzyukevich, Kosyakova and Prokhorenko, 2021) y sugiriendo que la expresión de este marcador es independiente del microambiente de los pacientes con sepsis.

Ahora bien, para el caso de la ectoenzima CD73, se ha reportado que menos del 5% de los monocitos CD14+ circulantes expresan esta ectonucleotidasa en individuos sanos (Allard *et al.*, 2017). Y esto concuerda con nuestros resultados obtenidos ya que tanto el porcentaje como la expresión en monocitos y subpoblaciones de monocitos para CD73 positivos no presentaron diferencias significativas tanto para pacientes diagnosticados con SIRS como para pacientes diagnosticados con sepsis (figura 15 y 17), sugiriendo que en los pacientes con SIRS la expresión de CD73, es contraria a CD39 y es independiente tanto del microambiente como de las funciones particulares que llevan a cabo las subpoblaciones de monocitos y que en sepsis de igual manera que CD39, la expresión de la ectoenzima de CD73 es independiente de las respuestas funcionales de las subpoblaciones de monocitos.

Es importante resaltar que la expresión y la función de las ectoenzimas cambian durante la diferenciación y activación celular. Ya que, mientras que se ha reportado que la actividad enzimática de CD39 y CD73 es relativamente baja en los monocitos indiferenciados, la actividad de CD39 y especialmente de CD73 aumenta tras la diferenciación (Clifford *et al.*, 1997; Adrian *et al.*, 2000), lo que posiblemente implica que la modulación de monocitos a macrófagos puede adquirir progresivamente un fenotipo formador de adenosina. Dichos cambios en la funcionalidad de las ectoenzimas podrían permitir que exista un ajuste en el resultado de la cascada

purinérgica en su superficie celular para afinar sus funciones efectoras durante un evento inflamatorio (Bourns, et.al., 2006).

Las ectonucleotidasas CD39 y CD73 han sido exploradas en diferentes subpoblaciones de linfocitos, entre ellas, los linfocitos T CD4+, T CD8, Th17, linfocitos B, T reg, entre otras; de hecho, CD39 se describió por primera vez como un marcador de activación de linfocitos B y posteriormente se consideró como un marcador de activación de linfocitos T (Zhao H, Bo C, Kang Y, and Li H., 2017). Debido al estudio que se ha llevado a cabo en las diferentes subpoblaciones de linfocitos hoy en día se sabe que en sangre periférica humana, CD73 se expresa en aproximadamente el 75 % de las células B, el 50 % de las células T CD8+, el 10 % de las células T CD4+ y del 2–5 % de las células NK (Resta, Yamashita and Thompson, 1998; Allard *et al.*, 2017).

Por otra parte, se ha reportado que CD39 y CD73 se han utilizado cada vez más como marcadores de identificación de las células T reg Foxp3+, puesto que estas ectoenzimas están altamente expresados en su superficie y su actividad catabólica está sincronizada con el estado de activación de estas células (Mandapathil, et.al., 2009; Schuler, et.al., 2011). También Deaglio y colaboradores reportaron que en ratones deficientes de CD39, esta ectoenzima junto con CD73 facilita la generación pericelular de adenosina, la cual media una parte crucial de las actividades inmunosupresoras y antiinflamatorias de las células Tregs (Deaglio, et. al., 2007). Y en otro estudio se ha demostrado que las células Th17 también expresan las ectoenzimas CD39 y CD73, pero estas son las encargadas de suprimir la respuesta inmune de esta población celular a través de la producción de adenosina (Chalmin, et.al., 2012). Así como se encontró que CD39 y CD73 estaban distribuidos de manera desigual entre las diferentes células inmunitarias cardíacas. Las células linfoides cardíacas circulantes y residentes expresaron en gran medida CD73 con poca abundancia en las células mieloides, mientras que para CD39 ocurre lo contrario (Bonner,et. al., 2012)

Y aunque hay una gran variedad de referencias en donde reportan que estas ectoenzimas están asociadas a las poblaciones de linfocitos, como es el caso en donde se ha reportado que CD39 juega un papel indispensable en la activación y diferenciación de células T CD4 + impulsadas por DC (Mariathasan *et al.*, 2006), y de que en un estudio reciente se ha demostrado que las células Th17 también expresan CD39 y CD73, y estas ectoenzimas suprimen las respuestas inmunitarias de las células Th17 a través de la producción de adenosina (Chalmin *et al.*, 2012), así como que en estudios farmacológicos han demostrado que las células Treg humanas también degradan ATP a adenosina a través de CD39 y CD73 y que esta adenosina es inmunosupresora (Mandapathil *et al.*, 2010) y de igual manera se ha reportado que la proliferación y las funciones de células B^{high} CD39 se realizan a través de la generación de adenosina y la secreción de IL-10 (Figueiró *et al.*, 2016).

En nuestros resultados no se pudo llegar apreciar diferencias significativas, tanto en el porcentaje de linfocitos CD39+, linfocitos CD73+ y linfocitos CD39+CD73+, así como una diferencia en la expresión de estos dos marcadores para nuestros dos grupos de estudio. Por tanto, esto podría explicarse a que las diferentes funciones específicas que llevan a cabo las diferentes poblaciones de linfocitos es estos dos casos clínicos de inflamación sistémica no son dependientes de la expresión de estas dos ectoenzimas, es decir, que su función en la degradación de ATP a adenosina no influye en la regulación de la inflamación.

10. RESUMEN DE RESULTADOS

- En las condiciones de inflamación sistémica presentes en los pacientes con SIRS y sepsis las ectoenzimas CD39 y CD73 se expresan en linfocitos, neutrófilos, monocitos y sus subpoblaciones.
- El porcentaje y expresión de CD39 en neutrófilos se ve afectada por el microambiente inflamatorio en pacientes con sepsis.
- Los monocitos clásicos son la única subpoblación que presentan mayor expresión de CD39 en pacientes con SIRS, mientras que la expresión de este marcador es independiente del microambiente de los pacientes con sepsis
- La expresión de CD73 es independiente de las respuestas funcionales de las subpoblaciones de monocitos en nuestros dos modelos de inflamación sistémica.
- Tanto el porcentaje de células CD39+ y CD73+, así como su expresión en la población de linfocitos es independiente de la regulación de inflamación para nuestros modelos de inflamación sistémica.

11. CONCLUSIÓN

La expresión del sistema CD39/CD73 varía en neutrófilos y monocitos (primordialmente clásicos) de acuerdo con el tipo de inflamación sistémica, estando aparentemente más comprometida en sepsis que en SIRS

12. ANEXO

Anexo 1. Carta de consentimiento informado

	<p>INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL UNIDAD DE EDUCACIÓN, INVESTIGACIÓN Y POLÍTICAS DE SALUD</p> <p>COORDINACIÓN DE INVESTIGACIÓN EN SALUD</p> <p>CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO (ADULTOS)</p>
<p>CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPACIÓN EN PROTOCOLOS DE INVESTIGACIÓN</p>	
Nombre del estudio:	Asociación de la activación leucocitaria, endotelial y complemento en pacientes con SIRS/sepsis
Lugar:	Servicio de Unidad de Cuidados Intensivos y Unidad de Investigación Médica en Inmunoquímica del Hospital de Especialidades CMN Siglo XXI, IMSS Ciudad de México D.F. -
Fecha:	
Número de registro:	
Objetivo del estudio:	El objetivo del estudio es conocer que tan activados están en su sangre sus células del sistema de defensa (o glóbulos blancos o leucocitos circulantes), un sistema llamado de complemento que combate infecciones, así como sustancias que liberan a la sangre otros componentes importantes de nuestro cuerpo como son las que recubren por dentro a sus venas y arterias (células endoteliales) y que incluyen un tipo de mensajes moleculares que se mandan las células entre sí, y que se llaman citoquinas.
Procedimientos:	Su participación en este estudio consiste en permitirnos tomarle una muestra de sangre del catéter central de una cantidad equivalente a dos cucharadas (10 ml.) en tres diferentes tubos. El tiempo que ocuparemos para realizar la toma de muestra de sangre es de aproximadamente 10 minutos o menos. En el laboratorio, donde ya no se requiere de su presencia, a una parte de su sangre la ocuparemos para marcar sus glóbulos blancos y observar los cambios que nos hablen de su capacidad de activarse y de la otra parte ocuparemos lo que se llama suero y plasma (en caso del tubo con anticoagulante), para realizar la cuantificación de las moléculas solubles liberadas por la activación de sus células endoteliales, cascadas de complemento y de citoquinas. Además le pedimos nos permita recabar de su expediente información relacionada con su enfermedad actual.
Posibles riesgos y molestias:	La toma de muestra de sangre será del tubo que ya tienen colocado (catéter central), como lo hacen para las pruebas diarias de control y se realizará por personas expertas. En algunas ocasiones el procedimiento para tomarle una muestra de sangre puede causar una discreta molestia.
Información sobre resultados y alternativas de tratamiento:	El investigador responsable se ha comprometido a darle información oportuna sobre cualquier procedimiento alternativo adecuado que pudiera ser ventajoso para mí, así como a responder cualquier pregunta y aclarar cualquier duda que le plantee acerca de los procedimientos que se llevarán a cabo, los riesgos, beneficios o cualquier otro asunto relacionado con la investigación. También se ha comprometido a proporcionarme la información actualizada que se obtenga durante el estudio, aunque esta pudiera cambiar mi parecer respecto a mi permanencia en el mismo. Así mismo es de mi conocimiento que no recibiré ningún estímulo económico por mi participación en esta investigación y que todo el material y recursos necesarios para el mismo correrán a cargo del investigador. Declaro que se me ha informado ampliamente sobre los posibles riesgos, inconvenientes y molestias. Así como de los beneficios derivados de mi participación en este estudio y que son los siguientes: Con el estudio de mi sangre los investigadores conocerán más en relación a mi enfermedad.

Participación o retiro:	Entiendo que conservo el derecho de retirarme del estudio en cualquier momento en que lo considere conveniente, sin que ello afecte la atención médica que recibo en el Instituto.
Privacidad y confidencialidad:	El Investigador Responsable me ha dado seguridades de que no se me identificará en las presentaciones y/o publicaciones que deriven de este estudio y de que los datos relacionados con mi privacidad serán tratados en forma confidencial.
Disponibilidad de tratamiento médico en derecho habientes (si aplica):	El Instituto cuenta con el tratamiento que se requiere.
Beneficios al término del estudio:	De forma inmediata este estudio no le beneficia directamente ni modificará su tratamiento de forma alguna. Sin embargo, la información que obtengamos de este estudio beneficiará en el futuro a pacientes ya que pensamos que contribuirán a clarificar al Síndrome de Respuesta Inflamatoria Sistémica y a Sepsis , así como por que en algunos casos pueden funcionar o no las terapias que se proponen actualmente.
En caso de dudas o aclaraciones relacionadas con el estudio podrá dirigirse a:	
Investigador Responsable:	Dra. Lourdes Andrea Arriaga Pizano, Investigadora de la Unidad de Investigación Médica en Inmunoquímica.
Colaboradores:	Dr. Marco Antonio León Gutiérrez , Jefe de la Unidad de Cuidados Intensivos, Dra Leonor Serrano Cuevas, médico adscrito de la Unidad de Cuidados Intensivos, Dr. Armando Isibasi Araujo, Jefe de la unidad de Investigación Médica en Inmunoquímica, Dr. Eduardo Feral Osorio, médico adscrito al Servicio de Gastrocirugía.
En caso de dudas o aclaraciones sobre sus derechos como participante podrá dirigirse a: Comisión de Ética de Investigación de la 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: comision-etica@imss.gob.mx	
_____	_____
Nombre y firma del paciente.	Nombre, firma y matricula del investigador.
Testigo 1	Testigo 2
_____	_____
Nombre, dirección, relación y firma .	Nombre, dirección, relación y firma.

13. Referencias

- Abdulkhaleq, L.A. *et al.* (2018) 'The crucial roles of inflammatory mediators in inflammation: A review.', *Veterinary world*, 11(5), pp. 627–635. Available at: <https://doi.org/10.14202/vetworld.2018.627-635>.
- Ahmadi, P. *et al.* (2020) 'Defining the CD39/CD73 Axis in SARS-CoV-2 Infection: The CD73- Phenotype Identifies Polyfunctional Cytotoxic Lymphocytes', *Cells*, 9(8). Available at: <https://doi.org/10.3390/CELLS9081750>.
- Allard, B. *et al.* (2017) 'The ectonucleotidases CD39 and CD73: Novel checkpoint inhibitor targets.', *Immunological reviews*, 276(1), pp. 121–144. Available at: <https://doi.org/10.1111/imr.12528>.
- Antonioli, L., Pacher, P., Vizi, E Sylvester, *et al.* (2013) 'CD39 and CD73 in immunity and inflammation', *Trends in Molecular Medicine*. NIH Public Access, pp. 355–367. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2013.03.005>.
- Antonioli, L. *et al.* (2014) 'Adenosine and inflammation: what's new on the horizon?', *Drug Discovery Today*, 19(8), pp. 1051–1068. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.DRUDIS.2014.02.010>.
- Auffray, C., Sieweke, M.H. and Geissmann, F. (2009) 'Blood Monocytes: Development, Heterogeneity, and Relationship with Dendritic Cells', <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.immunol.021908.132557>, 27, pp. 669–692. Available at: <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.IMMUNOL.021908.132557>.
- Balk, R.A. (2014) 'Systemic inflammatory response syndrome (SIRS): where did it come from and is it still relevant today?', *Virulence*, 5(1), pp. 20–6. Available at: <https://doi.org/10.4161/viru.27135>.
- Barletta, Kathryn E, Ley, K. and Mehrad, B. (2012) 'Regulation of neutrophil function by adenosine.', *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 32(4), pp. 856–64. Available at: <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.111.226845>.
- Barton, G.M. (2008) 'A calculated response: control of inflammation by the innate immune system', *The Journal of Clinical Investigation*, 118(2), p. 413. Available at:

<https://doi.org/10.1172/JCI34431>.

Basbaum, A.I. *et al.* (2009) 'Cellular and molecular mechanisms of pain.', *Cell*, 139(2), pp. 267–84. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.09.028>.

Bastid, J. *et al.* (2013) 'ENTPD1/CD39 is a promising therapeutic target in oncology', *Oncogene*, 32(14), pp. 1743–1751. Available at: <https://doi.org/10.1038/onc.2012.269>.

Berg, D. and Gerlach, H. (2018) 'Recent advances in understanding and managing sepsis', *F1000Research*, 7, p. 1570. Available at: <https://doi.org/10.12688/F1000RESEARCH.15758.1>.

Bone, R.C. *et al.* (1992) 'Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis', *Chest*, 101(6), pp. 1644–1655. Available at: <https://doi.org/10.1378/chest.101.6.1644>.

Bone, R.C., Sibbald, W.J. and Sprung, C.L. (1992) 'The ACCP-SCCM consensus conference on sepsis and organ failure', *Chest*, 101(6), pp. 1481–1483. Available at: <https://doi.org/10.1378/chest.101.6.1481>.

Brady, J., Horie, S. and Laffey, J.G. (2020) 'Role of the adaptive immune response in sepsis', *Intensive Care Medicine Experimental* 2020 8:1, 8(1), pp. 1–19. Available at: <https://doi.org/10.1186/S40635-020-00309-Z>.

Cao, C., Yu, M. and Chai, Y. (2019) 'Pathological alteration and therapeutic implications of sepsis-induced immune cell apoptosis', *Cell Death & Disease* 2019 10:10, 10(10), pp. 1–14. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41419-019-2015-1>.

Caserta, S. *et al.* (2017) 'Severity of Systemic Inflammatory Response Syndrome Affects the Blood Levels of Circulating Inflammatory-Relevant MicroRNAs', *Frontiers in Immunology*, 8. Available at: <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2017.01977>.

Caserta, S. *et al.* (2018) 'Severity of Systemic Inflammatory Response Syndrome Affects the Blood Levels of Circulating Inflammatory-Relevant MicroRNAs', *Frontiers in Immunology*, 0, p. 1977. Available at:

<https://doi.org/10.3389/FIMMU.2017.01977>.

Chalmin, F. *et al.* (2012) 'Stat3 and Gfi-1 transcription factors control Th17 cell immunosuppressive activity via the regulation of ectonucleotidase expression', *Immunity*, 36(3), pp. 362–373. Available at:
<https://doi.org/10.1016/J.IMMUNI.2011.12.019>.

Chen, L. *et al.* (2018) 'Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs', *Oncotarget*, 9(6), p. 7204. Available at:
<https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.23208>.

Chen, Y. *et al.* (2006) 'ATP release guides neutrophil chemotaxis via P2Y2 and A3 receptors', *Science*, 314(5806), pp. 1792–1795. Available at:
https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1132559/SUPPL_FILE/CHEN.SOM.PDF.

Chilton, P.M., Embry, C.A. and Mitchell, T.C. (2012) 'Effects of Differences in Lipid A Structure on TLR4 Pro-Inflammatory Signaling and Inflammasome Activation', *Frontiers in Immunology*, 3(JUN). Available at:
<https://doi.org/10.3389/FIMMU.2012.00154>.

Corriden, R. *et al.* (2008) 'Ecto-nucleoside Triphosphate Diphosphohydrolase 1 (E-NTPDase1/CD39) Regulates Neutrophil Chemotaxis by Hydrolyzing Released ATP to Adenosine', *The Journal of Biological Chemistry*, 283(42), p. 28480. Available at:
<https://doi.org/10.1074/JBC.M800039200>.

Deaglio, S. and Robson, S.C. (2011) 'Ectonucleotidases as regulators of purinergic signaling in thrombosis, inflammation, and immunity.', *Advances in pharmacology (San Diego, Calif.)*, 61, pp. 301–32. Available at: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385526-8.00010-2>.

Delano, M.J. and Ward, P.A. (2016) 'The immune system's role in sepsis progression, resolution, and long-term outcome', *Immunological Reviews*. Blackwell Publishing Ltd, pp. 330–353. Available at:
<https://doi.org/10.1111/imr.12499>.

Dwyer, K.M. *et al.* (2007) 'CD39 and control of cellular immune responses.',

Purinergic signalling, 3(1–2), pp. 171–80. Available at:
<https://doi.org/10.1007/s11302-006-9050-y>.

Ernst, P.B., Garrison, J.C. and Thompson, L.F. (2010) 'Much Ado about Adenosine: Adenosine Synthesis and Function in Regulatory T Cell Biology', *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 185(4), p. 1993. Available at:
<https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.1000108>.

Evans, T. (2018) 'Diagnosis and management of sepsis', *Clinical Medicine*, 18(2), p. 146. Available at: <https://doi.org/10.7861/CLINMEDICINE.18-2-146>.

Ferrero-Miliani, L. *et al.* (2007) 'Chronic inflammation: importance of NOD2 and NALP3 in interleukin-1 β generation', *Clinical and Experimental Immunology*, 147(2), p. 227. Available at: <https://doi.org/10.1111/J.1365-2249.2006.03261.X>.

Figueiró, F. *et al.* (2016) 'Phenotypic and functional characteristics of CD39^{high} human regulatory B cells (Breg)', <https://doi.org/10.1080/2162402X.2015.1082703>, 5(2). Available at: <https://doi.org/10.1080/2162402X.2015.1082703>.

Freire, M.O. and Van Dyke, T.E. (2013) 'Natural resolution of inflammation.', *Periodontology 2000*, 63(1), pp. 149–64. Available at:
<https://doi.org/10.1111/prd.12034>.

Furman, D. *et al.* (2019) 'Chronic inflammation in the etiology of disease across the life span', *Nature medicine*, 25(12), p. 1822. Available at:
<https://doi.org/10.1038/S41591-019-0675-0>.

Gorordo-Delsol, L.A. (2017) 'Panorama epidemiológico: ¿en dónde quedó la sepsis?', *Revista de la Facultad de Medicina UNAM*, 60(1), pp. 61–62. Available at: www.who.int/classifications/icd/revision/en/ (Accessed: 24 September 2021).

Gyawali, B., Ramakrishna, K. and Dhamoon, A.S. (2019) 'Sepsis: The evolution in definition, pathophysiology, and management', *SAGE Open Medicine*, 7, p. 205031211983504. Available at: <https://doi.org/10.1177/2050312119835043>.

Haskó, G. *et al.* (2011) 'Ecto-5'-nucleotidase (CD73) decreases mortality and organ injury in sepsis', *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 187(8), p. 4256.

Available at: <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.1003379>.

Haskó, G. and Cronstein, B. (2013) 'Regulation of inflammation by adenosine', *Frontiers in Immunology*, 4(APR). Available at: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00085>.

Haskó, G. and Cronstein, B.N. (2004) 'Adenosine: An endogenous regulator of innate immunity', *Trends in Immunology*, 25(1), pp. 33–39. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.it.2003.11.003>.

Hoesel, L.M. and Ward, P.A. (2004) 'Mechanisms of inflammatory response syndrome in sepsis', *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms*. Elsevier Ltd, pp. 345–350. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ddmec.2004.11.003>.

Hoffmann, J. *et al.* (2020) 'High-Content Immunophenotyping and Hierarchical Clustering Reveal Sources of Heterogeneity and New Surface Markers of Human Blood Monocyte Subsets', *Thrombosis and haemostasis*, 120(1), pp. 141–155. Available at: <https://doi.org/10.1055/S-0039-1700871>.

Hotchkiss, R.S. *et al.* (2009) 'Tilting toward immunosuppression', *Nature medicine*, 15(5), p. 496. Available at: <https://doi.org/10.1038/NM0509-496>.

Huang, M., Cai, S. and Su, J. (2019) 'The Pathogenesis of Sepsis and Potential Therapeutic Targets', *International Journal of Molecular Sciences*, 20(21). Available at: <https://doi.org/10.3390/IJMS20215376>.

Hyman, M.C. *et al.* (2009) 'Self-regulation of inflammatory cell trafficking in mice by the leukocyte surface apyrase CD39', *The Journal of Clinical Investigation*, 119(5), p. 1136. Available at: <https://doi.org/10.1172/JCI36433>.

Idzko, M., Ferrari, D. and Eltzschig, H.K. (2014) 'Nucleotide signalling during inflammation', *Nature*, 509(7500), p. 310. Available at: <https://doi.org/10.1038/NATURE13085>.

Iskander, K.N. *et al.* (2013) 'Sepsis: Multiple abnormalities, heterogeneous responses, and evolving understanding', *Physiological Reviews*. American Physiological Society, pp. 1247–1288. Available at:

<https://doi.org/10.1152/physrev.00037.2012>.

Janssen, William J and Henson, P.M. (2012) 'Cellular Regulation of the Inflammatory Response', *Toxicologic Pathology*, 40(2), pp. 166–173. Available at: <https://doi.org/10.1177/0192623311428477>.

Junger, W.G. (2011) 'Immune cell regulation by autocrine purinergic signalling', *Nature reviews. Immunology*, 11(3), p. 201. Available at: <https://doi.org/10.1038/NRI2938>.

Kiers, D. *et al.* (2017) 'Characterization of a model of systemic inflammation in humans in vivo elicited by continuous infusion of endotoxin', *Scientific Reports 2017 7:1*, 7(1), pp. 1–10. Available at: <https://doi.org/10.1038/srep40149>.

Lawrence, T. and Gilroy, D.W. (2007) 'Chronic inflammation: a failure of resolution?', *International Journal of Experimental Pathology*, 88(2), p. 85. Available at: <https://doi.org/10.1111/J.1365-2613.2006.00507.X>.

Ledderose, C. *et al.* (2016) 'Purinergic Signaling and the Immune Response in Sepsis: A Review', *Clinical Therapeutics*. Excerpta Medica Inc., pp. 1054–1065. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.clinthera.2016.04.002>.

Mandapathil, M. *et al.* (2010) 'Generation and Accumulation of Immunosuppressive Adenosine by Human CD4+CD25highFOXP3+ Regulatory T Cells', *The Journal of Biological Chemistry*, 285(10), p. 7176. Available at: <https://doi.org/10.1074/JBC.M109.047423>.

Mariathasan, S. *et al.* (2006) 'Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP', *Nature 2006 440:7081*, 440(7081), pp. 228–232. Available at: <https://doi.org/10.1038/nature04515>.

Matsuda, N. and Hattori, Y. (2006) 'Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS): Molecular Pathophysiology and Gene Therapy', *Journal of Pharmacological Sciences*, 101(3), pp. 189–198. Available at: <https://doi.org/10.1254/JPHS.CRJ06010X>.

Medzhitov, R. (2008) 'Origin and physiological roles of inflammation', *Nature 2008*

454:7203, 454(7203), pp. 428–435. Available at:
<https://doi.org/10.1038/nature07201>.

Medzhitov, R. (2010) 'Inflammation 2010: new adventures of an old flame.', *Cell*, 140(6), pp. 771–6. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.03.006>.

Mirakaj, V. *et al.* (2014) 'Vagus nerve controls resolution and pro-resolving mediators of inflammation', *Journal of Experimental Medicine*, 211(6), pp. 1037–1048. Available at: <https://doi.org/10.1084/jem.20132103>.

Mote, J.D. *et al.* (2009) 'Síndrome de respuesta inflamatoria sistémica. Aspectos fisiopatológicos', *Medicina Crítica*, 23(4), pp. 225–233. Available at: www.medigraphic.com (Accessed: 18 August 2021).

Nathan, C. (2002) 'Points of control in inflammation', *Nature* 2002 420:6917, 420(6917), pp. 846–852. Available at: <https://doi.org/10.1038/nature01320>.

Nduka, O.O. and Parrillo, J.E. (2009) 'The Pathophysiology of Septic Shock', *Critical Care Clinics*, 25(4), pp. 677–702. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ccc.2009.08.002>.

Nedeva, C., Menassa, J. and Puthalakath, H. (2019) 'Sepsis: Inflammation Is a Necessary Evil', *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 7(JUN). Available at: <https://doi.org/10.3389/FCELL.2019.00108>.

Németh, Z.H. *et al.* (2006) 'Adenosine A_{2A} Receptor Inactivation Increases Survival in Polymicrobial Sepsis', *The Journal of Immunology*, 176(9), pp. 5616–5626. Available at: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.176.9.5616>.

Ortega-Gómez, A., Perretti, M. and Soehnlein, O. (2013) 'Resolution of inflammation: An integrated view', *EMBO Molecular Medicine*. Wiley-Blackwell, pp. 661–674. Available at: <https://doi.org/10.1002/emmm.201202382>.

Ożańska, A., Szymczak, D. and Rybka, J. (2020) 'Pattern of human monocyte subpopulations in health and disease', *Scandinavian Journal of Immunology*, 92(1), p. e12883. Available at: <https://doi.org/10.1111/SJI.12883>.

Parlato, M. and Cavaillon, J.M. (2014) 'Host response biomarkers in the diagnosis of sepsis: A general overview', *Methods in Molecular Biology*, 1237, pp. 149–211. Available at: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1776-1_15.

Pasquini, S. *et al.* (2021) 'Adenosine and Inflammation: Here, There and Everywhere', *International Journal of Molecular Sciences*, 22(14). Available at: <https://doi.org/10.3390/IJMS22147685>.

Pena, O.M. *et al.* (2014) 'An Endotoxin Tolerance Signature Predicts Sepsis and Organ Dysfunction at Initial Clinical Presentation', *EBioMedicine*, 1(1), p. 64. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.EBIOM.2014.10.003>.

Perretti, M. and D'Acquisto, F. (2009) 'Annexin A1 and glucocorticoids as effectors of the resolution of inflammation', *Nature Reviews Immunology*. *Nat Rev Immunol*, pp. 62–70. Available at: <https://doi.org/10.1038/nri2470>.

Ploppa, A. *et al.* (2010) 'Mechanisms of leukocyte distribution during sepsis: an experimental study on the interdependence of cell activation, shear stress and endothelial injury', *Critical Care*, 14(6), p. R201. Available at: <https://doi.org/10.1186/CC9322>.

Pop-Began, V. *et al.* (2014) 'Molecular mechanisms in the pathogenesis of sepsis', *Journal of Medicine and Life*, 7(Spec Iss 2), p. 38. Available at: [/pubmed/articles/PMC4391358/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2491358/) (Accessed: 17 August 2021).

Pulte, E.D. *et al.* (2007) 'CD39/NTPDase-1 activity and expression in normal leukocytes.', *Thrombosis research*, 121(3), pp. 309–17. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2007.04.008>.

Radzyukevich, Y. V., Kosyakova, N.I. and Prokhorenko, I.R. (2021) 'Participation of Monocyte Subpopulations in Progression of Experimental Endotoxemia (EE) and Systemic Inflammation', *Journal of Immunology Research*, 2021. Available at: <https://doi.org/10.1155/2021/1762584>.

Rello, J. *et al.* (2017) 'Sepsis: A Review of Advances in Management', *Advances in Therapy*, 34(11), p. 2393. Available at: <https://doi.org/10.1007/S12325-017-0622-8>.

Resta, R., Yamashita, Y. and Thompson, L.F. (1998) 'Ecto-enzyme and signaling functions of lymphocyte CD73', *Immunological reviews*, 161, pp. 95–109. Available at: <https://doi.org/10.1111/J.1600-065X.1998.TB01574.X>.

Riedemann, N.C., Guo, R.-F. and Ward, P.A. (2003) 'The enigma of sepsis', *Journal of Clinical Investigation*, 112(4), pp. 460–467. Available at: <https://doi.org/10.1172/jci19523>.

Rimmelé, T. *et al.* (2016) 'Immune cell phenotype and function in sepsis', *Shock (Augusta, Ga.)*, 45(3), p. 282. Available at: <https://doi.org/10.1097/SHK.0000000000000495>.

Rudd, K.E. *et al.* (2020) 'Global, regional, and national sepsis incidence and mortality, 1990–2017: analysis for the Global Burden of Disease Study', *Lancet (London, England)*, 395(10219), p. 200. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)32989-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)32989-7).

Salmi, M. and Jalkanen, S. (2005) 'Cell-surface enzymes in control of leukocyte trafficking', *Nature Reviews Immunology* 2005 5:10, 5(10), pp. 760–771. Available at: <https://doi.org/10.1038/nri1705>.

Serhan, C.N. (2014) 'Pro-resolving lipid mediators are leads for resolution physiology', *Nature*. Nature Publishing Group, pp. 92–101. Available at: <https://doi.org/10.1038/nature13479>.

Serhan, C.N. *et al.* (2015) 'Lipid mediators in the resolution of inflammation', *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7(2). Available at: <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016311>.

Serhan, C.N. and Savill, J. (2005) 'Resolution of inflammation: The beginning programs the end', *Nature Immunology*. Nat Immunol, pp. 1191–1197. Available at: <https://doi.org/10.1038/ni1276>.

Singer, M., *et al. et al.* (2016) 'The Tird Internacional Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3)', *JAMA - Journal of the American Medical Association*, 315(8), pp. 801–810. Available at:

<https://doi.org/10.1001/jama.2016.0287>.The.

Singer, M. *et al.* (2016) 'The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (sepsis-3)', *JAMA - Journal of the American Medical Association*.

American Medical Association, pp. 801–810. Available at:

<https://doi.org/10.1001/jama.2016.0287>.

Stone, W.L., Basit, H. and Burns, B. (2020) 'Pathology, Inflammation', *Nephrology Dialysis Transplantation*, 29(suppl 3), pp. iii25–iii26. Available at:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK534820/> (Accessed: 15 August 2021).

Sugimoto, M.A. *et al.* (2019) 'Mediators of the Resolution of the Inflammatory Response', *Trends in Immunology*. Elsevier, pp. 212–227. Available at:

<https://doi.org/10.1016/j.it.2019.01.007>.

Suzuki, K. (2019) 'Chronic Inflammation as an Immunological Abnormality and Effectiveness of Exercise', *Biomolecules*, 9(6). Available at:

<https://doi.org/10.3390/BIOM9060223>.

Takeuchi, O. and Akira, S. (2010) 'Pattern recognition receptors and inflammation', *Cell*, 140(6), pp. 805–820. Available at:

<https://doi.org/10.1016/J.CELL.2010.01.022>.

Wallace, J.L. *et al.* (2015) 'Gaseous mediators in resolution of inflammation', *Seminars in Immunology*. Academic Press, pp. 227–233. Available at:

<https://doi.org/10.1016/j.smim.2015.05.004>.

Wong, K.L. *et al.* (2011) 'Gene expression profiling reveals the defining features of the classical, intermediate, and nonclassical human monocyte subsets', *Blood*, 118(5), pp. e16–e31. Available at: <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2010-12-326355>.

Yang, J. *et al.* (2014) 'Monocyte and macrophage differentiation: Circulation inflammatory monocyte as biomarker for inflammatory diseases', *Biomarker Research*, 2(1), pp. 1–9. Available at: <https://doi.org/10.1186/2050-7771-2-1/TABLES/4>.

Yegutkin, G.G. (2008) 'Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signalling cascade', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1783(5), pp. 673–694. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.BBAMCR.2008.01.024>.

Zanin, R.F. *et al.* (2012) 'Differential Macrophage Activation Alters the Expression Profile of NTPDase and Ecto-5'-Nucleotidase', *PLoS ONE*, 7(2). Available at: <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0031205>.

Zotova, N. V., Chereshev, V.A. and Gusev, E.Y. (2016) 'Systemic Inflammation: Methodological Approaches to Identification of the Common Pathological Process', *PLoS ONE*, 11(5). Available at: <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0155138>.