



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO

**FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
DELEGACIÓN SUR DEL DISTRITO FEDERAL
UMAE HOSPITAL DE ESPECIALIDADES CMN SIGLO XXI**

**MARCADORES DE ACTIVACION EN CELULAS
MIELOIDES DE PACIENTES CON COVID19**

**TESIS QUE PRESENTA:
DR. RUBÉN RAMÍREZ MONTES DE OCA
PARA OBTENER EL GRADO DE ESPECIALISTA EN:
MEDICINA INTERNA**

**TUTOR DE TESIS
DRA. EN C. LOURDES ANDREA ARRIAGA PIZANO**



CIUDAD DE MEXICO

FEBRERO 2021



Universidad Nacional
Autónoma de México

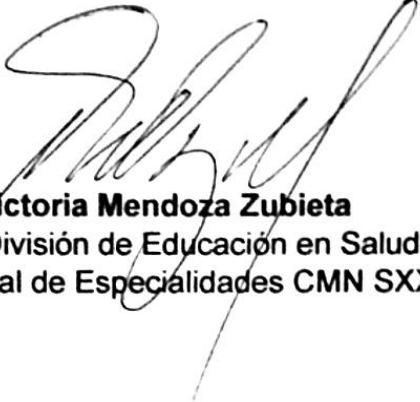


UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso


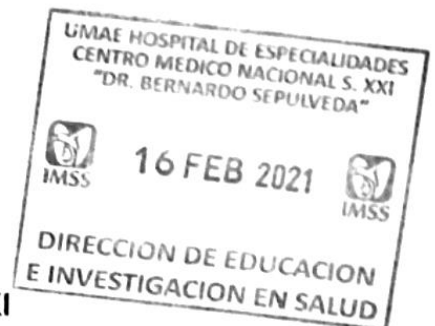
DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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


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



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



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



Dra. en Ciencias Lourdes Andrea Arriaga Pizano
Tutor principal
Investigador asociado D
Unidad de Investigación Médica en Inmunoquímica
UMAE Hospital de Especialidades CMN SXXI



INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
DIRECCIÓN DE PRESTACIONES MÉDICAS



Dictamen de Aprobado

Comité Local de Investigación en Salud 3601,
HOSPITAL DE ESPECIALIDADES Dr. BERNARDO SEPULVEDA GUTIERREZ, CENTRO MEDICO NACIONAL SIGLO
XXI

Registro COFEPRIS 17 CI 09 015 034
Registro CONBIOÉTICA CONBIOETICA 09 CEI 023 2017082

FECHA Martes, 09 de febrero de 2021

Dra. Lourdes Andrea Arriaga Pizano

PRESENTE

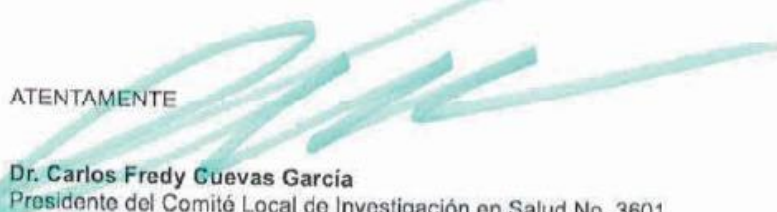
Tengo el agrado de notificarle, que el protocolo de investigación con título **Marcadores de activación en células mieloides de pacientes con COVID19** que sometió a consideración para evaluación de este Comité, de acuerdo con las recomendaciones de sus integrantes y de los revisores, cumple con la calidad metodológica y los requerimientos de ética y de investigación, por lo que el dictamen es **A P R O B A D O**.

Número de Registro Institucional

R-2021-3601-008

De acuerdo a la normativa vigente, deberá presentar en junio de cada año un Informe de seguimiento técnico acerca del desarrollo del protocolo a su cargo. Este dictamen tiene vigencia de un año, por lo que en caso de ser necesario, requerirá solicitar la reaprobación del Comité de Ética en Investigación, al término de la vigencia del mismo.

ATENTAMENTE


Dr. Carlos Fredy Cuevas García
Presidente del Comité Local de Investigación en Salud No. 3601

[Imprimir](#)

IMSS

SEGURIDAD Y SOLIDARIDAD SOCIAL

AGRADECIMIENTOS:

A mis padres por siempre estar, son mi ejemplo y mi inspiración.

A mis hermanos por su apoyo constante.

A mis maestros de curso de Medicina Interna, por sus enseñanzas, disposición, guía y motivación, son mi ejemplo a seguir

A mis amigos por la gran amistad y el trabajo en equipo en tiempos de pandemia.

A todo el equipo del laboratorio de Inmunoquímica con quienes la pandemia me hizo coincidir: Dra. Arriaga, Dr. Constantino, Dr. Ferat, y tantos más compañeros que colaboraron en la realización de este proyecto, sin ustedes no sería posible.

Datos de Alumno:	
Apellido paterno:	Ramírez
Apellido Materno:	Montes de Oca
Nombre:	Rubén
Teléfono:	3315340516
Universidad:	Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad:	Facultad de Medicina
Carrera:	Medicina Interna
Número de cuenta:	517231065
Datos de Tutor:	
Apellido paterno:	Arriaga
Apellido materno:	Pizano
Nombre(s):	Lourdes Andrea
Teléfono:	Tel. 56-27-69-00 ext. 21476.
Correo:	landapi@hotmail.com
Adscripción:	UMAE, Unidad de Investigación Médica en Inmunoquímica.
Tesis:	
Título:	Marcadores de activación en células mieloides de pacientes con COVID19.
Número de páginas:	46 páginas.
Año:	2021

Resumen

La activación exacerbada del sistema inmunológico es una de las características de la enfermedad causada por la infección de SARS CoV2, conocida como COVID 19, así como se ha reportado para sepsis y SIRS (Síndrome de Respuesta Inflamatoria Sistémica). Niveles séricos elevados de Il-6, linfopenia severa, expresión de marcadores de agotamiento en linfocitos y tasas de apoptosis elevadas en estas células se han reportado en pacientes con peor pronóstico en pacientes con COVID19. En cuanto a los monocitos, aunque en SIRS y sepsis, tanto en modelos animales como en pacientes con sepsis, se ha reportado que existe un incremento en las frecuencias del subtipo de monocitos no clásicos y que la disminución en la expresión de HLA-DR e incremento en TREM-1 estas células mieloides se asocian con mal pronóstico, no está claro si en el caso de COVID19 ocurre un fenómeno parecido. Por ello el objetivo del presente trabajo fue determinar si en los pacientes con infección por SARSCoV2 sintomática (con COVID19) las frecuencias de monocitos circulantes, así como la expresión de HLA-DR y/o TREM1 se asocian con la evolución de pacientes con COVID19. Se estudió una cohorte de pacientes que solicitaron atención por presentar un cuadro de infección de vías respiratorias en el Hospital de Especialidades del CMN Siglo

XXI. En las primeras 24 horas posteriores a su hospitalización (debida a su cuadro respiratorio agudo) se efectuó evaluación clínica y toma de prueba de RT-PCR para el diagnóstico de COVID19. Después de la firma de consentimiento informado, se colectó, mediante venopunción una muestra de sangre periférica para inmunofenotipificar los leucocitos y determinar, mediante citometría de flujo, las frecuencias de las subpoblaciones de monocitos clásicos ($CD14^+CD16^-$), intermedios ($CD14^+CD16^+$), y monocitos no clásicos ($CD14^{low}CD16^+$), así como la expresión de HLA-DR y TREM-1. Se incluyeron un total de 23 pacientes con COVID 19, y a un grupo de 10 voluntarios sanos. De los pacientes con COVID19 13 egresaron por mejoría y 10 fallecieron. En comparación con sujetos sanos, se incrementa el número de monocitos, aunque no existen diferencias significativas entre los pacientes que sobrevivieron y los decesos. Sin embargo, al analizar las subpoblaciones de monocitos hay significativamente mayor frecuencia de monocitos no clásicos en los pacientes con COVID19, independientemente del desenlace que tuvo la enfermedad (mejoría o deceso). Así mismo, la proporción de células que expresan HLA-DR y el nivel de expresión es menor en los monocitos de los pacientes con COVID19, con significancia solo en los monocitos clásicos e intermedios provenientes de los pacientes que fallecieron. TREM-1 mostró una tendencia a expresarse más en los pacientes con COVID19 que fallecieron. En conclusión, a pesar que los monocitos que prevalecen en los pacientes con COVID son los clásicos, nuestros resultados sugieren que en los pacientes con COVID19 la disminución en la expresión de HLA-DR y el incremento en la expresión de TREM1 puede estar asociado con peor pronóstico similar a lo reportado para otros estados de inflamación sistémica severa y aguda.

Índice

Abreviaturas.....	8
Antecedentes.....	9
Planteamiento del problema	13
Pregunta de Investigación	13
Hipótesis	14
Objetivos.....	14
Metodología.....	15
Diseño del Estudio.....	15
Universo de trabajo	15
Criterios de inclusión.....	15
Criterios de no inclusión.....	15
Criterios de Exclusión.....	16
Tamaño de muestra	16
Variables	16
Variables dependientes.....	16
Variables Independientes	16
Definición operacional de las variables.....	17
Procedimiento General.....	23
Resultados.....	30
Discusión.....	38
Conclusión	40
Referencias	40
Anexo	43

Abreviaturas

APB	Adult Peripheral Blood (Sangre Periférica de Adulto)
CCL	Chemokine (C-C motif) (Quimiocina con dos residuos de cisteína adyacentes)
CCR	Chemokine (C-C motif) receptor (Receptor de quimiocina con dos residuos de cisteína adyacentes)
CD	Cluster of Differentiation (Marcador de diferenciación)
CXCL	Chemokine (C-X-C motif) ligand (Quimiocina con dos residuos de cisteína separados por un aminoácido diferente)
CXCR	Chemokine (C-X-C motif) receptor (Receptor de quimiocina con dos residuos de cisteína separados por un aminoácido diferente)
DNA	Deoxyribonucleic acid (Ácido desoxirribonucleico)
FC	Frecuencia cardíaca
GM-CSF	Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor (Factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos)
HLA	Human Leucocyte Antigen (Antígeno leucocitario humano)
IL	Interleucina
NF- κB	Nuclear Factor Kappa-Light-Chain-Enhancer of activated B cells (Factor nuclear potenciador de las cadenas kappa de las células B activadas)
NK	Natural Killer (Asesinas naturales)
PAMP	Pathogen Associated Molecular Pattern (Patrón Molecular Asociado a Patógenos)
PCT	Procalcitonina
PRR	Pattern Recognition Receptor (Receptor de Reconocimiento de Patrón)
PBS	Phosphate Buffer Solution (Solución amortiguadora de fosfatos)
PCR	Polymerase Chain Reaction (Reacción en cadena de la polimerasa)
PerCp	Peridinin Chlorophyll Protein (Fluorocromo Proteína Clorofila Peridinina)
rpm	Revoluciones por minuto
SARS	Severe Acute Respiratory Syndrome (Síndrome Agudo Respiratorio Severo)
STAT1	Signal transducers and transcription factors 1

Antecedentes

Coronavirus

Los coronavirus son virus de envoltura con genoma RNA de cadena sencilla no segmentados¹. Seis coronavirus (CoV) son capaces de infectar a humanos y causar enfermedad respiratoria, entre estos virus están tanto el causante del Síndrome Respiratorio Agudo Severo (SARS-CoV) como el causante del Síndrome Respiratorio del Medio Oriente (MERS-CoV). Los CoV pertenecen al orden *Nidovirales*, familia *Coronaviridae*, subfamilia *Coronavirinae* y están divididos en cuatro géneros². El 30 de enero de 2020, la OMS declaró el brote epidémico de la enfermedad COVID-19 por un nuevo coronavirus denominado SARS-CoV2³.

En noviembre de 2002 se detectó el agente etiológico SARS-CoV, después de 4 a 6 días del primer contacto con el virus los pacientes desarrollan síntomas de enfermedad respiratoria y neumonía. SARS-CoV infecta múltiples órganos y causa una enfermedad sistémica y paradójicamente los síntomas se agravan conforme el virus es depurado⁴. En junio de 2012 el MERS-CoV fue causa de casos de enfermedad respiratoria similar a SARS-CoV pero con mayor tasa de mortalidad ($\approx 35\%$)⁵, las personas de la tercera edad y particularmente con comorbilidad desarrollaron formas severas con desenlace fatal⁶. Hasta la fecha no se han desarrollado vacunas o tratamiento farmacológico antiviral para tratar estas enfermedades. La prueba diagnóstica para la infección por SARS-CoV2 es la RT-PCR, aunque se ha reportado que la sensibilidad diagnóstica de la tomografía computada de tórax es mayor que la prueba de RT-PCR (98 vs 71% respectivamente)⁷.

Los CoV son esféricos o pleomórficos con diámetro de 80 a 120 nm. Expresan en su superficie la glicoproteína S y la proteína dimérica esterasa de hemaglutinina (HE). La envoltura viral está constituida por la proteína M que es la más abundante de las proteínas estructurales, adicionalmente expresan una pequeña proteína transmembranal de la envoltura (proteína E). Finalmente, la proteína N se une al RNA genómico formando una nucleocapside simétrica helicoidal⁸. Estas proteínas son potencialmente inmunogénicas y provocan la activación de células de la respuesta inmunológica innata y adquirida.

La infección celular depende de una serie de eventos ya caracterizados para los CoV y el SARS-CoV en particular. Los CoV se unen a receptores de superficie celular. Específicamente la proteína S viral se une a la Enzima Convertidora de Angiotensina 2 como receptor. La enzima ejerce su acción proteica que permite el ingreso a la célula ⁹. Algunos factores del hospedero pueden restringir la unión y la entrada de los CoV, por ejemplo, la proteína transmembranal inducida por interferón (IFITMs) tiene funciones antivirales contra una gran variedad de RNA virus ¹⁰.

Los CoV inducen la apoptosis de células del epitelio respiratorio, neuronas, linfocitos T y células dendríticas ^{11,12}. Esta actividad viral explica la linfopenia observada en pacientes con infección por SARS-CoV. La inducción de apoptosis requiere de la activación de caspasas, la expresión de proteínas formadoras de canal que incrementan la permeabilidad de la membrana externa de la mitocondria o del secuestro de proteínas anti-apoptóticas como Bcl-X_L en el retículo endoplásmico ¹.

Respuesta inflamatoria inducida por Coronavirus

La infección por CoV induce una elevada producción de IFN-tipo I. Sin embargo, algunas proteínas de SARS-CoV o MERS-CoV son antagonistas del interferón ¹³. Además, se ha reportado que la proteína S de SARS-CoV induce la síntesis de las quimiocinas; CCL2 y CXCL8 ^{14,15}, lo que sugiere la participación de polimorfonucleares en la infección por SARS-CoV. Además, la sobreexpresión de la Proteasa tipo-Papaina de SARS-CoV o MERS-CoV reduce la expresión de IFN-beta y de citocinas proinflamatorias en líneas celulares ¹⁶.

La infección por CoV provoca respuestas celulares que resultan en cambios quimiotácticos, apoptóticos, o producción de citocinas, por ejemplo en el SARS puede observarse una extensa infiltración celular en el intersticio pulmonar y alveolos, este infiltrado incluye neutrófilos y macrófagos. También se ha observado un aumento de neutrófilos y monocitos en sangre, y linfopenia de células CD4 y CD8 en pacientes con desenlace fatal por SARS ^{17,18}. La fase aguda de SARS cursa con una severa linfopenia con pérdida de células CD4+ y CD8+ ¹⁸, con expresión disminuida de CD25, CD28 y CD69 en linfocitos CD4 y CD8 ^{19,20}. Se ha reportado que la presentación antigénica por DC a células T no es apropiada por lo que es probable que esta condición resulte de una deficiente expresión de moléculas de clase II del MHC, CD86

o CD40²¹. Además, la infección de Células Dendríticas (DC) con SARS-CoV induce baja expresión de IFN-alfa y beta, moderada expresión de TNF-alfa e IL-6, y alta expresión de CCL3, CCL5, CCL-2 y CXCL10²². De forma similar macrófagos infectados por SARS-CoV muestran una elevada producción de IFN, aunque retardada. Así mismo, se ha reportado que la proteína E de SARS-CoV aumenta la producción de citocinas proinflamatorias, quimiocinas y la actividad del inflamosoma²³.

Marcadores de activación

La fenotipificación de leucocitos de sangre periférica de pacientes con SARS es una alternativa de diagnóstico temprano. El análisis multiparamétrico por citometría permite obtener resultados en poco tiempo (hora y media después de la toma de muestra), de más de 8 parámetros de forma simultánea a partir de volúmenes mínimos de muestra (200 µL de sangre)^{28,29}.

Se ha reportado que algunas moléculas de superficie en leucocitos son candidatos para servir como biomarcadores en procesos inflamatorios sistémicos como lo es el COVID19, entre ellos se encuentran:

CD45: Es una glicoproteína de 180-240 kD también denominada como antígeno común leucocitario²⁴. Es miembro de la familia de las proteínas tirosin fosfatasas, expresada en todas las células hematopoyéticas excepto eritrocitos y plaquetas. Su vida media en la superficie de linfocitos T es de 8-9 hrs²⁵. Se han descrito diferentes isoformas de CD45 como resultado del corte y empalme de los exones 4, 5 y 6 del gen que la codifica³³. Las isoformas de CD45 pueden asociarse a diferentes estados de activación y maduración celular, por ejemplo; se ha reportado que la isoforma CD45RA se expresa en superficie de células T en reposo, mientras que CD45RO se expresa en células T activadas o de memoria²⁶. Los linfocitos B expresan la isoforma CD45RA, pero no CD45RO, mientras que las células NK expresan ambas isoformas.

CD69: Es una proteína transmembranal de tipo II de 27-33 kD, también conocida como la molécula inductora de activación (AIM), su vida media intracelular es de 40 minutos²⁷. Es

un receptor de lectina tipo C, se expresa de manera constitutiva en linfocitos en reposo, su expresión aumenta rápidamente tras la activación celular (a partir de las 2 horas de haberse estimulado) ²⁸. El gen que codifica para CD69 se encuentra en el cromosoma 12 y se comporta como un gen de activación temprana que contiene elementos de respuesta para los factores de transcripción NF- κ B, ERG-1 y AP-1 ²⁷. Estudios *in vitro* han mostrado la sobre expresión de CD69 en infiltrados celulares de enfermedades inflamatorias crónicas, lo que sugiere que este receptor tiene una función importante en la activación de leucocitos con efecto pro-inflamatorio ^{29,30}, por lo que la detección de esta molécula en linfocitos puede indicar una infección reciente (4hrs).

HLA-DR: Es una glicoproteína heterodimérica de superficie celular, compuesta de una cadena α de 36kD (pesada) y una cadena de 27 kD β (ligera), se expresa en linfocitos B, linfocitos T activados, monocitos/macrófagos, células dendríticas y otras células no profesionales presentadoras de antígenos ³¹. HLA-DR permite la presentación de antígenos a las células T y es crucial para el inicio de la cascada inflamatoria durante la sepsis ³². La expresión de HLA-DR en monocitos esta disminuida en pacientes adultos con sepsis, hay reportes que lo proponen como un indicador de complicaciones sépticas después de cirugía mayor o trauma ³³. El pico de expresión después de activación es de 100 horas ³⁴. La expresión aumentada de HLA-DR en leucocitos ha sido asociada a pacientes con infecciones graves; pancreatitis, cirugías mayores, y de manera importante, en pacientes con CARS. La expresión disminuida de HLA-DR en monocitos CD14⁺ es un indicador de mal pronóstico en pacientes con sepsis ³⁴.

TREM-1: Es una glicoproteína de tipo 1 de 30 kD también conocido como el receptor de activación expresado en células mieloides-1, miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas ³⁵. TREM-1 es altamente expresado en las células mieloides de sangre periférica (en particular los monocitos y los granulocitos maduros); la expresión TREM-1 puede ser aumentada por las bacterias, hongos y LPS ^{35,36}. Se ha demostrado que TREM-1 interactúa con la proteína adaptadora DAP12 para estimular neutrófilos y monocitos en respuestas inflamatorias mediadas a través de la activación y liberación de citocinas pro-inflamatorias como TNF- α , IL-1 β y GM-CSF³⁷. Se cree que la expresión de TREM-1 en la

superficie de células mieloides sirve para amplificar las respuestas inflamatorias a infecciones fúngicas y bacterianas³⁸, también se ha demostrado en pacientes con infecciones bacterianas, que la expresión elevada de TREM-1 en superficie celular resulta en la elevación en plasma de su forma soluble (sTREM-1)³⁸.

Planteamiento del problema

En México, el 28 de febrero del 2020, se confirmó el primer caso en un adulto de 35 años, residente de la Ciudad de México que regresó de un viaje a Italia. Hasta el 12 de junio de 2020, se han confirmado 139,196 casos positivos y 16,448 muertes, con una tasa de letalidad cercana al 11% y muy por arriba de lo reportado internacionalmente. Se ha determinado que la linfopenia está frecuentemente presente en pacientes de mayor gravedad con COVID19. Aunque por la infección por SARS se reportó que se hay monocitosis y neutrofilia, se desconoce si los pacientes COVID19 el incremento en el número de monocitos con fenotipo activado y/o la prevalencia del subtipo de monocitos clásicos, intermedios o no clásicos, junto con la expresión de HLA-DR y TREM1 se asociará con peor pronóstico y/o requerimientos de apoyo ventilatorio.

Pregunta de Investigación

¿Existe asociación entre un mayor número de monocitos, sus subtipos y/espresión de marcadores de activación y la necesidad de apoyo ventilatorio y/o desenlace en los pacientes con COVID19?

Hipótesis

Ho: Los pacientes COVID19 con mayor número de monocitos, primordialmente no clásicos, con fenotipo activado al ingreso tienen igual frecuencia de necesidad de apoyo ventilatorio e incidencia de decesos que en pacientes con menor número de monocitos con fenotipo activado al ingreso.

Hi: Los pacientes COVID19 con un mayor número de monocitos no clásicos y/o con fenotipo activado al ingreso tienen mayor frecuencia para requerir de apoyo ventilatorio y/o decesos que en el grupo de pacientes con menor número de monocitos con fenotipo activado al ingreso.

Objetivos

Objetivo General

Determinar si, al ingreso del paciente COVID19, el número y/o tipo de monocitos con fenotipo activado está asociado a mayor frecuencia para requerir apoyo ventilatorio o deceso.

Objetivos particulares

1. Establecer, al ingreso del paciente COVID19, el número de monocitos circulantes
2. Determinar, al ingreso del paciente COVID19, la frecuencia de monocitos clásicos, no clásicos e intermedios.
3. Determinar, al ingreso del paciente COVID19, la expresión de HLA-DR en monocitos.
4. Determinar, al ingreso del paciente COVID19, la expresión de TREM en monocitos.

5. Determinar si existe asociación entre el número, tipo de monocitos y la expresión de HLA-DR y/o TREM1 y una mayor frecuencia para requerir apoyo ventilatorio o los decesos.

Metodología

Diseño del Estudio

Analítico: Se evaluó si existe asociación en pacientes COVID19 del número de monocitos con fenotipo activado y el uso de apoyo ventilatorio o deterioro de función renal.

Observacional: El número de monocitos con fenotipo activado fue determinado al ingreso de su estancia hospitalaria y se registró el uso de apoyo ventilatorio o deterioro de función renal.

Transversal: Se realizó solo una medición del número de monocitos con fenotipo activado

Prospectivo: Pacientes fueron reclutados para su inclusión en el presente estudio y hasta concluir el periodo establecido para el proyecto o cuando se cumplió el cálculo de la muestra. ***Universo de trabajo***

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

Criterios de inclusión

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

Criterios de no inclusión

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

Criterios de Eliminación

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

Tamaño de muestra

1. Considerando las condiciones de la pandemia y el número de pacientes que recientemente se diagnostican, se considerará una muestra por conveniencia y se incluirán a todos los pacientes que cumplan los criterios de inclusión de marzo a septiembre de 2020.

Variables

Variables dependientes

1. Número de monocitos con fenotipo activado
2. Número de pacientes que necesitan apoyo ventilatorio
3. Número de pacientes que tienen deterioro de función renal

Variables Independientes

1. Prueba positiva de RT-PCR para COVID-19
2. Gravedad de la enfermedad evaluada por las siguientes escalas: SOFA, qSOFA, y SIRA (Síndrome de insuficiencia respiratoria del adulto)
3. Variables sociodemográficas, laborales y personales.
4. Edad
5. Género

6. Presencia de comorbilidades: diabetes mellitus, hipertensión arterial, cardiopatías, sobrepeso/obesidad
7. Toxicomanías
8. Actividad laboral actual (exposición a polvos y químicos), pensionado, número de trabajos
9. Fiebre ≥ 38 C, tos, fatiga, cefalea, disnea, congestión nasal, secreción nasal, estornudos, dolor articular y muscular, dolor de garganta, diarrea
10. Número de días con los síntomas.
11. Datos de la biometría hemática y la química sanguínea (glucosa, creatinina, perfil lipídico y hepático, índice aterogénico).
12. Dímero D, proteína C reactiva ultrasensible y fibrinógeno
13. Características sociodemográficas (condiciones económico-sociales)

Definición operacional de las variables

Variable	Tipo	Definición conceptual	Definición operacional	Escala medición	Fuente de información
Edad	Cuantitativa continua	Tiempo en años a partir del nacimiento	Tiempo en años a partir del nacimiento	Años	Expediente clínico
Género	Cualitativa Nominal Dicotómica	Característica biológica que permite clasificar a los seres humanos en hombres o mujeres	masculino o femenino	0=hombre 1= mujer	Expediente clínico
Caso confirmado	Cualitativa Dicotómica	Persona que cumpla con la definición operacional de caso sospechoso y que cuente con diagnóstico confirmado por la Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública	Positivo o negativo	Positivo o negativo a SARS CoV2	Expediente clínico/ o resultado del laboratorio reconocido a solicitud

		reconocidos por el InDRE			
SOFA (Sequential Organ Failure Assessment Score)	Cuantitativa Discreta	Escala utilizada para la valoración de la severidad de disfunción orgánica, la cual involucra parámetros clínicos (Frecuencia arterial media y escala de Glasgow) y de laboratorio (Plaquetas, $\times 10^3$ / μ L, Bilirubina, mg/dL, Creatinina, mg/Dl, etc.)	puntuación SOFA más alta está asociada con una mayor probabilidad de mortalidad	valores del 0 al 4	Expediente clínico
Índice de Masa Corporal (IMC)		Indicador que marca la relación entre el peso y la talla de un individuo utilizado en la detección del sobrepeso y obesidad en adultos.	Se calcula utilizando el peso en kilogramos dividido por el cuadrado de la talla en metros (kg/m^2)	IMC normal es de 18.5 a 24.9 sobrepeso como un IMC igual o superior a 25 y la obesidad como un IMC igual o superior a 30	Expediente clínico
Cantidad de Células CD14+ que expresan: HLA-DR, y TREM-1	Cuantitativa Discreta	Cantidad de Células CD14+ en circulación.	Porcentaje de Células CD45 ⁺ CD14 ⁺ FS C ^{med} SSC ^{med}	cel/mL	Inmunofenotip o por citometría de flujo

DEFINICIONES

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

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

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

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

SOFA (*Sequential Organ Failure Assessment Score*): Escala utilizada para la valoración de la severidad de disfunción orgánica, la cual involucra parámetros clínicos (Frecuencia arterial media y escala de Glasgow) y de laboratorio (Plaquetas, $1 \times 10^3 /\mu\text{L}$. Bilirubina, mg/dL. Creatinina, mg/dL. etc). Tiene valores del 0 al 4, donde una puntuación SOFA más alta está asociada con una mayor probabilidad de mortalidad. El puntaje califica la anormalidad por sistema de órganos y explica las intervenciones clínicas³⁹.

qSOFA (*quick SOFA*): Escala simplificada denominada "SOFA rápido" para facilitar la identificación de pacientes potencialmente en riesgo de morir. Consta de tres parámetros clínicos (Frecuencia respiratoria ≥ 22 /min, cambio en el estado mental y presión arterial sistólica ≤ 100 mmHg) a los que se les asigna un punto (Valores de la escala de 0-3). La puntuación qSOFA de ≥ 2 puntos indica disfunción orgánica⁴⁰

SIRA (Síndrome de Insuficiencia Respiratoria del Adulto): Síndrome agudo caracterizado por falla respiratoria de origen no cardiogénico que conlleva a disfunción en la oxigenación⁴¹.

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

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

Dímero D: El dímero D (DD) es un producto de degradación de la fibrina, su presencia indica un proceso de fibrinólisis posterior a una trombosis. Se expresa en FEU (Unidades Equivalentes de Fibrinógeno)

Proteína C Reactiva ultrasensible: La PCR es producida por el hígado. La concentración en suero se eleva cuando hay inflamación en todo el cuerpo. Esta es una de un grupo de proteínas llamadas "reactantes de fase aguda" que aumentan en respuesta a la inflamación. La prueba ultrasensible (proteína C reactiva ultrasensible) permite medir la PCR cuando la proteína se encuentra en cantidades muy pequeñas. Se expresa en mg/L.

Fibrinógeno: El fibrinógeno, última proteína de la cascada de la coagulación, puede medirse por métodos químicos o inmunitarios, se encuentra en concentraciones que van de 200 a 400 mg/dL. En condiciones de estrés actúa como un reactante de fase aguda y puede elevarse hasta 800 mg/dL. Se expresa en mg/dL.

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

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

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

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

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

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

Ventilación mecánica: Procedimiento de respiración artificial que otorga soporte temporal a la función ventilatoria de los músculos inspiratorios en lo que se corrige la causa de la insuficiencia respiratoria.

Lesión Renal Aguda: Es la disminución abrupta y generalmente reversible de la tasa de filtración glomerular (TFG). Esto da como resultado una elevación del nitrógeno sérico de urea en sangre (BUN), creatinina y otros productos de desecho metabólico que normalmente son excretados por el riñón. Tomando en cuenta dos variables aumento de creatinina y disminución de volúmenes urinarios se clasifica en tres estadios:

Estadio 1: Aumento de creatinina basal >1.5 a 1.9 veces el valor de la creatinina basal o flujo urinario <0.5 ml/kg/hora durante 6-12 hrs.

Estadio 2: aumento 2-2.9 veces el valor de la creatinina basal o flujo urinario <0.5 ml/kg/hora durante más de 12 hrs.

Estadio 3: Aumento mayor a 3 veces el valor de la creatinina basal o creatinina sérica mayor o igual a 4 mg/dl. O inicio de tratamiento sustitutivo de la función renal.

Severidad de la enfermedad por COVID-19:

Asintomático: PCR positiva para SARS COV2 sin datos clínicos de la enfermedad

Leve: Síntomas de infección aguda de tracto respiratorio superior incluyendo fiebre, fatiga, mialgias, tos, dolor faríngeo, rinorrea y estornudos sin neumonía.

Moderada: Neumonía, frecuentemente fiebre y tos, algunas veces puede haber disnea, pero no hipoxemia ni dificultad respiratoria.

Severa: Rápida progresión alrededor de una semana, disnea, con cianosis central, saturación capilar de oxígeno menor a 92%, con otras manifestaciones de hipoxemia.

Critica: Pacientes con distrés respiratorio agudo o falla respiratoria, estado de choque o falla orgánica múltiple.

Procedimiento General

En nuestro modelo de muestreo no probabilístico de casos consecutivos de pacientes que cumplieron con los criterios de selección y aceptaron participar en el estudio (o los representantes legales) mediante consentimiento informado (con firma en la carta de consentimiento informado, ver Anexos), se realizó el siguiente protocolo: Los pacientes con sintomatología compatible con COVID-19 y que acudieron a la UMAE serán evaluados por los médicos encargados de Admisión Continua de Urgencias de pacientes con potencial infección por SARS-CoV2. El área de *Triage* respiratorio se diseñó como un circuito “*lean health*” con la finalidad de ser más eficiente el proceso de valoración clínica de los pacientes⁴². En caso de corresponder a caso grave que requiriera de hospitalización, en aquellos candidatos de acuerdo a los criterios de inclusión, se invitó al paciente o a su familiar responsable a participar mediante la firma del consentimiento informado (Anexo 1). Se procedió a la recolección de datos clínicos, de acuerdo al formato correspondiente. (Anexo 2) y toma de muestra de sangre periférica.

Diagnóstico molecular

Una vez hecho el diagnóstico clínico de presunción se tomará una muestra para diagnóstico molecular (RT-PCR). Por disposición oficial, las muestras de los pacientes sospechosos son enviadas a los laboratorios de vigilancia epidemiológica del IMSS quienes son los encargados y certificados institucionalmente para realizar el diagnóstico y reportar los casos. Serán incluidos en el estudio aquellos pacientes que se ingresen a hospitalización en esta unidad (UMAE HE CMN SXXI, IMSS). Las muestras iniciales se tomarán en pacientes sin resultado de RT-PCR, ya que la entrega del resultado lleva 48 horas. Por lo que existe la posibilidad de tomar muestras en pacientes con resultados negativos.

Detección del virus SARS-CoV-2

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

Toma de la muestra de sangre periférica

La toma de muestra de sangre se realizó por venopunción (o a través del catéter central en caso de contar con él); aproximadamente 6 mL de sangre que se recuperaron en un tubo Vacutainer con Heparina de Litio como anticoagulante, siguiendo los protocolos de protección para el paciente y para el personal médico (Anexo 3). La toma de muestra se realizó en las primeras 24 horas posteriores al ingreso. Se reclutó a personas sanas (sin enfermedad respiratoria) como grupo control de personas sanas a quienes se extrajo la muestra por venopunción de la vena humeral previa sepsia y antisepsia y colectadas también en tubos vacutainer con heparina de litio como anticoagulante.

Inmunofenotipificación de leucocitos por citometría de flujo

La cuantificación de células se realizará como se detalla a continuación:

A 220 μ L de sangre total, se le adicionaron 1,100 μ L de solución de lisis de eritrocitos (cloruro de amonio al 0.15M,) y se incubó por 10 min a temperatura ambiente.

Posteriormente se adicionó 1 mL de solución amortiguadora a base de fosfatos (PBS 1x) y se centrifugó durante 5 min a 1500 rpm. El botón celular obtenido se suspendió en 150 μ L de PBS 1x y se contaron las células a fin de verificar y registrar viabilidad y dejar una suspensión de $4-5 \times 10^6$ células/mL. Se agregaron 50 μ L de esta suspensión celular a un tubo de auto-fluorescencia (AF) y a un tubo para inmunofenotipificación que contiene con los siguientes anticuerpos: CD45 Pacific Blue, CD14 PE-Cy7, CD16 APC-Cy7 y HLA-DR PE-Cy5 y TREM-1 PE, con 50 μ L de la suspensión celular. Pasados 15 min de incubación a temperatura ambiente y en oscuridad, se agregaron 250 μ L de una dilución 1:10 de solución de lisis y fijado (BD FACSTM Lysing Solution) y se incubaron por 10 min a temperatura ambiente en oscuridad. Finalmente, las células se lavaron por centrifugación agregando 1 ml de PBS y posteriormente se suspendieron en 50 μ L de solución isotónica. Se adquirieron al menos cinco mil eventos de la zona de monocitos utilizando un citómetro FACS ARIA IIu (BD™ Biosciences, San José, CA, USA). FACS Aria IIu, que se encuentra en el Laboratorio Centro de Instrumentos/Citometría de Flujo de la Coordinación de Investigación en Salud, ubicado en la planta baja del Hospital de Especialidades CMN “Siglo XXI”, del IMSS.

Algoritmo de análisis: Para la identificación y caracterización de leucocitos circulantes se utilizaron los siguientes criterios:

Células (FSC vs SSC), no agregadas (FSC-A vs FSC-H) y CD45+

A partir de leucocitos totales, se utiliza, para la identificación de las subpoblaciones:

- Monocitos: $FSC^{med}SSC^{med}CD45^{med}CD14^{-/+}CD16^{-/+}$
 - Monocitos Clásicos: $FSC^{med}SSC^{med}CD45^{med}CD14^{+}CD16^{-}$
 - Monocitos Intermedios: $FSC^{med}SSC^{med}CD45^{med}CD14^{+}CD16^{+}$

- Monocitos No Clásicos: $FSC^{med}SSC^{med}CD45^{med}CD14^{-/low}CD16^{+}$

Para la expresión de marcadores asociados con activación se analizó el % células positivas y MIF de los marcadores como se indica a continuación:

- Monocitos Clásicos: $FSC^{med}SSC^{med}CD45^{med}CD14^{+}CD16^{-}HLA-DR^{+}$
- Monocitos Intermedios: $FSC^{med}SSC^{med}CD45^{med}CD14^{+}CD16^{+}HLA-DR^{+}$
- Monocitos No Clásicos: $FSC^{med}SSC^{med}CD45^{med}CD14^{-/low}CD16^{+}HLA-DR^{+}$
- Monocitos y Media del valor de la intensidad de Fluorescencia TREM-1+

Análisis estadístico

Se utilizó estadística descriptiva con base a las variables de interés. Así para las variables categóricas se reportaron proporciones. Para variables cuantitativas discretas o continuas, se determinó la media, mediana, moda y desviación estándar. De acuerdo a su distribución y varianza, se determinará el uso de estadísticos paramétricos o no-paramétricos. Así el análisis comparativo entre las características sociodemográficas (hombre vs mujer), edad (categorías de edad), comorbilidades (enfermo vs no enfermo), desenlace (Mejoría vs deceso) con la concentración de los biomarcadores inflamatorios, ya sea frecuencias, medias o distribuciones de poblaciones, se realizaron pruebas de hipótesis mediante t de Student ó U-Mann Whitney o ANOVA de 2 vías y post-prueba Bonferroni o Dunn cuando así corresponda. a. Los resultados se procesaron utilizando Excel, GraphPad Prisma y el programa STATA v.14.

Aspectos éticos

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

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

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

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

Balance Riesgo/Beneficio: Dado que las determinaciones biológicas se hicieron en el laboratorio, donde la UIMIQ cuenta con las medidas de bioseguridad necesarias para ello, así como el manejo confidencial de los datos, y de que el procedimiento en los pacientes es

parte del manejo indicado por su padecimiento. El único riesgo es el relacionado con la toma de sangre, la cual se realizó por un profesional con experiencia, los cuales se ven altamente superados por el beneficio académico y social de la información a obtener.

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

Selección de Participantes: Antes de invitar a cada paciente a participar en el proyecto, se le explicó ampliamente su patología y las estrategias terapéuticas que le corresponden al momento, así como la posibilidad de participación en la investigación y los riesgos y potenciales beneficios que pueden derivar de ello. Si el paciente decidía no ser seleccionado para el protocolo se continuó su tratamiento tal y como está indicado de acuerdo con el protocolo de tratamiento de pacientes con COVID-19 en la UMAE Hospital de Especialidades de CMN “Siglo XXI”, acordes a la norma oficial mexicana vigente y la normativa del IMSS.

Aspectos de Bioseguridad

1. La investigación se considera de riesgo mayor al mínimo en aspectos de bioseguridad ya que se colectaron datos del expediente clínico, a través de un cuestionario, así como de la toma de muestra sanguínea por personal calificado y con material estéril pero de pacientes con COVID19. Si bien se ha reportado que los viriones SARS CoV2 aislados de sangre periférica no resultan infectantes ni el cultivos celulares ni en modelos animales, se requiere de instalaciones de contención y bioseguridad. Se anexa la carta de bioseguridad que informa acerca del manejo de muestras de sangre. Los RPBI generados durante el estudio fueron manejados bajo la norma NOM-087-ECOL-SSA1-2002.

2. Las muestras de sangre fueron recolectadas en el área asignada para manejo de los pacientes con COVID-19. Una vez colectadas se colocaron en hieleras etiquetadas adecuadamente para su transporte exclusivo a la Unidad de Investigación Médica en Inmunoquímica de la UMAE del Hospital de Especialidades, Centro Médico Nacional Siglo XXI, por los investigadores responsables del proyecto. En dicha Unidad de Investigación se realizó el manejo de la muestra para la inmunofenotipificación en un área tipo BSL2, que cuenta con campara de Bioseguridad nivel II.

3. Las muestras de sangre se obtuvieron de pacientes que cumplen los criterios de selección. Todo el material punzocortante empleado para la toma de muestras, así como el desecho de estas en el laboratorio fueron depositados en recipientes especiales, manejados por expertos para el desecho de estos. La UIMIQ cuenta con campanas y áreas para el trabajo con nivel de bioseguridad 2, necesarias para el manejo de las muestras de estos pacientes.

4. Este protocolo no contempla el uso de fármacos o de procedimientos quirúrgicos más allá de los indicados por las normas vigentes para el tratamiento de infección por SARS-CoV2,

por lo cual los riesgos y efectos colaterales para el participante son mínimos, restringiéndose a la posible formación de un hematoma debido a la punción de la vena para la toma de la muestra. Esto se explica con detenimiento en la carta de consentimiento y asentimiento.

Resultados

Como se observa en la Tabla 1, de variables socio- demográficas, la edad, distribución por género, talla son similares entre los pacientes con COVID 19 y los sujetos control o sanos. Así mismo, las características generales de los pacientes que sobrevivieron (egreso por mejoría) y aquellos que fallecieron (decesos), son similares.

Tabla 1. Variables Sociodemográficas y de desenlace entre pacientes con COVID y grupo control

VARIABLE	COVID19 Mejoría(n=13)	COVID19 Deceso(n=10)	CONTROL Sanos (n=10)
Edad	47 ± 1	58 ± 18	41.4 ± 8.5
Género (Mujeres:Hombr es)	25:2 1	19:16	6:5
Talla (mts)	1.6 ± 7.5	1.7 ± 4.3	1.5 ± 8
Leucocitos circulantes (x10⁵/dL)	16.5 ± 7.6	15.4 ± 12.415	8.3 ± 1.7
APACHE	8	9	NA
SOFA	4	7	NA
Ventilación Mecánica Asistida	1	6	NA

Entre las diferencias observadas entre los pacientes COVID19 que presentaron mejoría, está el haber requerido de ventilación mecánica asistida, siendo significativamente superior en aquellos que fallecieron ($p < 0.05$, Tabla 1). Así mismo, el índice de masa corporal fue mayor en los pacientes COVID19 respecto a sujetos sanos (control), aunque en los pacientes COVID de acuerdo al desenlace no hubo diferencia (figura 1). Los pacientes presentaron taquicardia respecto a sujetos sanos y taquipnea en el caso de aquellos que no sobrevivieron (Figura 1)

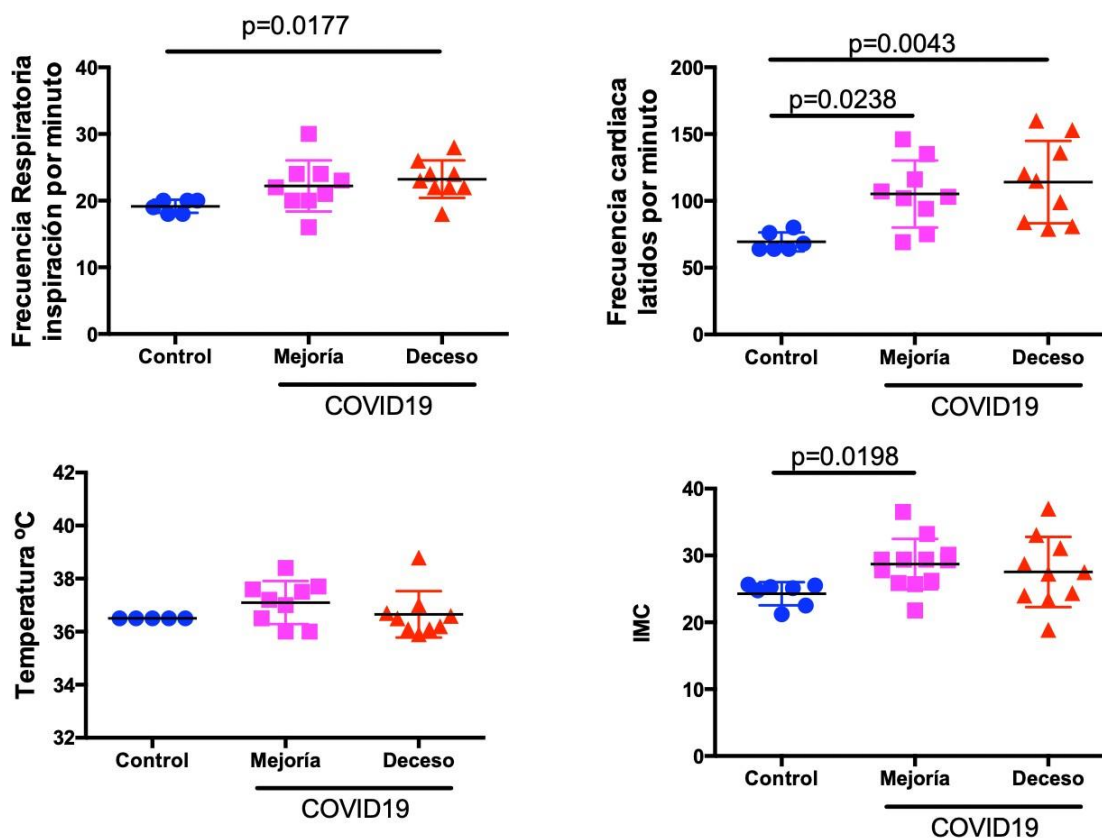


Figura 1. Comparación de signos e índice de masa corporal (IMC) de los pacientes y sujetos sanos. Se presentan los signos de frecuencia respiratoria, frecuencia cardiaca, temperatura e IMC de sujetos sanos (control), con COVID19 que presentaron mejoría y con COVID19 que fallecieron (deceso). Prueba de Kruskal Wallis.

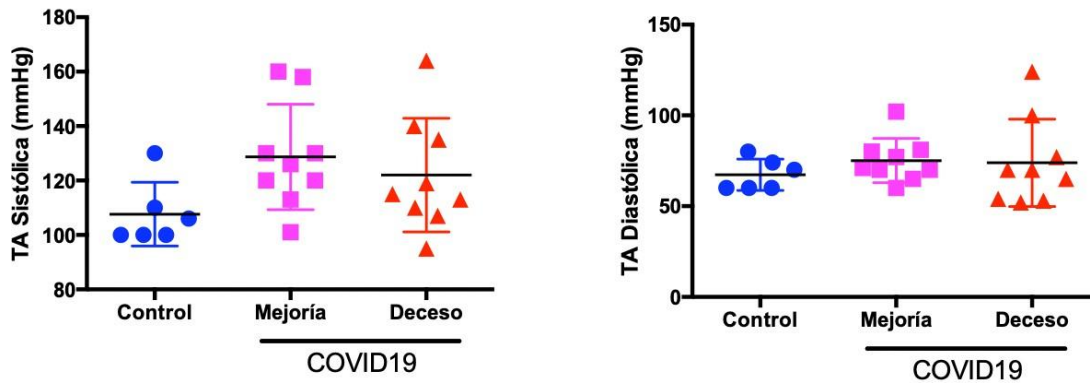


Figura 2. Tensión Arterial en grupos estudiados. Se muestran las cifras de tensión arterial sistólica y sistólica de los sujetos sanos (control), y pacientes COVID 19, tanto los que egresaron por mejoría, como quienes fallecieron antes de su egreso (decesos). Prueba de Kurskal Wallis. Significancia $p < 0.05$.

Las cifras de tensión arterial entre los grupos analizados no tuvieron diferencia significativa (Figura 2).

En lo referente a la cantidad de monocitos, como se observa en la Figura 3, tanto en el número absoluto, como en el porcentaje de estos respecto a leucocitos totales, no existen diferencias significativas entre los grupos analizados (control y COVID19).

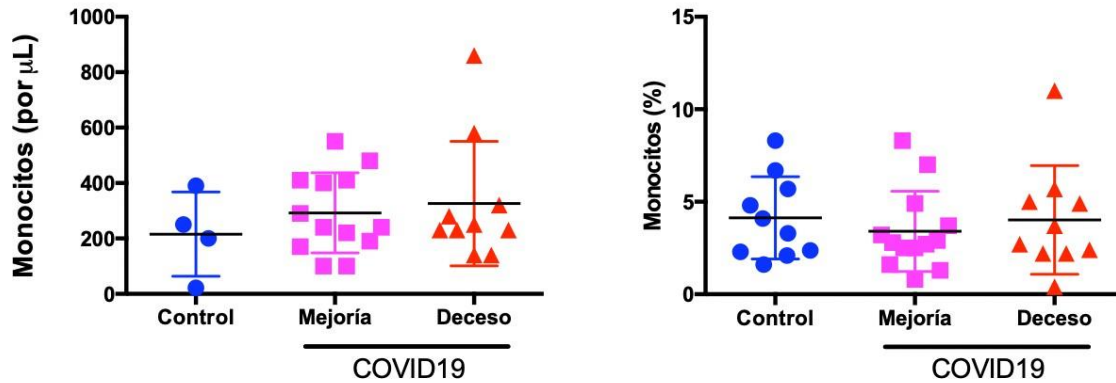


Figura 3. La cantidad de monocitos no se modifican por COVID 19 o se desenlace. Se muestran el número de monocitos en sangre periférica y su frecuencia (%) respecto a leucocitos totales de los sujetos sanos (control), y pacientes COVID 19, tanto los que egresaron por mejoría, como quienes fallecieron antes de su egreso (decesos). Prueba de Kurskal Wallis. Significancia $p < 0.05$.

Si bien el número tal de monocitos y su frecuencia respecto a leucocitos no presenta diferencias significativas entre los grupos analizados, llama la atención, que como se observa en la Figura 4, que en los pacientes con COVID19 es mayor la frecuencia de monocitos clásicos, independientemente si sobrevivieron o no.

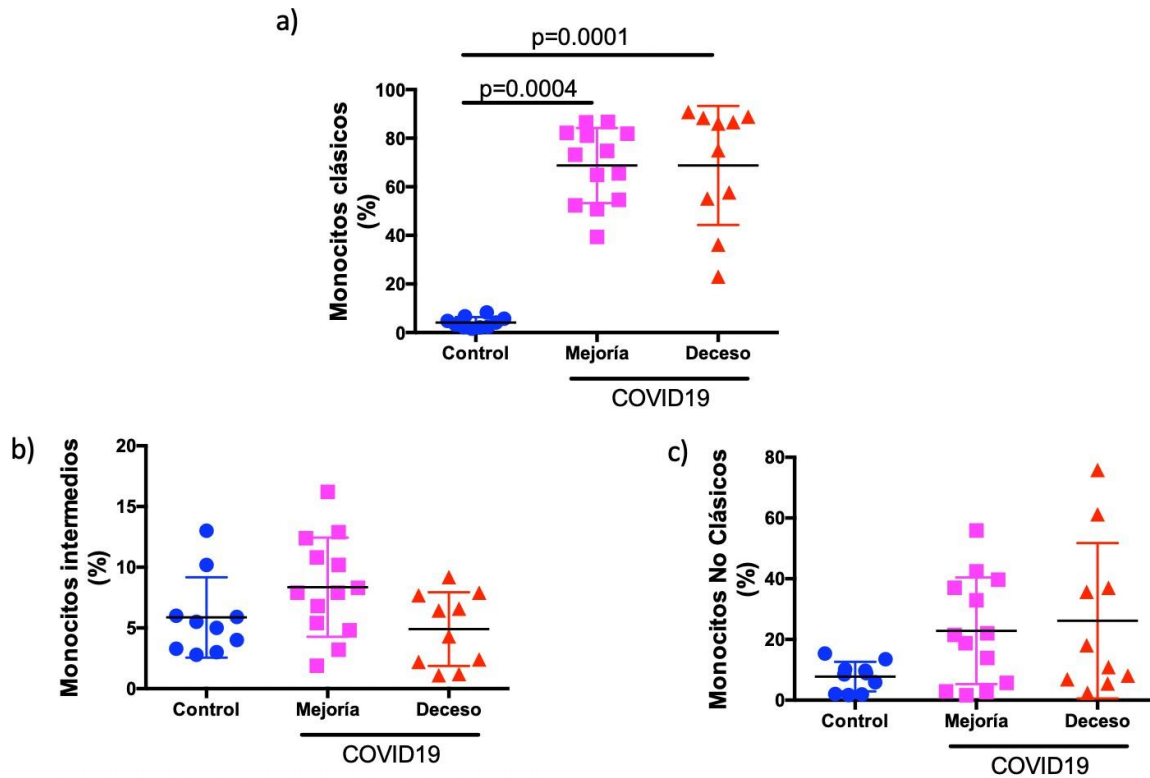


Figura 4. Se reportan las frecuencias (%) de las subpoblaciones de monocitos: clásicos, Intermedios y No Clásicos de los sujetos sanos (control) y pacientes COVID 19 que sobrevivieron (mejoría) y fallecieron (Decesos). Prueba estadística Kurskal Wallis.

La frecuencia de monocitos que expresan HLA-DR, en comparación con sujetos sanos, es significativamente menor en los pacientes con COVID19, tanto en los que egresaron por mejoría que aquellos que fallecieron para los subtipos de monocitos intermedios como no clásicos (Figura 5 , a y b). En el caso de monocitos clásicos, esta menor frecuencia de células que expresan HLA-DR es menor solo en el caso de pacientes COVID19 que fallecieron (Figura 5c)

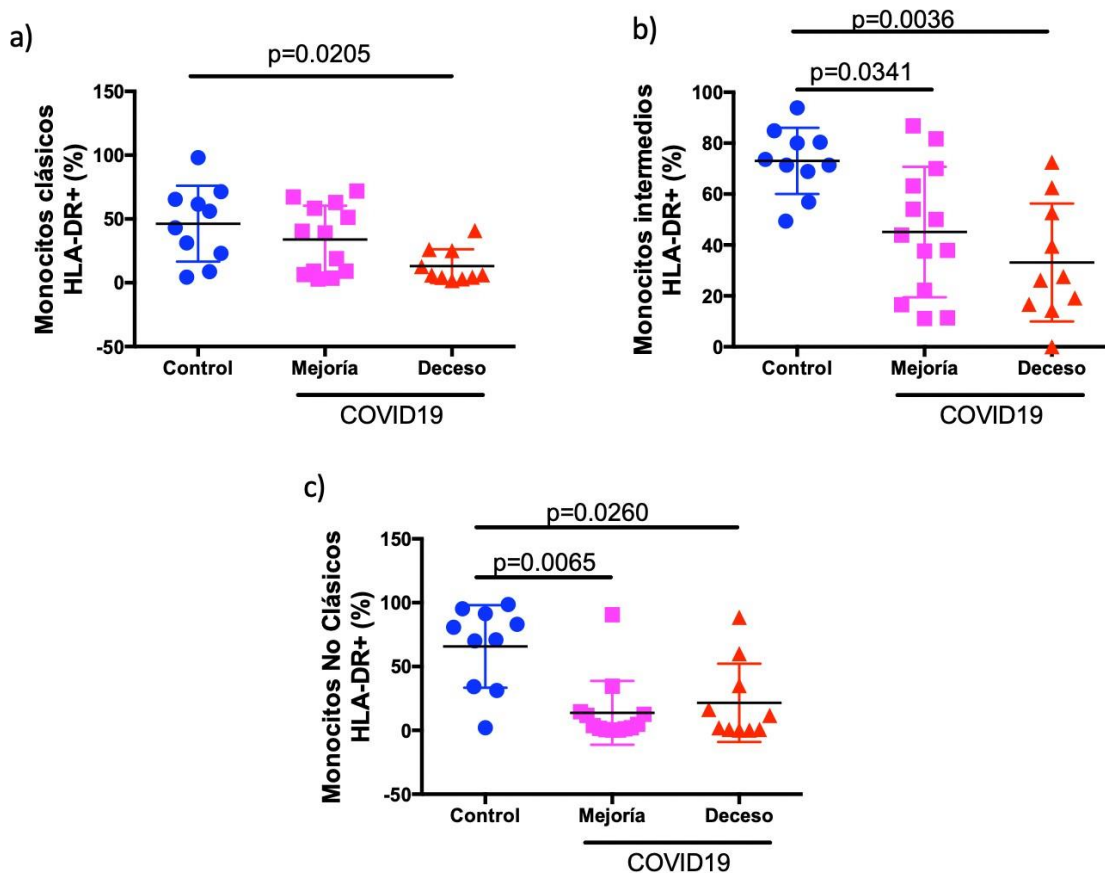


Figura 5. En pacientes con COVID19 que no sobrevivieron es menor la proporción de monocitos de todos los subtipos que expresan HLA-DR. Se muestran los porcentajes de monocitos clásicos, intermedios y no clásicos que expresan HLA-DR en los sujetos sanos (control), y pacientes COVID 19, tanto los que egresaron por mejoría, como quienes fallecieron antes de su egreso (decesos). Prueba de Kurskal Wallis..

Como se muestra en la Figura 6, los pacientes que fallecieron por COVID19 presentaron, con respecto a sujetos sanos (control) significativamente menor nivel de expresión de HLA-DR en todos los subtipos de monocitos (clásicos, no clásicos e intermedios) , y esto también fue significativo en el caso de los pacientes que sobrevivieron (egreso por mejoría) en los monocitos No Clásicos.

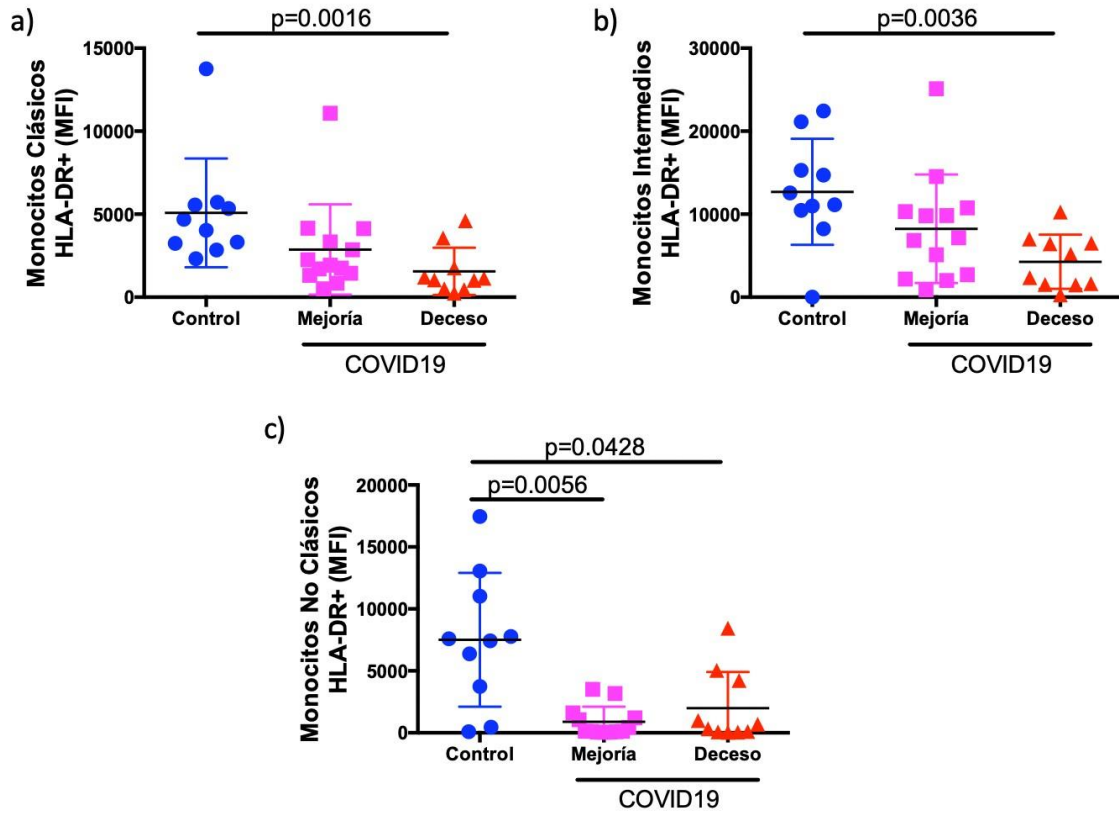


Figura 6. La expresión de HLA-DR se asocia con peor pronóstico en pacientes con COVID 19. De cada paciente se muestra el valor de la media de la intensidad de fluorescencia correspondiente al marcador HLA-DR en la superficie de monocitos clásicos ($CD14^+CD16^-$), Intermedios ($CD14^+CD16^+$) o Monocitos no clásicos ($CD14^{low/-}CD16^+$) de sujetos sanos (Control, ●), COVID 19 que presentaron mejoría (■) o con COVID 19 que fallecieron (▲). Prueba de Kurskal Wallis.

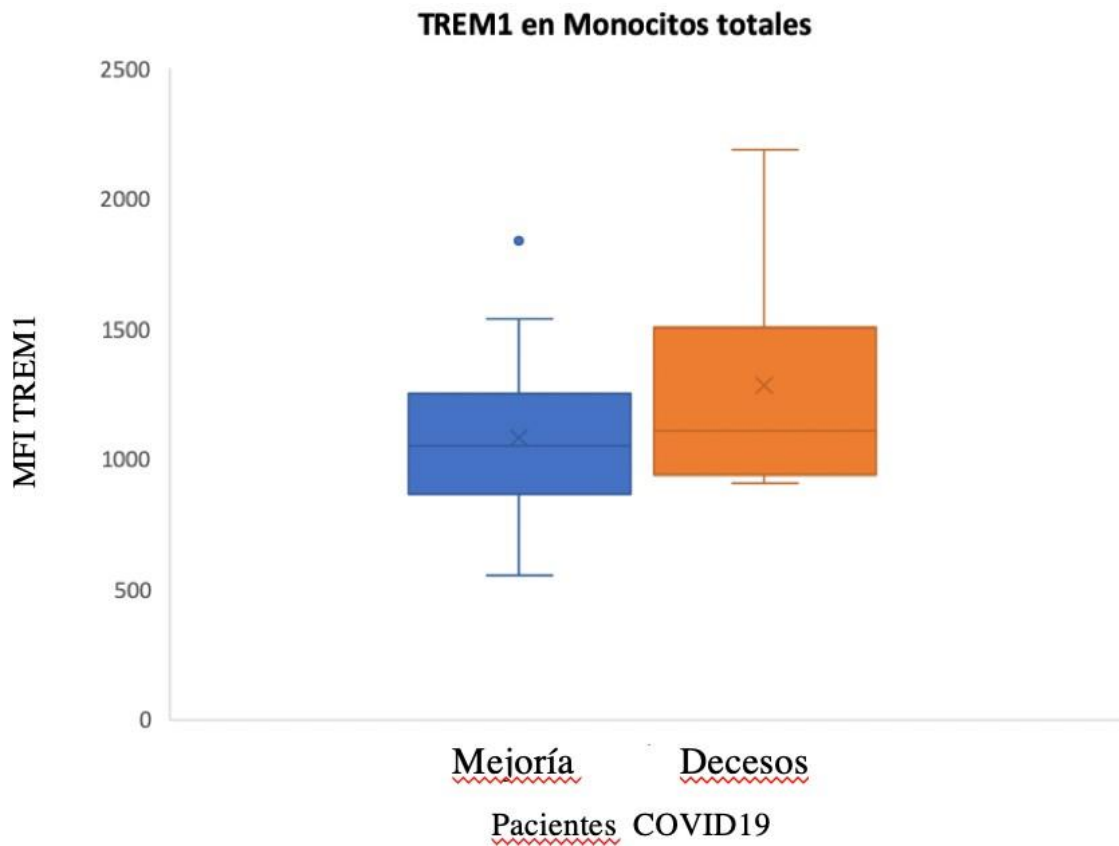


Figura 7. TREM 1 tiende a expresarse en pacientes con COVID19 con la muerte como desenlace. Se muestra el promedio de la expresión de TREM1 en pacientes con COVID19 que mejoraron o fallecieron antes de su egreso hospitalario. Kurskal Wallis.

Finalmente en lo que se refiere a la expresión de TREM 1, si bien no se alcanzó diferencia significativa, observamos una tendencia a mayor expresión en los monocitos de aquellos pacientes que fallecieron por COVID19.

Discusión

Como se observa en la tabla de descripción de características demográficas, los pacientes son comparables en lo general, aunque hay una tendencia a presentar mayor edad entre aquellos que no sobrevivieron, lo que coincide con que la edad avanzada es un factor de riesgo para desarrollar formas graves de COVID19⁹. Observamos que son personas con sobrepeso y/u obesidad quienes suelen presentar con COVID19, sin embargo, a diferencia de lo reportado por otros autores²⁷, no encontramos diferencias respecto al desenlace aunque todavía quedará por resolver si el estado inflamatorio que pudo llevar a complicaciones puede haber sido diferente entre estos pacientes que analizamos. También es de reconocerse que el número de observaciones es limitado para el tipo de análisis que asocian variables como peso y edad a complicaciones o mal pronóstico.

Se ha reportado que los pacientes con co-morbilidades, incluyendo la hipertensión pueden contribuir a la presentación de complicaciones en pacientes con COVID19²⁹. Nosotros no encontramos diferencias en las cifras de tensión arterial que se midieron al momento de la evaluación de los pacientes, previo a la toma de la muestra sanguínea. Por ello, es probable que, aún existiendo como co-morbilidad previa, se encontraran controladas las cifras tensionales, debido al manejo que se les dio en la UMAE Hospital de Especialidades. Llama la atención, que al menos para el momento de la toma, el descontrol de la tensión arterial no

parece ser un factor de riesgo para complicaciones, dado que no se relacionó con el tipo de desenlace de los pacientes.

A diferencia de lo reportado para sepsis o SARS CoV2 no encontramos diferencias en la cantidad y frecuencia de monocitos respecto a leucocitos circulantes totales. Esto coincide con lo reportado por otros autores que observaron linfopenia, pero no cambios en los monocitos.

Sin embargo, la composición de este grupo de monocitos varía en los pacientes COVID19, donde se incrementa significativamente el número de monocitos clásicos, lo que contrasta con los reportes de sepsis de origen bacteriano, en los que se observan incrementos en la cantidad de monocitos no clásicos respecto a sujetos sanos¹⁸.

Encontramos que en similitud a lo que previamente hemos reportado en pancreatitis (SIRS) o sepsis, en los pacientes con inflamación sistémica como COVID19 disminuye el número de células que expresan HLA-DR, así como el nivel de expresión de esta molécula como lo evidencia la MFI obtenida para esta molécula.

Así mismo, de acuerdo a lo que hemos publicado en nuestro grupo y otros, la expresión de TREM1 está incrementada en aquellos pacientes con peor pronóstico en pancreatitis y sepsis³⁵ y observamos una tendencia en a este mismo incremento en los pacientes con COVID19 que analizamos. Lo anterior sería acorde con lo que se ha sugerido respecto a que en los pacientes con COVID19 existe un estado hiper-inflamatorio con desbalance en la distribución de leucocitos y funcionalidad alterada, con alto potencial inflamatorio, pero pobre contención de SARS CoV2 u otros agentes que podrían sumarse como infecciones agregadas a complicar a los pacientes.

Conclusión

La expresión de marcadores asociados a activación y que además permiten la subclasificación de monocitos se expresa diferencialmente en pacientes con COVID19, parecido a lo reportado para otros estados inflamatorios sistémicos

Referencias

1. Fung TS, Liu DX. Human Coronavirus: Host-Pathogen Interaction. *Annu Rev Microbiol* 2019;73:529-57.
2. Woo PC, Lau SK, Lam CS, et al. Discovery of seven novel Mammalian and avian coronaviruses in the genus deltacoronavirus supports bat coronaviruses as the gene source of alphacoronavirus and betacoronavirus and avian coronaviruses as the gene source of gammacoronavirus and deltacoronavirus. *J Virol* 2012;86:3995-4008.
3. Phelan AL, Katz R, Gostin LO. The Novel Coronavirus Originating in Wuhan, China: Challenges for Global Health Governance. *JAMA* 2020.
4. Perlman S, Netland J. Coronaviruses post-SARS: update on replication and pathogenesis. *Nat Rev Microbiol* 2009;7:439-50.
5. Chafekar A, Fielding BC. MERS-CoV: Understanding the Latest Human Coronavirus Threat. *Viruses* 2018;10.
6. Graham RL, Donaldson EF, Baric RS. A decade after SARS: strategies for controlling emerging coronaviruses. *Nat Rev Microbiol* 2013;11:836-48.
7. Ai T, Yang Z, Hou H, et al. Correlation of Chest CT and RT-PCR Testing in Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) in China: A Report of 1014 Cases. *Radiology* 2020:200642.
8. Masters PS, Kuo L, Ye R, Hurst KR, Koetzner CA, Hsue B. Genetic and molecular biological analysis of protein-protein interactions in coronavirus assembly. *Adv Exp Med Biol* 2006;581:163-73.
9. Fung TS, Liu DX. Post-translational modifications of coronavirus proteins: roles and function. *Future Virol* 2018;13:405-30.

10. Zheng J, Yamada Y, Fung TS, Huang M, Chia R, Liu DX. Identification of N-linked glycosylation sites in the spike protein and their functional impact on the replication and infectivity of coronavirus infectious bronchitis virus in cell culture. *Virology* 2018;513:65-74.
11. Krahling V, Stein DA, Spiegel M, Weber F, Muhlberger E. Severe acute respiratory syndrome coronavirus triggers apoptosis via protein kinase R but is resistant to its antiviral activity. *J Virol* 2009;83:2298-309.
12. Mesel-Lemoine M, Millet J, Vidalain PO, et al. A human coronavirus responsible for the common cold massively kills dendritic cells but not monocytes. *J Virol* 2012;86:7577-87.
13. Lim YX, Ng YL, Tam JP, Liu DX. Human Coronaviruses: A Review of Virus-Host Interactions. *Diseases* 2016;4.
14. Chang YJ, Liu CY, Chiang BL, Chao YC, Chen CC. Induction of IL-8 release in lung cells via activator protein-1 by recombinant baculovirus displaying severe acute respiratory syndrome-coronavirus spike proteins: identification of two functional regions. *J Immunol* 2004;173:7602-14.
15. Chen IY, Chang SC, Wu HY, et al. Upregulation of the chemokine (C-C motif) ligand 2 via a severe acute respiratory syndrome coronavirus spike-ACE2 signaling pathway. *J Virol* 2010;84:7703-12.
16. Mielech AM, Kilianski A, Baez-Santos YM, Mesecar AD, Baker SC. MERS-CoV papain-like protease has deISGylating and deubiquitinating activities. *Virology* 2014;450-451:64-70.
17. Nicholls JM, Poon LL, Lee KC, et al. Lung pathology of fatal severe acute respiratory syndrome. *Lancet* 2003;361:1773-8.
18. Li T, Qiu Z, Zhang L, et al. Significant changes of peripheral T lymphocyte subsets in patients with severe acute respiratory syndrome. *J Infect Dis* 2004;189:648-51.
19. Yu XY, Zhang YC, Han CW, Wang P, Xue XJ, Cong YL. [Change of T lymphocyte and its activated subsets in SARS patients]. *Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao* 2003;25:542-6.
20. Cai C, Zeng X, Ou AH, Huang Y, Zhang X. [Study on T cell subsets and their activated molecules from the convalescent SARS patients during two follow-up surveys]. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi* 2004;20:322-4.
21. Zhao J, Zhao J, Van Rooijen N, Perlman S. Evasion by stealth: inefficient immune activation underlies poor T cell response and severe disease in SARS-CoV-infected mice. *PLoS Pathog* 2009;5:e1000636.
22. Law HK, Cheung CY, Ng HY, et al. Chemokine up-regulation in SARS-coronavirus-infected, monocyte-derived human dendritic cells. *Blood* 2005;106:2366-74.
23. Wathelet MG, Orr M, Frieman MB, Baric RS. Severe acute respiratory syndrome coronavirus evades antiviral signaling: role of nsp1 and rational design of an attenuated strain. *J Virol* 2007;81:11620-33.
24. Hermiston ML, Xu Z, Weiss A. CD45: A Critical Regulator of Signaling Thresholds in Immune Cells. *Annual review of immunology* 2003;21:107-37.
25. Minami Y, Stafford FJ, Lippincott-Schwartz J, Yuan LC, Klausner RD. Novel redistribution of an intracellular pool of CD45 accompanies T cell activation. *The Journal of biological chemistry* 1991;266:9222-30.

26. Bruning T, Daiminger A, Enders G. Diagnostic value of CD45RO expression on circulating T lymphocytes of fetuses and newborn infants with pre-, peri- or early post-natal infections. *Clinical and experimental immunology* 1997;107:306-11.
27. Santis AG, Lopez-Cabrera M, Sanchez-Madrid F, Proudfoot N. Expression of the early lymphocyte activation antigen CD69, a C-type lectin, is regulated by mRNA degradation associated with AU-rich sequence motifs. *European journal of immunology* 1995;25:2142-6.
28. Martin-Romero C, Santos-Alvarez J, Goberna R, Sanchez-Margalet V. Human leptin enhances activation and proliferation of human circulating T lymphocytes. *Cellular immunology* 2000;199:15-24.
29. Lindsey WB, Lowdell MW, Marti GE, et al. CD69 expression as an index of T-cell function: assay standardization, validation and use in monitoring immune recovery. *Cytotherapy* 2007;9:123-32.
30. Radulovic K, Rossini V, Manta C, Holzmann K, Kestler HA, Niess JH. The early activation marker CD69 regulates the expression of chemokines and CD4 T cell accumulation in intestine. *PloS one* 2013;8:e65413.
31. Pisapia L, Cicatiello V, Barba P, et al. Co-regulated expression of alpha and beta mRNAs encoding HLA-DR surface heterodimers is mediated by the MHCII RNA operon. *Nucleic acids research* 2013;41:3772-86.
32. Birle A, Nebe CT, Gessler P. Age-related low expression of HLA-DR molecules on monocytes of term and preterm newborns with and without signs of infection. *Journal of perinatology : official journal of the California Perinatal Association* 2003;23:294-9.
33. Lin ZQ, Guo J, Xia Q, et al. Human leukocyte antigen-DR expression on peripheral monocytes may be an early marker for secondary infection in severe acute pancreatitis. *Hepato-gastroenterology* 2013;60:1896-902.
34. Magnusson SE, Wennerberg E, Matt P, Lindqvist U, Kleinau S. Dysregulated Fc receptor function in active rheumatoid arthritis. *Immunology letters* 2014.
35. Gonzalez-Roldan N, Ferat-Osorio E, Aduna-Vicente R, et al. Expression of triggering receptor on myeloid cell 1 and histocompatibility complex molecules in sepsis and major abdominal surgery. *World journal of gastroenterology : WJG* 2005;11:7473-9.
36. Su L, Han B, Liu C, et al. Value of soluble TREM-1, procalcitonin, and C-reactive protein serum levels as biomarkers for detecting bacteremia among sepsis patients with new fever in intensive care units: a prospective cohort study. *BMC infectious diseases* 2012;12:157.
37. Qian L, Weng XW, Chen W, Sun CH, Wu J. TREM-1 as a potential therapeutic target in neonatal sepsis. *International journal of clinical and experimental medicine* 2014;7:1650-8.
38. Lemarie J, Barraud D, Gibot S. Host Response Biomarkers in Sepsis: Overview on sTREM-1 Detection. *Methods Mol Biol* 2015;1237:225-39.
39. Fowler RA, Lapinsky SE, Hallett D, et al. Critically ill patients with severe acute respiratory syndrome. *JAMA* 2003;290:367-73.
40. Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA* 2016;315:801-10.
41. Cutts S, Talboys R, Paspula C, Prempeh EM, Fanous R, Ail D. Adult respiratory distress syndrome. *Ann R Coll Surg Engl* 2017;99:12-6.
42. Tejedor P, F., Mejora del proceso de un servicio de urgencias de hospital mediante la metodología Lean. *Emergencias* 2014;26:84-93.

Anexo

Anexo 1. Carta de consentimiento informado



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

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

Nombre del estudio:	“Marcadores de activación en células mieloides de pacientes con COVID19”
Patrocinador externo (si aplica):	NO APLICA
Lugar y fecha:	
Número de registro institucional:	
Justificación y objetivo del estudio:	<p>A usted se le invita a participar en este estudio por que cumple con los criterios de inclusión, que dentro de ellos es presentar la enfermedad COVID-19, generada por el virus SARS-CoV2 (Coronavirus).</p> <p>Nuestro objetivo es conocer si un tipo de células de defensa (leucocitos) que son de la primera línea de defensa(las células mieloides) están más activadas en respuesta al proceso infeccioso/inflamatorio de pacientes con COVID19.</p> <p>Al igual que usted, otras personas más serán invitadas a participar. Su participación en este estudio es completamente voluntaria. Por favor lea la información que le proporcionamos, y haga las preguntas que desee antes de decidir si desea o no participar.</p>
Procedimientos:	<p>Si usted acepta participar ocurrirá lo siguiente:</p> <p>Le pediremos que nos permita tomarle de su brazo dos muestras de sangre, una al inicio de su evaluación por el servicio de emergencia/urgencias. La cantidad de sangre que le tomaremos en cada ocasión equivale a una cucharada sopera regular (6mL). También requerimos que nos otorgue autorización para tomar algunos datos de su expediente clínico que nos permitan saber detalles del proceso infeccioso.</p> <p>De cada una la muestra de sangre, tomaremos una pequeña parte y la pondremos en contacto con moléculas (anticuerpos) que al unirse o no a las células (leucocitos) en su sangre indican el tipo de célula y si está o no activada (inmunofenotipo).</p>
Posibles riesgos y molestias:	<p>Dolor o moretón en el brazo donde entra la aguja para tomar la sangre. En este estudio más allá del dolor mínimo asociado con la toma de sangre, las molestias son la recopilación de la información mediante el cuestionario y la toma de signos vitales. La información recopilada de su expediente clínico será tomada bajo absoluta reserva y no se manipularán sus datos personales ya que no son necesarios para el análisis.</p>
Posibles beneficios que recibirá al participar en el estudio:	<p>Aunque directamente no obtendrá ningún beneficio de los datos obtenidos, estos permitirán verificar si la activación de las células mieloides pueden o no servir como indicadores de los pacientes a complicarse o resolver más rápido la enfermedad y orientar la vigilancia selectivamente en un futuro para otras personas que lleguen a padecer de COVID19 o enfermedades parecidas.</p>
Información sobre resultados y alternativas de tratamiento:	<p>Usted recibirá el tratamiento adecuado para resolver la infección respiratoria que padece, independientemente que resulte ser por COVID-19 u otro agente infeccioso diferente a SARS CoV2, en el remoto caso de presentarse complicaciones asociadas a su participación en el presente estudio, el IMSS otorgará y cubrirá todas las atenciones requeridas.</p> <p>Si a Usted le interesan conocer sus resultados de lo que analizamos de su sangre y células de defensa, puede contactar a la responsable del proyecto, a la Dra. Lourdes Andrea Arriaga Pizano al teléfono 55 56 276900 ext. 21476</p>
Participación o retiro:	<p>Su participación en este estudio es completamente voluntaria. Si usted decide no participar, seguirá recibiendo la atención médica brindada por el IMSS, se le ofrecerán los procedimientos establecidos dentro de los servicios de atención médica del IMSS. Es decir, que, si usted no desea participar en el estudio, su decisión, no afectará su relación</p>

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

Privacidad y confidencialidad:

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

Declaración de consentimiento:

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

No acepto participar en el estudio.

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

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

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

Investigadora o Investigador Responsable: Dra. Lourdes Andrea Arriaga Pizano, Unidad de Investigación Médica en Inmunoquímica Hospital de Especialidades, CMNN "Siglo XXI", IMSS
Teléfono. 55 56 276900 ext. 21476

Colaboradores: Dr. Rubén Ramírez Montes de Oca, Teléfono:

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

Nombre y firma del participante _____

Nombre y firma de quien obtiene el consentimiento _____

Testigo 1

Testigo 2

Nombre, dirección, relación y firma _____

Nombre, dirección, relación y firma _____

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

Clave: 2810-009-013

Anexo 2. Carta de Recolección de datos

Nombre del paciente								
Número de afiliación								
Teléfono								
Edad								
Género		Masculino		Femenino				
Peso (kg)								
Talla (m)								
Comorbilidades	Comorbilidades (Índice de Charlson)							
	Diabetes	Si (1)	No (0)	Hipertensión Arterial	Si (1) No (0)			
	Complicación crónica de DM	Si (1)	No (0)	Dislipidemia	Si (1) No (0)			
	Enfermedad arterial periférica	Si (1)	No (0)	Insuficiencia cardiaca IV	Si (1) No (0)			
	Enfermedad vascular cerebral	Si (1)	No (0)	Cardiopatía isquémica /IAM	Si (1) No (0)			
	Demencia	Si (1)	No (0)	Insuficiencia renal crónica	Si (1) No (0)			
	Epilepsia	Si (1)	No (0)	Insuficiencia hepática aguda	Si (1) No (0)			
	Enf. Tejido conectivo	Si (1)	No (0)	Cirrosis hepática	Si (1) No (0)			
	Hipotiroidismo	Si (1)	No (0)	Lupus	Si (1) No (0)			
	inmunosupresión	Si (1)	No (0)	infección VIH /SIDA	Si (1) No (0)			
	RCP previo a ingreso	Si (1)	No (0)	EPOC	Si (1) No (0)			
	Linfoma	Si (1)	No (0)	Leucemia	Si (1) No (0)			
	Tumor solido	Si (1)	No (0)	Úlcera gastroduodenal	Si (1) No (0)			
	Tabaquismo	Si (1)	No (0)	Exposición humo	Si (1) No (0)			
	Medicación Crónica							
Diagnóstico de ingreso								
Fecha ingreso a TRIAGE								
Fecha de ingreso a unidad COVID								
Fecha de inicio de síntomas								
Síntomas iniciales		Si	No	Si	No			
Otros síntomas	Fiebre			Fatiga				
	Disnea			Diarrea				
	Tos			Náuseas				
	Rinorrea			Hiposmia/anosmia				
	Expectoración			Artralgias				
	Mialgias			Cefalea				
	Artralgias			Dolor torácico				
	Disgeusia			Otros, especifique				
Laboratorios	Parámetro		Ingreso		Días 3-7		Días 7-15	
	Hemoglobina							
	Leucocitos totales							
	Linfocitos totales							
	Neutrófilos totales							
	Plaquetas							
	Creatinina							
	Glucosa							
	Bilirrubinas totales							
	DHL							
	Proteína C reactiva							
	Procalcitonina							
	Dímero D							
	Fibrinógeno							
	CK total							
	Uresis (ml/kg/hora)							
	Lactato							
	pH							
	pCO ₂							
	pO ₂							
HCO ₃								
Saturación O ₂								
FiO ₂								
Ferritina								

Anexo 3. Carta de Bioseguridad

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

Quien suscribe Dra. Lourdes Andrea Arriaga Pizano con número de matrícula 99092680, adscrito a la Unidad de Investigación Médica en Inmunoquímica, de la UMAE Hospital de Especialidades “Dr. Bernardo Sepúlveda Gutiérrez”, Centro Médico Nacional “Siglo XXI”, hace constar que el protocolo titulado: “Marcadores de activación en células mieloides de pacientes con COVID19”, del cual es responsable, TIENE IMPLICACIONES DE BIOSEGURIDAD debido a que se trabajará con (marcar las opciones que apliquen):

(X) Material biológico infecto-contagioso: Tejido sanguíneo de pacientes con COVID19

- Cepas patógenas de bacterias o parásitos: __ (bacteria o parásito) _____
- Virus: __ (virus) _____
- Material radiactivo: __ (radioisótopo(s)) _____
- Animales y/o células y/o vegetales genéticamente modificados: (tipo de material) _____
- Sustancias tóxicas, peligrosas o explosivas: (tipo de material) _____
- Material que puede poner en riesgo la salud o la integridad física del personal de salud o los derechohabientes del IMSSo afectar al medio ambiente: __ (tipo de material) _____
- Animales (de laboratorio, granja o vida silvestre): _____
- Trasplante de células, tejidos u órganos _____
- Terapiacelular _____

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

(Enlistar los documentos que apliquen):

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

También manifiesta que existe evidencia documental auditable de que:

- a) Se cuenta con los permisos y/o licencias oficiales que se requieran para llevar a cabo el trabajo propuesto.
- b) Las instalaciones de los laboratorios involucrados se encuentran en estado satisfactorio de operación y son adecuadas para llevar a cabo el trabajo propuesto (Con nivel de Bioseguridad tipo BCL2).
- c) El equipo a utilizar se encuentra en estado satisfactorio de operación.
- d) Existen dispositivos personales de protección que se encuentran en estado satisfactorio de operación.
- e) Los involucrados en el proyecto, incluyendo a los estudiantes que participen en el mismo, han recibido la capacitación necesaria para trabajar con el material señalado anteriormente.
- f) Se mantendrán las condiciones adecuadas de instalaciones, equipo y personal durante el desarrollo del proyecto y que el protocolo se suspenderá en caso de haber alguna irregularidad.



Dra. Lourdes Andrea Arriaga Pizano

Investigador Asociado D.

Unidad de Investigación Médica en Inmunoquímica

Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI. IMSS.

Tel: 56276900 ext. 21476

Correo electrónico: landapi@hotmail.com