



**VNiVERSiDAD
D SALAMANCA**

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL

**Departamento de Medicina
Doctorado en Biociencias: Biología y Clínica del Cáncer y Medicina
Traslacional**

TESIS DOCTORAL

Análisis Dinámico del Perfil Inflamatorio e Inmune de Pacientes con Síndrome de Respuesta Inflamatoria Sistémica (SIRS)

Directores:

Prof. Dr. Fermín Sánchez-Guijo Martín

Dra. Sandra Muntión Olave

Prof. Dr. Juan Francisco Blanco Blanco

Gerardo Javier Martí Chillón

Salamanca, 2023



**VNiVERSiDAD
D SALAMANCA**



Prof. Dr. Fermín Sánchez-Guijo Martín, con D.N.I. 07869479Y, Doctor en Medicina, Profesor Titular de la Facultad de Medicina de la Universidad de Salamanca, Jefe de Unidad del Área de Terapia Celular y Jefe de Servicio de Hematología del Hospital Clínico Universitario de Salamanca.

Dra. M.ª Sandra Muntión Olave, con D.N.I. 16567353Q Doctora en Biología por la Universidad de Salamanca e Investigador Postdoctoral en el laboratorio de Terapia Celular del Servicio de Hematología del Hospital Clínico Universitario de Salamanca.

Prof. Dr. Juan Francisco Blanco Blanco, con D.N.I. 10190192L Doctor en Medicina, Profesor Titular de la Universidad de Salamanca y Jefe de Servicio de Traumatología del Hospital Clínico Universitario de Salamanca.

CERTIFICAN:

Que el presente trabajo titulado "Análisis Dinámico del Perfil Inflamatorio e Inmune de Pacientes con Síndrome de Respuesta Inflamatoria Sistémica (SIRS)" realizado por D. Gerardo Javier Martí Chillón bajo su dirección en el Departamento de Medicina de la Universidad de Salamanca, reúne a su juicio méritos suficientes y originalidad para que su autor pueda optar al grado de Doctora de la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, firman la siguiente certificación en Salamanca a 6 de octubre de 2023

Prof. Dr. F. Sánchez-Guijo

Dra. S. Muntión

Prof. Dr. J.F. Blanco

Este trabajo de investigación ha sido financiado por:

- Ayudas complementarias de movilidad destinadas a beneficiarios del programa FPU de carácter competitivo en la convocatoria 2023 (EST23/00099 BMED).
- Contrato Predoctoral del Ministerio de Universidades del Gobierno de España en el Marco de Plan de Formación de Profesorado Universitario (FPU) con referencia FPU18/03533.
- El Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) “A way to make Europe” / “Investing in your future”, y el Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS) del Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Sanidad (PI19/01455).
- Gerencia Regional de Salud de Castilla y León (GRS 164/A/17) y el Ayuntamiento de Salamanca (2019/00098/001).

Los resultados obtenidos a lo largo de este proyecto de Tesis Doctoral han sido publicados en los artículos científicos:

- **Gerardo J. Martí-Chillón**, Sandra Muntión, Silvia Preciado, Lika Osugui, Almudena Navarro-Bailón, Javier González-Robledo, Víctor Sagredo, Juan F. Blanco, Fermín Sánchez-Guijo. Therapeutic potential of mesenchymal stromal/stem cells in critical-care patients with systemic inflammatory response syndrome. Clin Transl Med. 2023;13(1): e1163.
- Raúl López*, **Gerardo J. Martí-Chillón***, Juan F. Blanco, Carmen da Casa, Javier González-Robledo, David Pescador, Silvia Preciado, Sandra Muntión, Fermín Sánchez-Guijo. MSCs from politrauma patients: preliminary comparative study with MSCs from elective-surgery patients. Stem Cell Research & Therapy, 2021. 12, 451.

Los resultados obtenidos a lo largo de este proyecto de Tesis Doctoral han sido presentados en los siguientes congresos y seminarios científicos:

- Comunicación oral y presentación de póster en la II Jornada de Encuentro entre Grupos de Investigación del IBSAL celebrado el 13 de junio de 2023 en el edificio Discórides de la Universidad de Salamanca. El título del trabajo presentado fue "Análisis multiparamétrico de la respuesta SIRS: Identificación de nuevos biomarcadores y potenciales dianas terapéuticas".
- Comunicación oral del trabajo titulado "Estudio comparativo de las vesículas extracelulares de pacientes con Síndrome de Respuesta Inflamatoria Sistémica" en el III Congreso Anual Internacional de Estudiantes de Doctorado en la Universidad Miguel Hernández celebrado el 2 y 3 de febrero de 2023.
- Presentación del póster "Sequential multiparametric assessment of the dynamics of leukocytes, serum biomarkers and extracellular vesicles in septic patients admitted into the intensive care unit" en el 15th World Congress on Inflammation celebrado en Roma (Italia) el 5-8 de junio de 2022.
- Comunicación oral y presentación de póster en la I Jornada de Encuentro entre Grupos de Investigación del IBSAL celebrado el 27 de mayo de 2022 en el edificio Discórides de la Universidad de Salamanca. El título del trabajo presentado fue "Síndrome de respuesta inflamatoria sistémica de origen traumático: perfil inflamatorio y papel regulador de las células estromales mesenquimales".
- Presentación del póster titulado "Estudio comparativo del síndrome de respuesta inflamatoria sistémica entre pacientes politraumatizados y sépticos" en el II Congreso Anual Internacional de Estudiantes de Doctorado en la Universidad Miguel Hernández celebrado el 3 y 4 de febrero de 2022.

ABREVIATURAS

A

ALP: Fosfatasa Alcalina

ALT: Alanina transaminasa

APACHE II: *Acute Physiology and Chronic Health disease Classification System II*

ARDS: *Acute Respiratory Distress Syndrome*

AST: Aspartato transaminasa

AUC: Área Bajo la Curva

C

CARS: *Compensatory Antinflammatory Response Syndrome*

CCL-n: *CC motif Chemokine Ligand "n"*

CD: *Cluster of Differentiation*

Células NK: *Células Natural Killer*

CFU-F: Unidad Formadora de Colonias de tipo Fibroblástico

CMF: Citometría de Flujo

cMo: Monocitos Clásicos

CRRP: Terapia de reemplazo renal continuo

CXCR-n: *CXC motif Chemokine Receptor "n"*

CXCL-n: *CXC motif Chemokine Ligand "n"*

D

DAMPs: *Damage associated molecular patterns*

DIC: *Disseminated Intravascular Coagulation*

DMEM: *Dulbecco's modified Eagle's medium*

DMSO: Dimetil Sulfóxido

DCs: Células Dendríticas

E

ECMO: oxigenación por membrana extracorpórea

EDTA: Ácido Etilendiaminotetraacético

ELISA: *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*

F

FasL: *Fas Ligand*

FC: *Fold Change*

FcεRI: Receptor de IgE de alta afinidad

FiO₂: Fracción inspirada de oxígeno

FITC: Fluoresceína-5-Isocianato

FMO: Fluorescencia menos uno

FSC: *Forward Scatter*

G

G-CSF: Factor Estimulante de Colonias Granulocíticas

GCS: *Glasgow coma score*

GGT: Gamma-glutamil transferasa

GM-CSF: Factor Estimulante de Colonias Granulomonocíticas

H

HBSS: *Hank's Balanced Salt Solution*

HSC: Célula Progenitora Hematopoyética

I

ICCA: IntelliSpace Cuidados Críticos y Anestesia

IDO: *Indoleamine 2,3-dioxygenase*

IFN γ : Interferón Gamma

IL-n: Interleucina "n"

IMDM: *Iscove's Modified Duplecco's Medium*

iMo: Monocitos Intermedios

ISCT: Sociedad Internacional de Terapia Celular

ISEV: Sociedad Internacional de Vesículas Extracelulares

ISS: *Injury Severity Score*

L

LDH: Lactato deshidrogenasa

LST: *Lymphocyte Screening Tube*

M

M-CSF: Factor Estimulante de Colonias Monocíticas

MARS: *Mixed Antagonist Response Syndrome*

mDCs: Células Dendríticas Mieloides

MDSCs: *Myeloid-derived Suppressor Cells*

MET: Microscopio Electrónico de Transmisión

MFI: Mediana de Intensidad de Fluorescencia

MHC I y II: Complejo Mayor de Histocompatibilidad-1 y -2

MIF: *Macrophage Migratory Inhibitory Factor*

miRNAs: microRNAs

MNCs: Células Mononucleadas

MO: Médula Ósea

MSCs: Célula Estromales Mesenquimales

N

ncMo: Monocitos no clásicos

NETs: *Neutrophil Extracellular Traps*

NK: *Natural Killer*

NLRs: *NOD-like receptors*

NOS: Especies reactivas de nitrógeno

NP: No politrauma

NTA: *Nanoparticle Tracking Analysis*

O

O/N: *Overnight*

P

PaO₂: Presión parcial de oxígeno

PAMPs: *Pathogen associated molecular patterns*

PBMCs: Células mononucleadas de sangre periférica

PBS: Tampón Fosfato Salino

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa

PCR: Proteína C reactiva

PCT: Procalcitonina

pDCs: Células dendríticas plasmocitoides

PICS: *Persistent inflammation immunosuppression and catabolism syndrome*

PT: politrauma

PVDF: Difluoruro de polivinilideno

R

RAGE/AGER: Receptor de productos finales de glicación avanzada

RNA: Ácido Ribunocléico

ROS: *Reactive Oxygen Species*

RPMI: *Roswell Park Memorial Institute Medium*

S

SBF: Suero Bovino Fetal

SDF-1: Factor derivado del estroma 1

SIRS: Systemic Inflammatory Response Syndrome

SOFA: *Sequential Organ Failure Assessment*

SP: Sangre Periférica

SSC: *Side Scatter*

T

Tamb: Temperatura ambiente

TCE: Traumatismo craneoencefálico

TCR $\gamma\delta$: Receptor de células T gamma y delta

TGF β 1: *Transforming Growth Factor β 1*

TLRs: *Toll-like receptors*

TNF α : Factor de Necrosis Tumoral alfa

TP-INR: Tiempo de protombina - ratio internacional normalizado

TTP α : Tiempo de tromboplastina parcial activada

U

UCI: Unidad de cuidados intensivos

V

VCAM-1: Molécula de Adhesión a Célula Endotelial

VEs: Vesículas Extracelulares

VEGF: Factor de Crecimiento Endotelial Vascular

Lista de Figuras:

Figura 1. Diagrama de relación de los posibles orígenes y los estados de evolución del SIRS.

Figura 2. Representación temporal de los diferentes cuadros de evolución inflamatoria posibles tras una afectación severa.

Figura 3. Mecanismos de señalización celular y escalado inflamatorio del SIRS.

Figura 4. Migración transendotelial leucocitaria hacia el foco de infección o daño.

Figura 5. Linaje celular hematopoyético según su localización en la médula ósea o en tejidos periféricos.

Figura 6. Tipos de vesículas extracelulares según su biogénesis y contenido de membrana e interno de estas vesículas.

Figura 7. Representación de la actividad antiinflamatoria y regenerativa de la terapia con células estromales mesenquimales (MSCs) en el contexto del SIRS.

Figura 8. Potencial inmunorregulador, de protección y regulador de las MSCs.

Figura 9. Esquema principal seguido para la obtención y análisis de las muestras de estudio de sangre periférica.

Figura 10. Esquema de trabajo seguido para el procesado de las muestras de sangre periférica en tubos de heparina (gris) y EDTA (morado) de pacientes con SIRS y los sujetos sanos.

Figura 11. Esquema representativo de la obtención, caracterización y cuantificación de las VEs procedentes de plasma de pacientes SIRS.

Figura 12. Esquema seguido para la obtención de macrófagos derivados de monocitos de Buffy Coat.

Figura 13. Esquema seguido para evaluar el efecto de las condiciones SIRS sobre la maduración y activación de los monocitos sanos.

Figura 14. Metodología seguida para evaluar el efecto que tiene el plasma SIRS de diferente origen sobre la diferenciación y activación de monocitos sanos.

Figura 15. Esquema de trabajo para la obtención de células mesenquimales estromales (MSCs) de médula ósea de sujetos sanos.

Figura 16. Esquema seguido para el medir el efecto inmunomodulador de las MSCs sobre los macrófagos en condiciones SIRS.

Figura 17. Evolución de los valores de los sistemas de puntuación SOFA utilizados para determinar el pronóstico de los pacientes evaluando el nivel de daño multiorgánico.

Figura 18. Valores del grado de dependencia (ayuda personal) y calidad de vida tras 1 mes desde la salida de los pacientes del hospital.

Figura 19. Evolución en la concentración en sangre de marcadores inflamatorios: proteína C reactiva (PCR) y procalcitonina. Las líneas horizontales grises son indicadores del rango de referencia en sujetos sanos.

Figura 20. Recuento de leucocitos totales y neutrófilos en sangre periférica desde el inicio del SIRS.

Figura 21. Recuento de poblaciones de neutrófilos inmaduras.

Figura 22. Cuantificación de las poblaciones de eosinófilos y basófilos en sangre periférica.

Figura 23. *Recuento de poblaciones de monocitos en circulación.*

Figura 24. Recuento de subclases de células dendríticas y las subclases..

Figura 25. Recuento de células supresoras derivadas mieloides (MDSCs) en pacientes SIRS.

Figura 26. Valores del cociente entre el número absoluto de neutrófilos y linfocitos (Ratio neutrófilos/linfocitos) y los linfocitos en general.

Figura 27. Recuento absoluto de las subpoblaciones de linfocitos T.

Figura 28. Recuento de linfocitos B y células plasmáticas.

Figura 29. Subclases de células NK identificadas y cuantificadas mediante citometría de flujo.

Figura 30. Agrupación no supervisada (dendrograma) de las muestras SIRS según los resultados obtenidos del estudio de poblaciones leucocitarias por citometría de flujo a las a) 0h y b) 72h del inicio del SIRS.

Figura 31. Cuantificación de células progenitoras hematopoyéticas en circulación.

Figura 32. Resultados de la cuantificación de células con perfil mesenquimal en circulación en pacientes SIRS (politrauma y no politrauma) con respecto a los de sujetos sanos.

Figura 33. Expresión (MFI) del marcador HLA-DR en poblaciones presentadoras de antígenos.

Figura 34. Concentración plasmática de proteínas de fase aguda e inflamatorias en las 0 horas del SIRS en comparación con los de sujetos sanos.

Figura 35. Concentración plasmática de proteínas involucradas en el control de la inflamación tras el inicio del SIRS en comparación con los de sujetos sanos.

Figura 36. Concentración plasmática de quimiocinas en las primeras horas del SIRS en comparación con los de sujetos sanos.

Figura 37. Concentración plasmática de factores de crecimiento y de regulación de la actividad celular en las primeras horas del SIRS en comparación con los de sujetos sanos.

Figura 38. Mapas de calor del análisis de correlación de las variables de estudio a las 0 horas de todos los pacientes SIRS.

Figura 39. Representación de la correlación dentro del grupo de muestras no politrauma entre los sistemas de puntuación APACHE II (al ingreso) y SOFA a las 72h desde el inicio del SIRS con la citocina MIF.

Figura 40. Marcadores predictores de infecciones en pacientes SIRS derivados de un politraumatismo.

Figura 41. Análisis ROC para el estudio de la supervivencia y fallo multiorgánico (SOFA 72h) tras el SIRS.

Figura 42. Enfoque de múltiples marcadores para la predicción de la mortalidad tras el inicio del SIRS con todos los pacientes del estudio.

Figura 43. Correlación entre los días de estancia en la UCI (reales) y los esperados de los pacientes politrauma según el modelo de regresión lineal.

Figura 44. Morfología de las vesículas extracelulares de plasma de a) donante sano, b) paciente politrauma y c) paciente no politrauma.

Figura 45. Resultados de la cuantificación mediante NTA de vesículas extracelulares en el plasma en pacientes con SIRS en comparación con los de sujetos sanos.

Figura 46. Representación del análisis por NTA de la concentración de VEs plasmáticas y la distribución según el tamaño de las partículas. a) VEs de plasma sano, b) politrauma y c) plasma no politrauma.

Figura 47. Análisis de presencia de la tetraspanina CD63 por Western Blot en las vesículas extracelulares aisladas de plasma mediante ultracentrifugación. S: sano, PT: politrauma, NP: No politrauma.

Figura 48. Agrupación de las muestras según el perfil de microRNAs de las vesículas extracelulares de plasma.

Figura 49. Número y listado de los microRNAs diferencialmente expresados entre los grupos de estudio politrauma (PT), no politrauma (NP) y los sujetos sanos (S).

Figura 50. Vías celulares reguladas por los microRNAs diferencialmente expresados en las VEs de plasma de pacientes politrauma con respecto a los de sujetos sanos.

Figura 51. Morfología de los monocitos cultivados y madurados a macrófagos en las condiciones control.

Figura 52. Morfología de los macrófagos crecidos en cultivo con plasma de pacientes politrauma y no politrauma recogidos a las 0 y 72 horas desde el inicio del SIRS.

Figura 53. Expresión (MFI) de marcadores de diferenciación de macrófagos a fenotipo M1 y M2 tras el cultivo con plasma.

Figura 54. Concentración de la citocina IL-6 tras los cultivos de macrófagos en diferentes condiciones.

Figura 55. Niveles de expresión a nivel de RNA mensajero en macrófagos crecidos con plasmade diferentes sujetos.

Figura 56. Cinética de fagocitosis de los macrófagos cultivados con diferentes plasmas.

Figura 57. Morfología de los macrófagos tras ser cocultivados en transwell con MSCs en condiciones SIRS.

Figura 58. Expresión (MFI) de marcadores de membrana de diferenciación de macrófagos en condiciones SIRS en ausencia (izquierda) o cocultivo con MSCs (derecha).

Figura 59. Expresión (MFI) de marcadores de inmunomodulación de las MSCs en condiciones SIRS en cocultivo con macrófagos.

Lista de Tablas:

Tabla 1. Combinación de los anticuerpos monoclonales conjugados con fluorocromos dirigidos frente a los antígenos cluster of differentiation (CD) específicos para el tubo MoDC y LST.

Tabla 2. Panel de anticuerpos empleados para la identificación de células mesenquimales circulantes.

Tabla 3. Listado de citocinas analizadas mediante la tecnología de Luminex y el valor mínimo detectable por la sensibilidad de la técnica.

Tabla 4. Panel de anticuerpos utilizado para el estudio del perfil de macrófagos tipo M1/M2 por citometría de flujo.

Tabla 5. Genes estudiados para la caracterización del perfil M1/M2 de los macrófagos.

Tabla 6. Combinación de anticuerpos monoclonales utilizados para la caracterización inmunomoduladora de las MSCs cocultivadas con plasma y macrófagos.

Tabla 7. Demografía, evolución y marcadores clínicos de los sujetos en el momento de la inclusión en el estudio.

Tabla 8. Análisis comparativo de diferentes subgrupos generados a partir de una variable.

Tabla 9. Genes de algunas vías regulados por los microRNAs sobreexpresados en las VEs plasmáticas de pacientes politrauma con respecto a los de sujetos sanos.

ANEXOS

Lista de Figuras Suplementarias:

Figura Suplementaria 1. Modelo de la hoja de información al paciente y del consentimiento informado empleado para la obtención de muestras.

Figura Suplementaria 2. Esquema representativo del protocolo seguido para la cuantificación de citocinas plasmáticas mediante la tecnología de Luminex.

Figura Suplementaria 3. Diagrama de sectores sobre la patología origen del SIRS en los pacientes no politrauma.

Figura Suplementaria 4. Expresión (MFI) del marcador CD62L en poblaciones leucocitarias de interés.

Figura Suplementaria 5. Evolución de la concentración en plasma de proteínas de fase aguda e inflamatorias desde el inicio del SIRS.

Figura Suplementaria 6. Evolución de la concentración en plasma de proteínas involucradas en el control de la inflamación desde el inicio del SIRS.

Figura Suplementaria 7. Evolución de la concentración en plasma de quimiocinas desde el inicio del SIRS.

Figura Suplementaria 8. Evolución de la concentración en plasma de factores de crecimiento y de regulación de la actividad celular desde el inicio del SIRS.

Figura Suplementaria 9. Mapas de calor del análisis de correlación de las variables de estudio a las 0 horas de los pacientes SIRS de a) politrauma y b) no politrauma.

Figura Suplementaria 10. Listado de microRNAs sobreexpresados en el grupo politrauma con respecto al grupo control.

Figura Suplementaria 11. Imágenes de la fagocitosis de partículas pHRedo por macrófagos cultivados en condiciones SIRS.

Lista de Tablas Suplementarias:

Tabla Suplementaria 1. Criterios SIRS considerados para la inclusión de pacientes en el estudio. Los pacientes deben presentar al menos dos de los siguientes criterios tras un politraumatismo o infección para ser considerados como SIRS.

Tabla Suplementaria 2. Regiones corporales y sistema de puntuación seguido para el cálculo del Injury Severity Score.

Tabla Suplementaria 3. Variables y sistema de puntuación considerados para el cálculo de APACHE II.

Tabla Suplementaria 4. Criterios considerados para el cálculo del score SOFA.

Tabla Suplementaria 5. Índice de Katz para la medición del grado de independencia en actividades cotidianas.

Tabla Suplementaria 6. Cuestionario de salud EUROQOL-5D seguido para medir la calidad de vida de los pacientes tras el alta hospitalaria.

Tabla Suplementaria 7. Información detallada sobre la patología y las complicaciones de cada uno de los pacientes con SIRS incluidos en el estudio.

Tabla Suplementaria 8. Perfil inmunofenotípico seguido para la identificación de las poblaciones leucocitarias circulantes.

ÍNDICE

1.	INTRODUCCIÓN	1
1.1.	Síndrome de Respuesta Inflamatoria Sistémica (SIRS)	3
1.2.	Fisiopatología del SIRS.....	5
1.2.1	Evolución clínica	5
1.2.2	Marcadores clínicos.....	7
1.2.3	Tratamiento y soporte	8
1.3.	Mecanismo biológico de respuesta y modulación inflamatoria	9
1.3.1	Señalización de alarma, activación y movilización celular	9
1.3.2	Citocinas y comunicación intercelular.....	11
1.3.3	Poblaciones leucocitarias involucradas en SIRS	13
1.4.	Vesículas extracelulares como mediadores de inflamación	18
1.5.	Nuevas dianas terapéuticas y tratamientos para el SIRS	19
1.5.1	Nuevas propuestas de terapia del SIRS.....	19
1.5.2	Células mesenquimales estromales y su potencial terapéutico	20
2.	HIPÓTESIS	25
3.	OBJETIVOS	29
4.	MATERIALES Y MÉTODOS	33
4.1	Pacientes y muestras.....	35
4.2	Procesado de las muestras sangre periférica.....	36
4.2.1	Poblaciones leucocitarias circulantes.....	37
4.2.2	Células mesenquimales circulantes	39
4.3	Estudio de la concentración de citocinas en plasma sanguíneo mediante Luminex ..	41
4.4	Estudio de las vesículas extracelulares (VEs) plasmáticas.....	42
4.4.1	Obtención de VEs por ultracentrifugación (UC)	42
4.4.2	Cuantificación y caracterización de las VEs	43
4.4.2.1	Estudio morfológico mediante Microscopía Electrónica de Trasmisión (MET) ..	43
4.4.2.2	Análisis del tamaño medio y de la concentración de las VEs con la tecnología Nanoparticle Tracking Analysis (NTA)	43
4.4.2.3	Identificación de la tetraspanina CD63 por Western Blot	44
4.4.3	Análisis bioinformático del contenido en microRNAs.....	44
4.4.3.1	Extracción de RNA	44
4.4.3.2	Arrays de microRNAs.....	45
4.5	Estudio de diferenciación de macrófagos en condiciones SIRS	46

4.5.1	Obtención, cultivo y maduración de macrófagos a partir de monocitos.....	46
4.4.4	Caracterización macrofágica	48
4.4.4.1	Estudio morfológico de los macrófagos	48
4.4.4.2	Estudio del inmunofenotipo de los macrófagos	48
4.4.4.3	Análisis de citocinas del sobrenadante por Cytometry Bead Assay (CBA).....	49
4.4.4.4	Estudio del perfil de expresión genética de los macrófagos.....	49
4.4.4.5	Estudio de la capacidad fagocítica de los macrófagos	50
4.6	Células mesenquimales (MSCs) de médula ósea procedentes de donantes sanos como agentes moduladores.....	51
4.5.1	Cultivo y expansión de MSCs de médula ósea	51
4.5.2	Efecto de las MSC sobre los macrófagos en condiciones SIRS.....	51
4.5.3	Estudio del perfil inmunomodulador de las MSC en condiciones SIRS.....	52
4.7	Análisis estadístico	53
5.	RESULTADOS	57
5.1	Demografía y evolución clínica de los pacientes con SIRS	59
5.2	Análisis de poblaciones celulares de sangre periférica.....	63
5.2.1	Poblaciones leucocitarias mieloides	63
5.2.2	Poblaciones leucocitarias linfoides	67
5.2.3	Células progenitoras hematopoyéticas y células mesenquimales circulantes	70
5.2.4	Análisis de expresión (MFI) de marcadores de actividad celular	71
5.3	Concentración de citocinas en plasma sanguíneo	72
5.3.1	Citocinas involucradas en inflamación	72
5.3.2	Quimiocinas y moléculas involucradas en la migración celular	74
5.4	Relación de valores de laboratorio con la clínica y evolución de los pacientes SIRS..	75
5.4.1	Relación de variables y subagrupación	75
5.4.2	Potenciales marcadores de pronóstico.....	79
5.5	Caracterización de las vesículas extracelulares y estudio del perfil de microRNAs....	82
5.5.1	Caracterización de las VEs aisladas de plasma.....	82
5.5.1.1	Morfología de las VEs.....	82
5.5.1.2	Concentración y tamaño medio de las VEs.....	83
5.5.1.3	Expresión de la proteína CD63 en las VEs.....	84
5.5.2	Análisis comparativo del contenido en microRNAs de las VEs plasmáticas.....	84
5.5.2.1	Agrupación de las muestras según el perfil de microRNAs.....	84
5.5.2.2	Análisis de expresión diferencial de los microRNAs entre los grupos	85
5.5.2.3	Papel regulador de los microRNAs más significativos.....	86
5.6	Estudio de diferenciación de macrófagos en diferentes condiciones SIRS.....	88
5.6.1	Morfología de los macrófagos en diferentes condiciones de cultivo	88

5.6.2	Inmunofenotipo de los macrófagos	89
5.6.3	Liberación de citocinas de macrófagos en cultivo	90
5.6.4	Perfil de expresión genética de macrófagos	91
5.6.5	Capacidad fagocítica y funcional de los macrófagos en condiciones SIRS.....	91
5.7	Estudio del potencial inmunomodulador de las MSCs en condiciones SIRS.....	92
5.7.1	Estudio morfológico de los macrófagos cocultivados con las MSCs	92
5.7.2	Inmunofenotipo de los macrófagos en cocultivo con MSCs	93
5.7.3	Perfil inmunomodulador de las MSCs en condiciones SIRS	94
6.	DISCUSIÓN	97
7.	CONCLUSIONS	113
8.	ABSTRACT	125
9.	BIBLIOGRAFÍA	145
10.	ANEXOS	165

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Síndrome de Respuesta Inflamatoria Sistémica (SIRS)

El síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS, de sus siglas en inglés *Systemic Inflammatory Response Syndrome*) consiste en una reacción exacerbada y descontrolada del sistema inmunitario como respuesta a una lesión física (ej. traumatismo, agresión interpersonal, precipitación, cirugía severa), una infección u otra afectación severa (ej. pancreatitis, hemorragia, tumor) ^{1,2}. Iniciándose como un proceso inflamatorio localizado, este puede evolucionar rápidamente hacia una respuesta generalizada alterando la homeostasis sistémica a nivel hemodinámico, respiratorio, cardíaco y nervioso ³. Sumado a la lesión inicial, el SIRS puede inducir un estado de shock y de fallo multiorgánico agravando la condición clínica del paciente ^{4,5}.

La prevalencia del SIRS es muy elevada en los pacientes ingresados en el hospital (15-30%) ⁶⁻⁸. A diferencia de los pacientes que no presentan SIRS, requieren mayor soporte médico, tienen más probabilidades de ingresar en la unidad de cuidados intensivos (UCI) y presentan una mayor tasa de mortalidad ⁹⁻¹¹. Clínicamente, el SIRS se identifica por la presencia de dos o más signos en los que se consideran: fiebre o hipotermia, taquicardia, taquipnea y alteración en el recuento de leucocitos. Se ha observado que el riesgo de mortalidad aumenta de manera proporcional al número de criterios SIRS que se cumplen en el momento de admisión ^{12,13}.

La gran mayoría de los casos reportados que inducen el estado del SIRS son los derivados por un proceso infeccioso (conocido como sepsis), seguido por el de los traumáticos ^{9,14}. Por esta razón, es común que en la literatura haya un mayor énfasis en el estudio de la sepsis. Estas afectaciones hacen que el SIRS esté entre las causas más comunes de mortalidad entre los pacientes graves ^{8,15}. En la Figura 1 se muestra la interrelación de los diferentes orígenes con el proceso de SIRS/sepsis y su evolución hacia el estado de shock y de fallo multiorgánico.

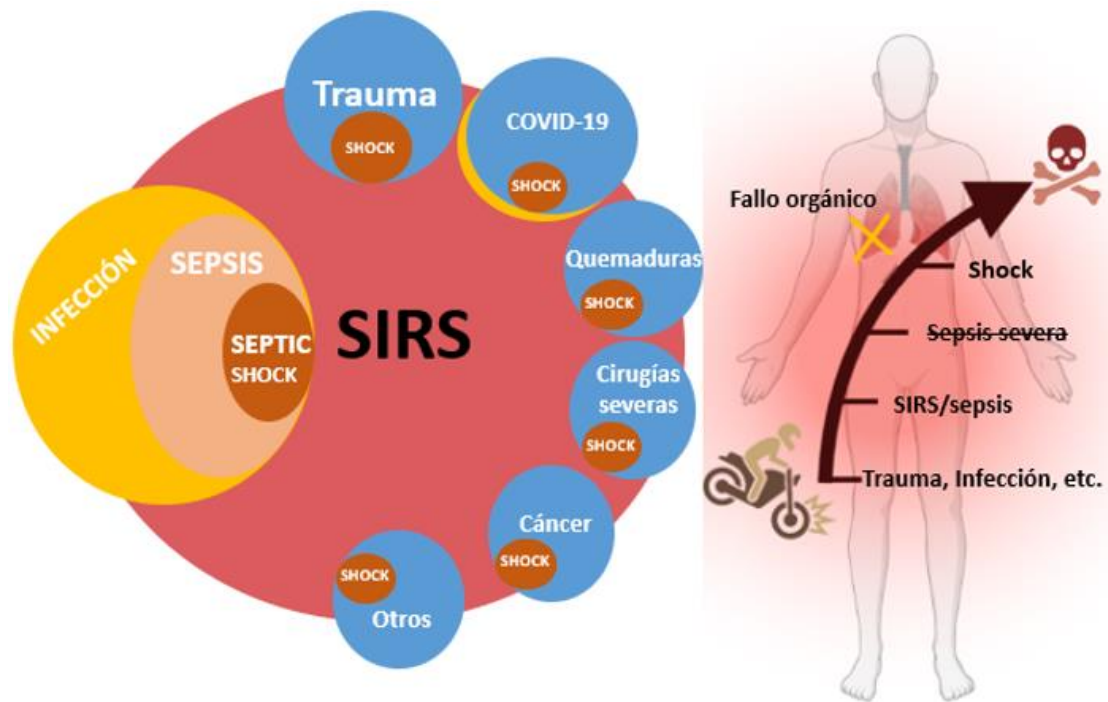


Figura 1. Diagrama de relación de los posibles orígenes y los estados de evolución del SIRS. Entre los principales orígenes del SIRS prevalecen los derivados de infecciones (bacterianas, víricas, fúngicas) y traumatismos (accidentes de tráfico, precipitaciones, agresiones interpersonales), seguido por: pancreatitis, quemaduras, cirugía invasiva, radiación, intoxicación química, cáncer, enfermedades autoinmunes, anafilaxia, entre otros.

En este trabajo toda referencia a este proceso inflamatorio se simplificará al término de SIRS. De manera convencional, se han considerado diferentes niveles de riesgo de SIRS/sepsis, sepsis severa (en desuso) y shock séptico ¹³. Esta estratificación viene determinada principalmente por el riesgo de padecer alteraciones hemodinámicas (hipotensión), metabólicas (hipoxia) y de fallo multiorgánico ¹⁶.

La respuesta SIRS es un proceso complejo debido a que están involucrados múltiples factores tanto externos (tipo de lesión) como intrínsecos de cada paciente ^{17,18}. En el caso de los politraumatismos, el paciente sufre daños en múltiples tejidos y órganos con diferente grado de lesión (fractura, laceración, rotura de vísceras, lesiones cerebrales) ^{1,19}. Por otro lado, durante un proceso infeccioso, las lesiones suelen ser más localizadas afectando a órganos o tejidos concretos. A esto se le añade la diversidad de agentes infecciosos posibles (bacterias, virus, hongos), órganos afectados inicialmente (pulmones, riñones), tratamientos, entre otros factores ^{17,20}. A pesar de las diferencias entre los insultos y la evolución multifacética del SIRS, existen patrones fisiopatológicos de respuesta que se mantienen.

1.2. Fisiopatología del SIRS

1.2.1 Evolución clínica

Convencionalmente, el SIRS se ha definido como una respuesta de tipo proinflamatoria ante un evento puntual, seguido de un estado de compensación inflamatoria (CARS, del inglés *Compensatory Inflammatory Response Syndrome*)²¹. El organismo ante un estado de inflamación promueve mecanismos (liberación de glucocorticoides, citocinas antiinflamatorias) que revierten la situación con el objetivo de recuperar la homeostasis. Por otro lado, se ha planteado que la respuesta del organismo es más compleja y que esta condición hiperinflamatoria es la combinación de múltiples señales tanto proinflamatorias como antiinflamatorias (MARS, del inglés *Mixed Antagonist Response Syndrome*), que se pueden prolongar a lo largo de las primeras semanas/meses (PICS, del inglés *Persistent Inflammation, Immunosuppression and Catabolism Syndrome*) desde el inicio del SIRS^{22,23} (Fig. 2).

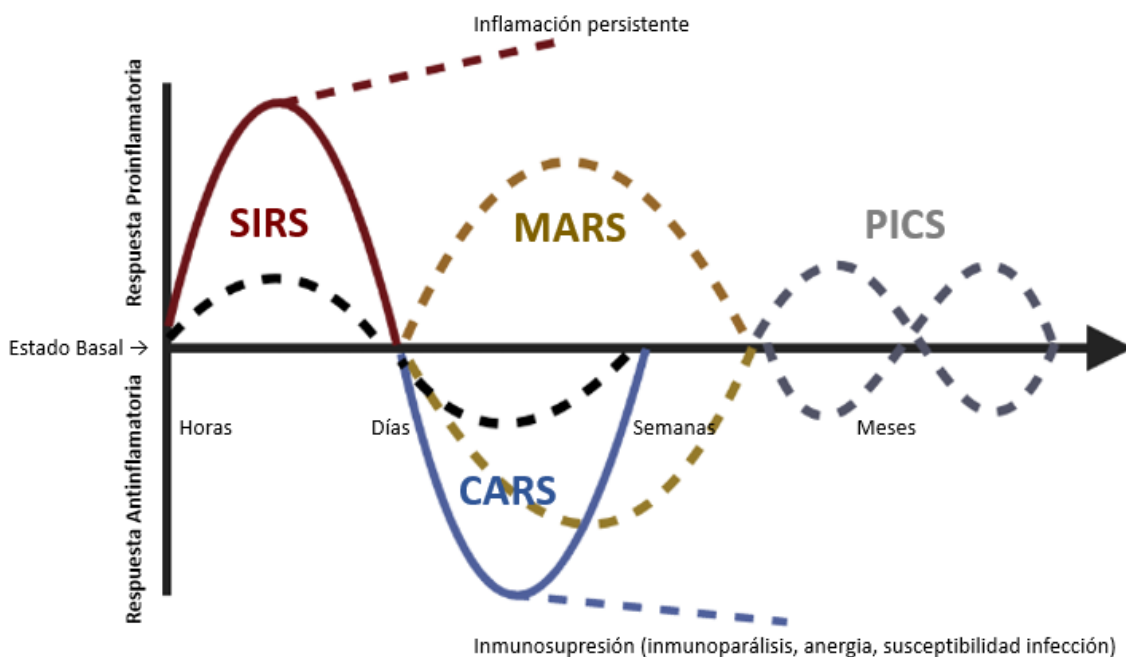


Figura 2. Representación temporal de los diferentes cuadros de evolución inflamatoria posibles tras una afectación severa. Desde el inicio del SIRS, el organismo debe compensar la respuesta hiperinflamatoria para recuperar el estado de homeostasis. Si la inflamación no supera un valor umbral, la inflamación se podrá revertir y controlar (línea discontinua negra). En el caso de afectaciones más severas (ej. politraumatismo) el umbral inflamatorio es superado (línea continua roja), donde compensar esta situación requiere de mayor esfuerzo (línea continua azul) pudiendo persistir a lo largo del tiempo (línea discontinua azul). Otros escenarios descritos son la coexistencia de los estados SIRS y CARS (MARS) prolongados durante semanas e incluso meses (PICS).

La desregulación inflamatoria que se produce durante el SIRS no solo condiciona la función del sistema inmune, sino que compromete la actividad y la integridad de múltiples tejidos y órganos. El shock (o choque) hipovolémico es el estado más grave del SIRS. Este se produce por la pérdida de tensión vascular, que lleva a un estado de hipotensión, hipoperfusión tisular e hipoxia generalizada ⁴. El organismo ante esta situación de shock responde con un aumento del gasto y de la frecuencia cardíaca, pudiendo ocasionar alteración de la función diastólica, taquicardia o arritmias ²⁴. Esta bajada de tensión viene marcada principalmente por la pérdida de fluidos al medio extravascular (aumento de la permeabilidad vascular) y la vasodilatación de los capilares ^{25,26}. En este sentido, el endotelio juega un papel crítico en la evolución del SIRS porque, además, es regulador directo de la coagulación (hemostasia primaria) y de la migración específica leucocitaria (migración transendotelial) ²⁷.

La inflamación y la activación inespecífica del endotelio (factor tisular) pueden inducir un trastorno de coagulación intravascular diseminada (DIC) caracterizado por la formación de múltiples trombos ²⁸. Los coágulos pueden bloquear capilares y reducir el aporte de oxígeno y nutrientes a los tejidos. Si el estado de hipotensión se prolonga puede llevar a un colapso circulatorio sistémico y la consecución de un fallo multiorgánico (Síndrome de disfunción multiorgánica, MODS) ¹. En esta situación la integridad y la función de los órganos vitales pueden verse comprometidas, incluso de aquellos órganos no afectados directamente por el traumatismo o por el proceso infeccioso, tales como los pulmones, los riñones, el hígado o el corazón.

Los pacientes con SIRS también suelen desarrollar una lesión aguda de riñón (AKI), donde la actividad e integridad normal de este órgano pueden verse afectadas, provocando una bajada en el rendimiento de eliminación de compuestos de desecho (tóxicos) de la sangre ²⁹. Otros órganos como los pulmones, el hígado, el tracto gastrointestinal, el sistema nervioso o el endocrino también se ven afectados durante el SIRS ³⁰⁻³².

Junto con el proceso inflamatorio, la hipoxia, la hipovolemia y la hipoperfusión tisular generalizada condicionan una situación celular hostil en los tejidos. Las células ante esta situación promueven cambios en el metabolismo de la glucosa ante la falta de oxígeno y cofactores (precursores) para obtener energía. Este hecho se caracteriza por un

aumento del lactato (hiperlactemia si lactato ≥ 2 mmol) y por una acidosis sistémica ³³. Debido a la rápida evolución hacia el estado de shock y la gravedad es crucial hacer un seguimiento y tratamiento del paciente desde los primeros instantes del SIRS.

1.2.2 Marcadores clínicos

En la actualidad no se dispone de un marcador biológico o criterio clínico único que permita predecir la evolución del paciente hacia el estado de SIRS. Sin embargo, existen marcadores que permiten hacer un seguimiento de la evolución inflamatoria y del estado del paciente más allá de los que definen el SIRS. Los reactantes de fase aguda (proteína C reactiva (PCR), procalcitonina (PCT)) son marcadores que se relacionan con procesos inflamatorios o de infección y que permiten conocer el estado inflamatorio ^{34,35}. Complementarios a estos marcadores se ha propuesto el estudio de moléculas involucradas en la inflamación como las citocinas IL-6, IL-8, TNF α , IL-10, o la ratio neutrófilo/linfocitos como indicadores de pronóstico ³⁶⁻³⁸. Sin embargo, actualmente son la PCR y la PCT (combinadas entre sí o junto con otras) las biomoléculas de mayor referencia ^{35,39}.

Otros marcadores como las transaminasas, creatinina o la bilirrubina son indicadores utilizados para medir el nivel de daño o disfunción orgánica. Un indicador clave en el seguimiento de los pacientes con SIRS es la concentración de lactato en sangre, ya mencionado, porque sirve de indicador del estado de shock ⁴⁰. Además, estos marcadores se emplean para ver si el tratamiento está haciendo efecto o si se precisa de un ajuste o cambio. Acompañado a la monitorización de constantes, se miden los valores del hemograma, bioquímica, pruebas de imagen, diuresis, coagulación, gasometría, cultivo bacteriano (sospecha de infección), entre otras pruebas.

Diferentes sistemas de puntuación se emplean para evaluar el estado del paciente y su pronóstico a corto/medio plazo. Entre los más utilizados se encuentran el APACHE II (del inglés *Acute Physiology And Chronic Health Evaluation II*) o el SOFA (*Sequential Organ Failure Assessment*) ^{41,42}. El primero se calcula justo en el ingreso del paciente, y permite al personal sanitario conocer el riesgo de muerte en base a un conjunto de variables fisiológicas como la presión arterial media (PAM), la frecuencia cardiaca y respiratoria, y valores de concentración de sodio, potasio y de recuento leucocitario, entre otros ⁴¹. El SOFA es un sistema de puntuación que permite conocer la aparición y

evolución del fallo multiorgánico (MODS cuando SOFA ≥ 2) midiendo la actividad y estado de los aparatos/sistemas vitales como: el sistema nervioso (Glasgow Coma Score, GCS), respiratorio (presión parcial de oxígeno/fracción inspirada de oxígeno, terapia respiratoria) de coagulación (recuento plaquetario), cardiovascular (PAM, y el uso de vasopresores), renal (concentración de creatinina sanguínea, o volumen de micción diaria) y hepático (niveles de bilirrubina sanguínea) ⁴². Un aumento en los valores de estos sistemas de puntuación se relaciona con un mayor riesgo de mortalidad ⁴³. Por otro lado, los propios criterios del SIRS también se han propuesto como indicadores de pronóstico ⁶. Sin embargo, el sistema de puntuación SIRS se emplea en menor medida puesto que no se alcanza el mismo grado de sensibilidad que con el APACHE II o el SOFA ^{44,45}. Otro sistema de puntuación empleado en la clínica enfocado en medir la gravedad de las lesiones traumáticas es el ISS (*Injury Severity Score*), considerándose politraumatismo cuando al menos dos regiones del cuerpo son afectadas y el grado de lesión conjunta presenta un ISS ≥ 16 ⁴⁶.

1.2.3 Tratamiento y soporte

A pesar de los avances en el diagnóstico y tratamiento, la morbimortalidad continúa elevada, siendo la sepsis (SIRS con sospecha o confirmación de infección) la causa de mayor ingreso en la UCI y de muerte ¹⁴. El pronóstico de los pacientes con SIRS ha mejorado debido al avance en los tratamientos y en el cuidado ⁴⁷. Sin embargo, todavía no se dispone de una terapia adecuada para el control de la respuesta inflamatoria y los efectos colaterales de esta.

Tras el accidente, la estabilización (hemodinámica y respiratoria) es crucial para la supervivencia del paciente. El tratamiento de los pacientes con SIRS depende de la clínica y la evolución, pero es habitual el uso de vasopresores (vasoactivos como la noradrenalina o la dopamina) combinado con reanimación fluidica para revertir el estado de hipotensión (shock), antibioterapia empírica de amplio espectro o el soporte ventilatorio. Otras terapias empleadas son el reemplazo renal (hemodiálisis) o transfusión de concentrados plaquetarios o de hematíes ^{25,48}. El uso de corticoides o fármacos antiinflamatorios en estos pacientes no es adecuado y solo se administra en casos concretos de fallo suprarrenal ⁴⁹. El tratamiento con corticoides no ha demostrado evidencias claras de su beneficio bajo esta condición hiperinflamatoria por lo que su uso

en los casos SIRS en la UCI es reservado ⁵⁰. Siguiendo esta línea de intentar regular la respuesta exacerbada del sistema inmune, se han propuesto estrategias más específicas dirigidas contra moduladores de la respuesta inflamatoria como las citocinas ⁴⁸. Este tema se tratará más adelante.

1.3. Mecanismo biológico de respuesta y modulación inflamatoria

1.3.1 Señalización de alarma, activación y movilización celular

A pesar de la diversidad de origen del SIRS; la evolución y la escalada inflamatoria siguen un patrón común. Este proceso inflamatorio comienza con el reconocimiento por parte del sistema inmune de factores liberados por los tejidos afectados o la identificación de cuerpos extraños (Fig. 3). Los factores liberados por la lisis o muerte celular se conocen como DAMPs (*Damage associated molecular patterns*). Otros factores que también son desencadenantes de la respuesta inflamatoria son aquellos procedentes de patógenos o que son reconocidos como cuerpos extraños (PAMPs, *Pathogen associated molecular patterns*) como puede ser el lipopolisacárido (LPS) ⁵¹.

Tras la lesión inicial estos factores son reconocidos por célula inmunitarias tanto residentes en el tejido afectado como en circulación a través de receptores de membrana o PRRs (*pathogen-recognition receptors*). Los receptores de cuerpos extraños o de alarminas más importantes son los Toll-like receptors (TLRs), los NOD-like receptors (NLRs) y los receptores de AGE (*advanced glycosilated end products*). Los TLRs es la familia de receptores más estudiada por tener la capacidad de reconocer gran variedad de factores tanto PAMPs como DAMPs ^{51,52}. Los NLRs centran su actividad en el reconocimiento de moléculas de alarma y son potenciales activadores del inflamasoma (involucrado en la liberación de las citocinas inflamatorias IL-1 β e IL-18 y en la piroptosis) ⁵³. Los receptores de AGE conocidos como RAGE o AGER son proteínas similares a las inmunoglobulinas que se unen exclusivamente a los DAMPs (S100A8-9, HMGB1) ⁵⁴.

La unión de una molécula a un PRRs activa una cascada de señalización intracelular a través de las vías de NF-K β , AP-1, STAT o IRF3 ⁵⁵. Esta activación se traduce en la

producción y liberación de compuestos defensivos y citotóxicos (granzimas, perforinas), proteínas involucradas en la migración (adhesinas, integrinas), en la diferenciación celular, en la producción de factores inflamatorios (citocinas, quimiocinas) o en la secreción de moléculas (vesículas extracelulares) ^{55,56}. Más allá del tipo de estímulo y la célula inmunitaria en situación, se debe entender la respuesta celular como un conjunto (o balance) de señales inflamatorias que se presentan en el microambiente en un momento dado (Fig. 3).

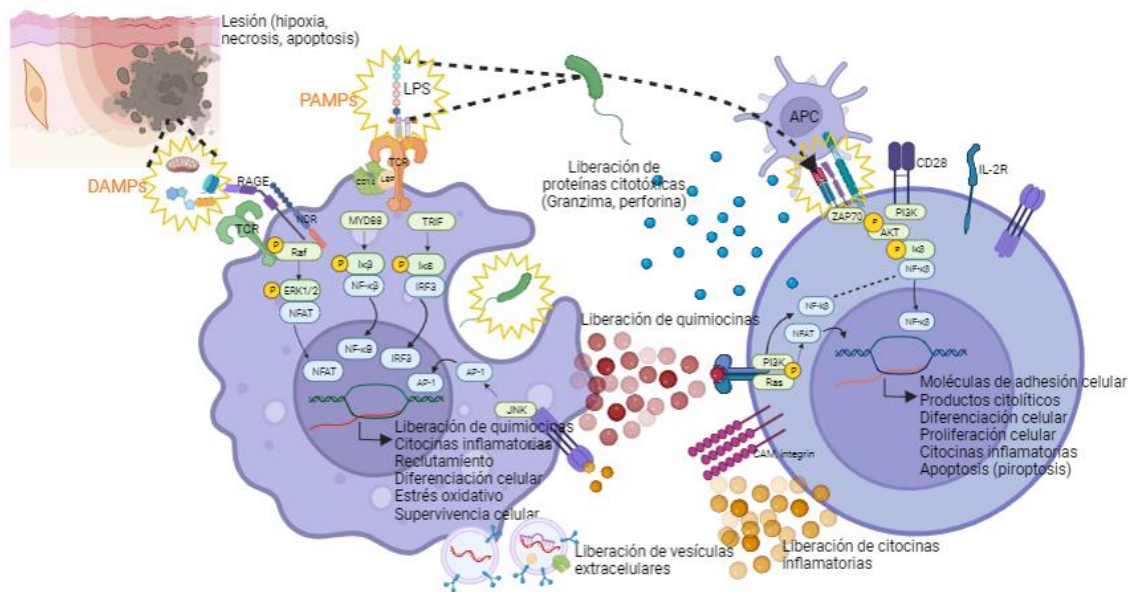


Figura 3. Mecanismos de señalización celular y escalado inflamatorio del SIRS. Estímulo originado por la liberación de componentes celulares (DAMPs) o por el reconocimiento de un cuerpos extraños (PAMPs) por células del sistema inmune. Vías de señalización intracelular (NF-κB, AP-1, IRF3) que resultan en la secreción de citocinas (también quimiocinas y factores de crecimiento), vesículas extracelulares, compuestos citotóxicos, proliferación y activación celular.

En condiciones inflamatorias las células inmunitarias son movilizadas de los nichos productores o del reservorio celular (ej. médula ósea) al torrente sanguíneo ^{57,58}. La señalización masiva no solo activa a las células inmunes, sino que también estimula a células de otros tejidos. En concreto, la inestabilidad y la activación inespecífica endotelial juegan un papel clave en la migración transendotelial leucocitaria hacia órganos afectados por la lesión/infección, pero también a órganos no afectados inicialmente. Este proceso migratorio se da tras el contacto célula inmune con células endoteliales activadas (expresión de VCAM), seguido del rodamiento o *rolling*, adhesión y anclaje celular, y terminando con extravasación leucocitaria (diapédesis) ⁵⁹ (Fig. 4). Durante el SIRS se produce una activación inespecífica del endotelio, incluso en tejidos

alejados del foco de infección o daño, debido principalmente a la liberación de citocinas a nivel sistémico ⁶⁰. Junto con esta activación, la liberación de vasodilatadores (óxido nítrico, histamina) aumentan la permeabilidad capilar provocando la salida de plasma y de células del torrente sanguíneo hacia el espacio intersticial (del inglés *vascular leakage*) de forma descontrolada ⁶¹.

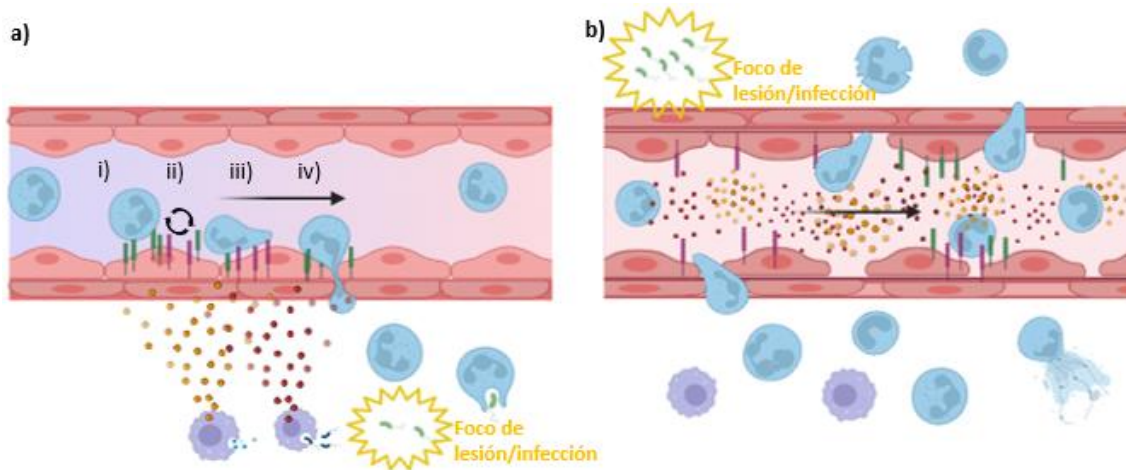


Figura 4. Migración transendotelial leucocitaria hacia el foco de infección o daño. a) Tras un traumatismo, herida o infección leve se produce una señalización y activación endotelial específica favoreciendo la migración controlada y dirigida (por gradiente) de células inmunes al tejido afectado. Las etapas de la migración transendotelial controlada son: i) contacto, ii) rodamiento, iii) adhesión y iv) extravasación leucocitaria. b) Durante el SIRS se produce una hiper-citocinemia que induce la activación inespecífica del endotelio, y aumenta la permeabilidad de los vasos sanguíneos. Esto provoca la liberación de células inmunes de manera descontrolada y no dirigida al foco de infección o daño. La flecha indica el sentido del flujo sanguíneo dentro del vaso sanguíneo.

La migración descontrolada inmune y la activación inflamatoria generalizada junto con la hipovolemia (por el estado de shock), la hipoperfusión tisular, la coagulación intravascular diseminada y el daño inicial, afectan a la homeostasis sistémica desencadenan finalmente el proceso de fracaso multiorgánico ⁶². Los mecanismos de respuesta inmunitaria que alteran la homeostasis tisular, que tienen efectos sobre el desarrollo del SIRS y que inducen daño colateral a nivel sistémico se comentan en los siguientes apartados.

1.3.2 Citocinas y comunicación intercelular

La movilización y activación de células del sistema inmune esta mediada por una compleja red de señalización a través de citocinas. Las citocinas son proteínas involucradas en la señalización y comunicación intercelular producidas mayormente por células inmunitarias, pero también por células del endotelio, epiteliales y del estroma

^{63,64}. Estas moléculas son liberadas al medio extracelular y son reconocidas por receptores específicos de células cercanas (señalización paracrina) o por receptores de la misma célula productora (señalización autocrina). La unión de este ligando a su receptor activa una cascada de señalización intracelular induciendo cambios en la actividad de la célula receptora (Fig. 3).

Dentro de las citocinas se conocen diferentes familias de proteínas que se clasifican según el origen y función. Los factores de crecimiento son citocinas capaces de inducir la proliferación y la diferenciación celular, además de inducir la regeneración de tejidos (o de células específicas) y en algunos casos promueven la movilización celular. Ejemplos de estos se encuentran los factores de estimulación de crecimiento de colonias granulomonocíticas (GM-CSF), granulocíticas (G-CSF) o monocíticas (M-CSF) ⁶⁵. Además, de haber moléculas inductoras de la proliferación celular, en condiciones fisiológicas existen otras citocinas que regulan la expansión e inducen la muerte celular o la apoptosis, como es el caso de la FasL o el TRAIL, encargadas de mantener un balance celular ⁶⁶.

Por otro lado, las quimiocinas son moléculas que inducen la movilización direccionada de células siguiendo un gradiente químico. Estas proteínas inducen cambios en la maquinaria de migración en la célula receptora (proteínas de adherencia, de anclaje como las integrinas, etc.) promoviendo su movilización o retención del tejido ⁶⁷. En condiciones inflamatorias, este mecanismo permite el reclutamiento de células inmunes hacia los focos de infección o de daño. Ejemplo de estas citocinas quimiotácticas son las CCL2, CCL4 o la CXCL8.

Respecto a otras citocinas involucradas en el control de la inflamación se encuentran la familia del interferón y de las interleucinas. Estas citocinas producidas mayormente por células del propio sistema inmunitario son clave para el control de la actividad proinflamatoria frente a posibles amenazas (patógenos), pero también para el control del propio estado inflamatorio (citocinas antiinflamatorias) ⁶⁸. Dentro de las citocinas de carácter proinflamatorio se encuentran: el interferón gamma (IFN γ), la interleucina 1 (IL-1 β), IL-2 o el factor de necrosis tumoral (TNF α). Entre las citocinas con capacidad de revertir la inflamación se destacan la IL-4 o IL-10 Sin embargo, existen citocinas (ej. IL-6)

cuyo carácter pro- o antiinflamatorio de una citocina está condicionado por el estado del tejido, el tipo celular o la presencia de otras citocinas (balance) ⁶⁹.

Por ello, el estudio de las citocinas permite monitorizar el estado inflamatorio y conocer cómo se regula respuesta inmune tras el inicio SIRS ⁷⁰. Además, numerosos estudios han planteado el estudio de estas como biomarcadores de enfermedad, e incluso se han propuesto como dianas terapéuticas ^{71,72}.

1.3.3. Poblaciones leucocitarias involucradas en SIRS

En la respuesta inflamatoria juegan un papel crucial tanto el sistema inmune innato como el adaptativo. Sin embargo, debido a la agudeza de la respuesta inflamatoria, las células inmunitarias innatas son más determinantes en la fisiopatología en las primeras horas del SIRS ⁷³. La rápida activación y respuesta de las células innatas favorece la defensa y eliminación rápida de posibles agentes patogénicos (infecciones, traumatismos con perforación abdominal, heridas, etc.).

En condiciones fisiológicas los granulocitos son la población leucocitaria mayoritaria en sangre, y tienden a aumentar en condiciones inflamatorias ⁷⁴. Estas células se producen en la médula ósea (granulopoyesis) a partir de una célula progenitora común donde maduran (promielocito, mielocito, metamielocito y neutrófilo bandedado) antes de salir al torrente sanguíneo (Fig. 5) ^{75,76}. Durante el proceso de maduración los neutrófilos, como población mayoritaria, sufren cambios en la expresión de marcadores de membrana con el aumento de CD11b, CD16 y CD33 y salen de la médula ósea ya maduros (núcleo segmentado) ⁷⁷. Los neutrófilos son uno de los primeros actores durante procesos inflamatorios debido a su rápida movilización y respuesta defensiva. Esta población juega un papel clave durante la inflamación con capacidad fagocítica, de desgranulación (liberación de enzimas proteolíticas), secreción de especies reactivas de oxígeno (del inglés *Reactive Oxygen Species* – ROS), citocinas inflamatorias y de NETosis (del inglés proceso formador de *Neutrophil Extracellular Traps* - NETs) ⁷⁸. Esta actividad originalmente de defensa puede también afectar a células cercanas, por lo que una producción descontrolada de estos compuestos tiene efectos deletéreos sobre los tejidos.

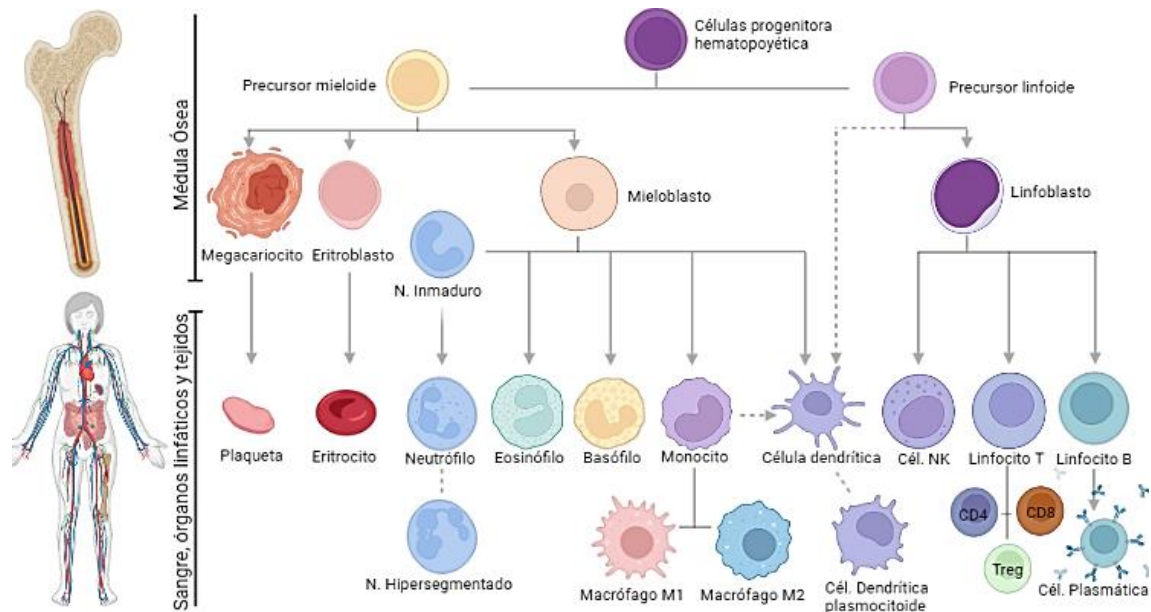


Figura 5. Linaje celular hematopoyético según su localización en la médula ósea o en tejidos periféricos
 Procedentes de una célula progenitora común en médula ósea, las células se diferencian a células mieloides o linfoides antes de migrar al torrente sanguíneo y órganos linfáticos.

Otra población granulocítica son los eosinófilos que actúan específicamente contra parásitos y patógenos no fagocitables (de gran tamaño). Junto con los basófilos, granulocitos menos abundantes de la sangre, desencadenan una reacción inflamatoria contra alérgenos. En este proceso el complejo proteico receptor de la inmunoglobulina E (FcεRI), presente en eosinófilos y basófilos, desencadena la desgranulación de citotóxicos y liberación de componentes inflamatorios, como la histamina ^{79,80}.

También de origen mielóide, los monocitos juegan un rol fundamental en el inicio de la escala de inflamación. Están implicados en la eliminación por fagocitosis de patógenos y cuerpos celulares (cuerpos apoptóticos). Son células clave en la identificación de agentes patogénicos y en la comunicación leucocitaria mediante liberación de múltiples moléculas señaladoras (citocinas) y la presentación de antígenos.

En circulación se distinguen tres subpoblaciones de monocitos siendo los clásicos (cMo) los más abundantes en circulación, los intermedios (iMo) y los no clásicos (ncMo) ^{81,82}. Esta clasificación comúnmente establecida por el patrón de expresión de los marcadores CD14 y CD16, también viene determinada por presentar diferentes perfiles transcriptómicos y una actividad fisiológica diferente ^{83,84}. Los cMo son la población más abundante de monocitos en circulación y se caracterizan por tener una mayor respuesta contra antígenos como el LPS bacteriano, alta capacidad de fagocitosis y activación de

linfocitos T^{82,85}. Los iMo tienen un perfil más inflamatorio con alta producción de citocinas y especies reactivas de oxígeno (ROS)^{82,86}. Su prevalencia en sangre es baja teniendo valores similares a los de ncMo. Los ncMo caracterizados por una expresión baja del CD14 (marcador convencional de los monocitos/macrófagos), se consideran los monocitos más diferenciados (maduros) por tener un perfil similar al de los macrófagos con expresión alta del CD16 y por patrullar los tejidos⁸⁷. Todos los monocitos se pueden diferenciar a macrófagos, aunque todavía se desconoce cuál puede ser la relación para diferenciarse a macrófago hacia un perfil M1 (proinflamatorio) o M2 (antinflamatorio)⁸⁸. Se ha visto que los monocitos se diferencian hacia un perfil inflamatorio u otro en función de las condiciones del microambiente^{89,90}. Conocer cómo se distribuyen y se diferencian las poblaciones leucocitarias es crucial para entender su actividad en los tejidos en condiciones patológicas y poder desarrollar nuevas estrategias terapéuticas.

Las células dendríticas (DCs) son una población heterogénea de origen mayoritariamente mieloide que juega un papel fundamental en la transición y activación de la respuesta inmunitaria adaptativa⁹¹. Las DCs tienen alta capacidad para presentar antígenos mediante el complejo mayor de histocompatibilidad de tipo II (como el HLA-DR). Salen de la médula ósea en busca de cuerpos extraños, fagocitan, procesan el antígeno y los presentan ante linfocitos T situados en los órganos inmunológicos secundarios (ej. ganglios linfáticos)⁹².

Se han descrito múltiples subdivisiones de DCs según los perfiles transcriptómico e inmunofenotípico^{93,94}. Las DCs mieloides (mDCs) es la población de DCs más representativa con dos subconjuntos: en cDC1 (CD141^{pos} o DC1) y cDC2 (CD1c^{pos})⁹⁵. La diferenciación a un tipo u otro viene determinado por una mayor expresión en los precursores (CD100^{pos} CD34^{dim}) de ciertos factores de transcripción (IRF8, BATF3, ID2) y (IRF4, KLF4)⁹⁶. Las DC1 se caracterizan por la expresión de TLR3 y una mayor capacidad de presentación de células muertas (presentación cruzada) mediante Clec9A⁹⁶. La población cDC2 se encargan de la activación de los linfocitos T a través de la presentación de antígenos, con alta producción de citocinas (TNF α , IL-6, IL-8) y se pueden dividir en función de la expresión del marcador CD5. Las mDCs CD5^{pos} (también identificado como DC2 o CD1c^{pos}_A) presentan mayor capacidad migratoria, producción de IL-10 pero son menos abundantes que las CD5^{neg} (DC3 o CD1c^{pos}_B)^{95,97}. Los CD5^{neg}

potencian la producción de IFN γ a partir de la activación de las células T, mientras que los CD5^{pos} promueven la producción de IL-10⁹⁷. DC4 es otra subpoblación descrita en la bibliografía caracterizada por la expresión de CD16 y la falta de CD141 y CD1c y que comparte un perfil transcriptómico similar a los ncMo SLAN^{pos}⁹⁵.

Otra población de células dendríticas son las DC5 (DCs Axl^{pos} o 'AS' DC) que corresponden a aquellas que tienen alta expresión de la lectina SIGLEC6 y el receptor tirosina quinasa Axl consideradas como precursoras de las DCs⁹⁴. Por otro lado, se encuentran las DCs de origen linfoide (plasmocitoides – pDCs o DC6) que tienen un perfil transcriptómico diferente (no expresión de SIGLEC6 ni Axl), pero si presentan una alta producción de IFN γ ⁹⁵. Además, se ha descrito que en condiciones inflamatorias se pueden encontrar las mo-DC o las *Inflammatory* DCs, con un perfil intermedio entre monocitos y DCs⁹³. Siendo la población de DCs clave para la activación de los linfocitos T, la distribución de estas poblaciones durante el SIRS puede ser determinante en la evolución de la inflamación y del proceso infeccioso.

Otra población muy interesante para estudiar son las células supresoras derivadas mieloides (MDSCs). Las MDSCs son un grupo heterogéneo de células mieloides inmaduras cuyos niveles aumentan en circulación en diferentes patologías inflamatorias⁹⁸. Estas células juegan un papel clave en la regulación de la actividad inflamatoria, presentando una alta capacidad inmunosupresora sobre la población de linfocitos T⁹⁹.

Se entiende la respuesta inmune como un proceso con fases en las que primeramente actúa el sistema inmune innato de forma rápida e inespecífica, seguida de la adaptativa con un actividad más dirigida. Entre la clásica división de las dos respuestas (innata y adaptativa) se encuentran poblaciones linfocitarias que presentan una actividad más típica de la innata. Entre estas poblaciones se destacan los linfocitos con TCR $\gamma\delta$ que no requieren de presentación mediante el complejo mayor de histocompatibilidad y tienen capacidad fagocítica, aunque si tienen cierto reajuste de proteínas de reconocimiento de antígenos y presentan memoria¹⁰⁰. Se encuentran en las mucosas y juegan un papel clave en las infecciones con una respuesta aguda mediante la liberación de citocinas como IFN γ y TNF α ^{100,101}. En sepsis se ha visto que la reducción de esta población está relacionada con un mayor riesgo de mortalidad¹⁰².

Las células *natural killer* (NK) y las células T NK (NKT) de origen linfoide, también tienen una respuesta directa ante células infectadas, patógenos o células cancerígenas. Las células NK se caracterizan por tener una producción alta de IFN γ de forma rápida y una respuesta contra células infectadas mediante la liberación de productos citolíticos (perforinas, granzimas) ¹⁰³. Según la expresión de los marcadores CD16 y CD56 se pueden distinguir varios subtipos con diferente perfil de maduración, de producción de perforinas y granzimas, y de migración específica ¹⁰⁴.

El sistema inmune adaptativo es crucial para la evolución y resolución del proceso inflamatorio e infeccioso. Este actúa como centro coordinador de la actividad celular dirigida tras la presentación y reconocimiento del antígeno. Los linfocitos T, población mayoritaria de células mononucleadas en sangre periférica, tienen la capacidad de controlar la respuesta del sistema inmune con alta producción de citocinas y actividad citotóxica. Según el estado de activación celular las linfocitos pueden presentar un perfil más o menos proinflamatorio. Las subpoblaciones mayoritarias de linfocitos T se dan según la expresión de CD4 (T *helper* o colaboradores y reguladores) y CD8 (citotóxicos).

Los linfocitos B son las células encargadas de la respuesta humoral tras el contacto con un antígeno. Los linfocitos B maduran a células plasmáticas en el bazo y se especializan frente a un determinado antígeno. A través de un complejo mecanismo de especialización (recombinación somática) y maduración, las células plasmáticas liberan gran cantidad de anticuerpos al torrente sanguíneo ¹⁰⁵. Los anticuerpos específicos al reconocer al antígeno facilitarán la actividad del complemento, la opsonización, la fagocitosis, y la respuesta citotóxica contra el antígeno o microorganismo. Tras un primer contacto con el microorganismo se mantienen células de memoria que permitirán una respuesta rápida y superior en un futuro contacto.

Otras células que se pueden identificar en circulación y que pueden participar en la regulación del SIRS son las células progenitoras hematopoyéticas (HPC), células progenitoras endoteliales o las células mesenquimales, aunque la concentración de estas poblaciones en circulación es baja y está poco descrita ^{106–109}. Estudios previos aseguran el aumento en el número de células progenitoras y células mesenquimales circulantes justo después de un proceso inflamatorio, como trauma, quemadura, lesión de órganos o en sangre periférica movilizada ^{108,110–112}. A pesar de los resultados, todavía

existe una falta de conocimiento sobre la presencia circulatoria de las células mesenquimales debido a la escasez y variabilidad de los estudios: técnica seguida para el procesamiento de la muestra, factores intrínsecos de los pacientes o la patología ^{107,113-115}.

1.4. Vesículas extracelulares como mediadores de inflamación

Un mecanismo alternativo para la comunicación intercelular presente en la mayoría de las células del organismo es a través de vesículas extracelulares (VEs). Estas nanopartículas esféricas son secretadas por las células eucariotas, son compartimentos de membrana lipídica que transportan moléculas potencialmente reguladoras ancladas en la superficie o en su interior como RNA mensajeros, microRNAs y proteínas ¹¹⁶. El proceso de formación de estas vesículas se da principalmente por procesos de invaginación de la membrana celular (microvesículas) o a partir de endosomas tardíos (exosomas), siendo liberados mediante exocitosis. Otro mecanismo implicado en la formación de vesículas es el proceso de apoptosis, que consiste en la formación de cuerpos celulares (apoptosomas o cuerpos apoptóticos) durante el proceso de muerte programada. Según el mecanismo de formación, las VEs presentan tamaños diferentes siendo los apoptosomas de mayor tamaño (1.000-4.000 nm), seguido por las microvesículas (200-1000 nm) y los exosomas (30-200 nm), aunque no existe un rango del todo definido (Fig. 6) ^{117,118}. Hasta hace unos años se pensaba que estas partículas eran portadores de desechos celulares. Sin embargo, se ha visto que tienen una alta implicación en el control de la homeostasis y la regulación del microambiente ^{119,120}.

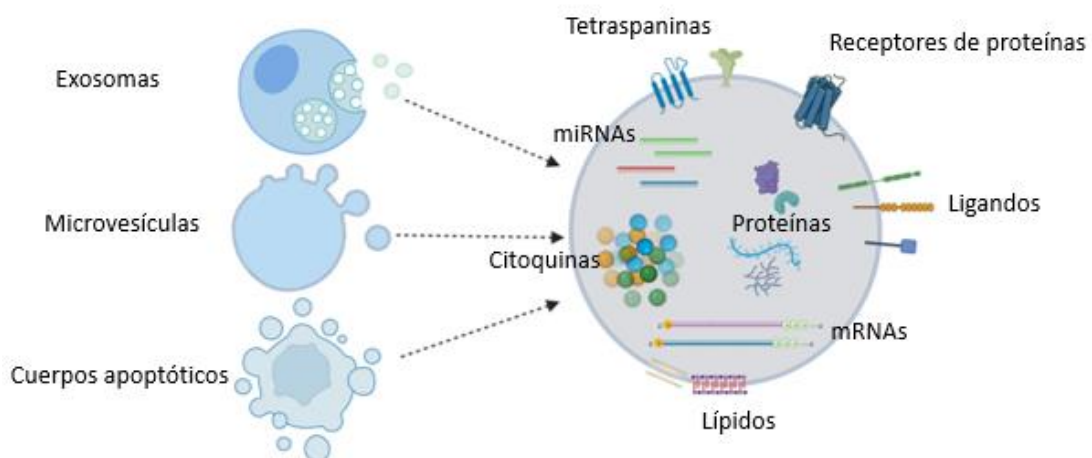


Figura 6. Tipos de vesículas extracelulares según su biogénesis y contenido de membrana e interno de estas vesículas.

Estas partículas son liberadas pudiendo diseminarse rápidamente y ser captadas tanto por células próximas como de tejidos remotos⁵⁶. El estado de la célula productora de las VEs (estrés, hipoxia, activación) es determinante en el contenido y en la regulación que ejercerán sobre la célula receptora¹²¹. Siguiendo esta idea, se ha propuesto el estudio de las VEs y de su contenido (ej. microRNAs) como biomarcadores de diagnóstico en enfermedades como el cáncer o patologías de base inflamatoria^{122,123}.

Entre los componentes reguladores que se transportan se encuentran los microRNAs (miRNAs). Los miRNAs son secuencias cortas de nucleótidos (19-24 nucleótidos) de cadena simple no codificantes que reconocen secuencias de RNA específicas¹²⁴. Estos factores regulan la expresión génica a través de su complementariedad de bases con la secuencia del RNA mensajero (mRNA). La unión completa o parcial del miRNA impide la traducción del mRNA (bloqueo del acople de la maquinaria ribosómica) y puede inducir su degradación. Son reguladores clave a nivel postranscriptómico pudiendo bloquear la expresión de gran variedad de proteínas¹²⁵. Es por ello importante conocer que la transferencia de miRNAs mediante la liberación de VEs puede ser un potencial mecanismo de la regulación inflamatoria¹²⁶.

1.5. Nuevas dianas terapéuticas y tratamientos para el SIRS

1.5.1 Nuevas propuestas de terapia del SIRS

Ante la necesidad de tener un tratamiento frente a la respuesta descontrolada del SIRS, se han planteado diferentes estrategias que controlen cada una de las etapas de la escalada inflamatoria, con el objetivo de reducir la inflamación exacerbada del sistema inmune y con ello disminuir los efectos colaterales de esta sobreactivación¹²⁷. Uno de los mecanismos propuestos ha sido el bloqueo de las moléculas inductoras de la respuesta inflamatoria como las endotoxinas circulantes (LPS) o los DAMPs con inhibidores específicos, así como el bloqueo de los receptores (ej. TLR4) de estas moléculas¹²⁸⁻¹³⁰. Estas estrategias pretenden reducir la respuesta descontrolada inmunitaria evitando la activación de las vías de NF- κ B y AP-1¹²⁷. También, se ha probado el uso de diferentes antagonistas para reducir la escalada de la inflamación sistémica, actuando sobre ciertas citocinas como la IL-1 o el MIF^{131,132}.

Sin embargo, los resultados obtenidos en estos ensayos clínicos no han demostrado grandes mejoras en el estado inflamatorio, ni en la calidad de vida ni en la mortalidad de los pacientes tras el inicio del SIRS ^{131,133}. Como se ha comentado con anterioridad, la respuesta inflamatoria del SIRS es multifactorial y compleja, en la que están involucrados gran cantidad de factores (patógenos, endotelio, coagulación). Por lo que, una adecuada terapia para pacientes con SIRS podría ser una que actuase sobre diferentes dianas. También debería provocar un ajuste inflamatorio, proteger frente al daño orgánico y promover la recuperación rápida de la homeostasis tejidos afectados ^{133,134}. Siguiendo esta idea, se ha propuesto el uso de la terapia con células estromales mesenquimales (MSCs) en condiciones SIRS ^{131,135}.

1.5.2 Células mesenquimales estromales y su potencial terapéutico

Las MSCs son células multipotentes no hematopoyéticas que se encuentran en la mayoría de los tejidos desempeñando un papel de regulación del microambiente y de mantenimiento de la homeostasis ¹³⁶. Entre sus principales características destacan su capacidad inmunorreguladora y su potencial regenerativo en condiciones inflamatorias y de estrés ¹³⁷. Las MSCs migran a los tejidos dañados respondiendo a factores de señalización secretados como los DAMPs y las quimiocinas ¹³⁸⁻¹⁴⁰. Tanto las MSCs residentes en el tejido como las movilizadas (por ejemplo, al pulmón) responden a las condiciones inflamatorias promoviendo un estado antiinflamatorio (Fig. 7) ^{141,142}. Las MSCs pueden bloquear o reducir la activación leucocitaria a través de la secreción de citocinas antiinflamatorias (IL-10, IDO, PGE-2) ¹⁴³. Las MSCs también regulan la actividad inmune a través del contacto directo con proteínas de membrana (CD54, PDL-1) ¹⁴⁴. Otros mecanismos reguladores de las MSCs descritos son la liberación de VEs, la transferencia de mitocondrias y a través del proceso de eferocitosis (fagocitosis de las MSCs) ^{145,146}.

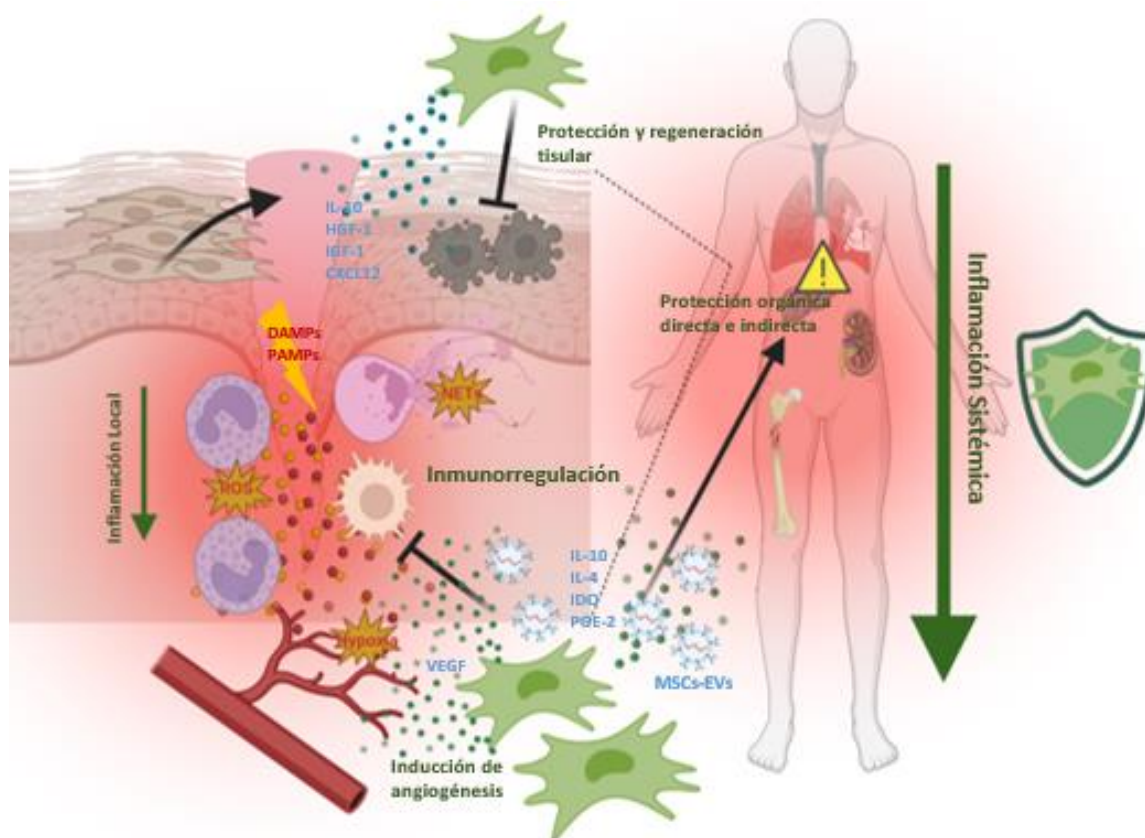
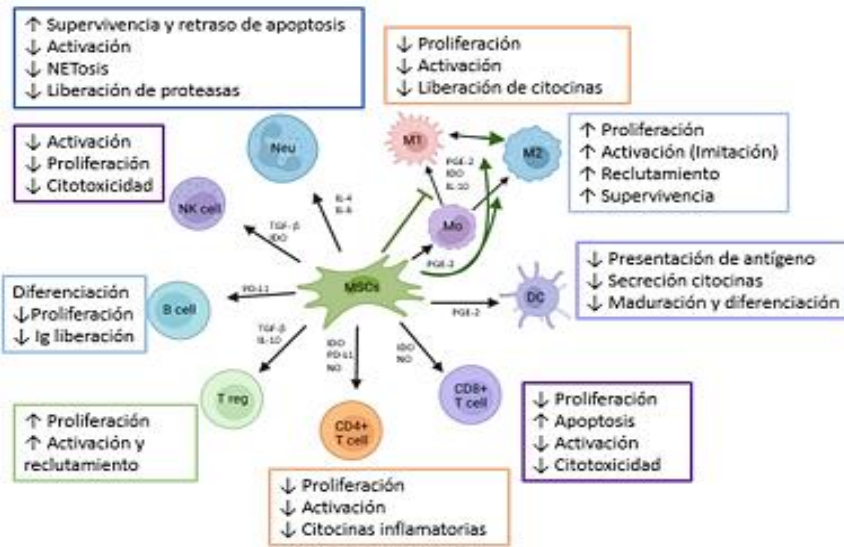


Figura 7. Representación de la actividad antiinflamatoria y regenerativa de la terapia con células estromales mesenquimales (MSCs) en el contexto del SIRS. La administración de MSCs tiene efectos locales y a nivel sistémico debido a su capacidad migratoria hacia tejidos dañados y la secreción de moléculas reguladoras (citocinas, vesículas extracelulares).

Durante el SIRS, las MSCs reducen los efectos colaterales de la sobreactivación del sistema inmune reduciendo la escalada de la tormenta de citoquinas y modulando la actividad de las células inmunitarias (Fig. 8 I) ¹³⁵. Las MSCs actúan no sólo por sus factores paracrinos, sino también por el efecto sinérgico de otras poblaciones inmunitarias reorientadas. Ejemplo de esta actividad reguladora es la que se da sobre los macrófagos. Las MSCs direccionan la diferenciación y maduración de los monocitos hacia macrófagos tipo M2 (antiinflamatorio) mediante la expresión de factores antiinflamatorios como el PGE-2 ¹⁴⁷. Se ha descrito que las MSCs pueden inducir también la transformación de los M1 (proinflamatorio) hacia el perfil M2 ¹⁴⁸. Además, se ha demostrado que la fagocitosis de las MSCs por parte de los macrófagos es otro mecanismo de inducción del fenotipo M2 ^{149,150}. Mediante estos mecanismos, las MSCs pueden controlar la respuesta de los macrófagos, educándolos para que imiten su actividad antiinflamatoria ^{147,151}.

I)



II)

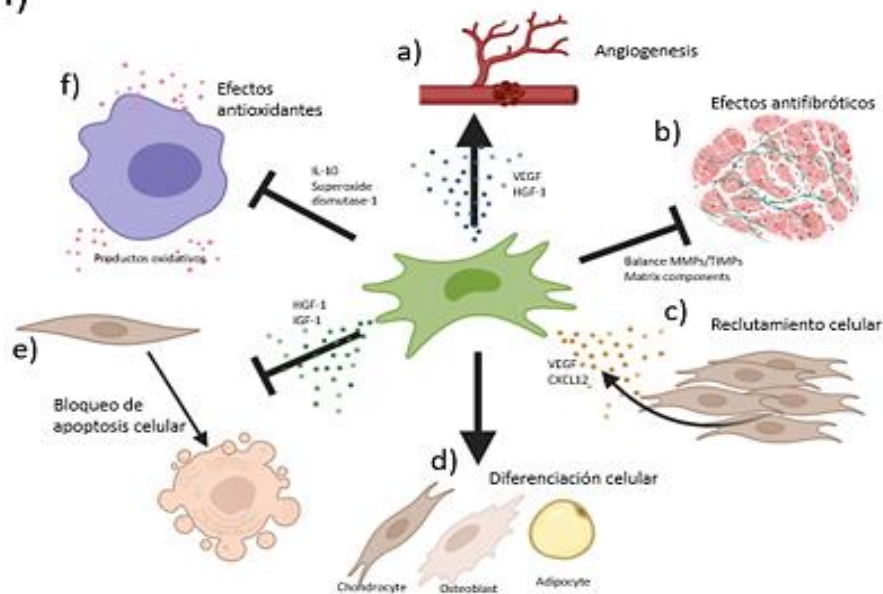


Figura 8. Potencial inmunorregulador, de protección y regulador de las MSCs.

I) Las MSCs en condiciones inflamatorias promueven un estado antiinflamatorio a través de la regulación de la actividad de células del sistema inmune como los neutrófilos, monocitos o los linfocitos T. Con la liberación de citoquinas como TGF-β, IL-10 o IDO, las MSCs reducen la capacidad citotóxica o liberación de citocinas inflamatorias durante el SIRS. II) Las MSCs desempeñan un papel clave en la protección de los tejidos en condiciones de estrés (ej. hipoxia, inflamación) promoviendo la angiogénesis, reduciendo la necrosis y favoreciendo una adecuada regeneración del tejido afectado.

Las MSCs, además, proporcionan protección tisular promoviendo la supervivencia de células afectadas (por la lesión, el estrés) (Fig. 8 II). Las MSCs pueden responder ante la hipoxia generada (por la hipoperfusión tisular y el DIC) durante el SIRS liberando factores proangiogénicos (VEGF, HIF-1), los cuales favorecen la formación de nuevos vasos

sanguíneos y la oxigenación tisular ¹⁵². Las MSC tienden a proteger la integridad endotelial ante especies reactivas de oxígeno (ROS), reduciendo así la salida masiva de leucocitos hacia los tejidos ¹⁵³. Además, las MSCs juegan un papel clave en la regeneración de los tejidos dañados favoreciendo una adecuada reorganización de la matriz extracelular, reduciendo el proceso de fibrosis y secretando factores de crecimiento celular ^{154,155}.

Basándose en sus propiedades, la terapia con MSCs ha demostrado su potencial en la regeneración de tejidos y el control de la inflamación en multitud de ensayos preclínicos y clínicos en enfermedades como la enfermedad de injerto contra huésped (EICH), la diabetes, la enfermedad de Crohn y otras patologías de base inflamatoria ^{156,157}. Además de las propiedades inmunorreguladoras y regenerativas a nivel sistémico, la posibilidad de expansión en cultivo y su baja inmunogenicidad (tratamiento alogénico) hacen de las MSCs una terapia prometedora para los pacientes con SIRS ¹³⁵.

2. HIPÓTESIS

En los pacientes que desarrollan SIRS al ingresar en la UCI existe la necesidad clínica de predecir qué pacientes evolucionarán favorablemente y cuáles desgraciadamente morirán o quedarán con secuelas graves. Teniendo en cuenta que en la fisiopatología del SIRS intervienen múltiples actores (células del sistema inmune innato, células estromales mesenquimales, citocinas, quimiocinas, vesículas extracelulares, etc.), se podría hipotetizar que una evaluación multiparamétrica y dinámica de la mayoría de estos parámetros podría ser útil para arrojar algo de luz en la búsqueda de tales predictores.

Y lo que es más importante, dado que la mayoría de los tratamientos actuales no se dirigen a estos factores fisiopatológicos del SIRS y no están exentos de toxicidad adicional, existe la necesidad médica de explorar el papel potencial de nuevos enfoques terapéuticos. Se plantea el tratamiento con células estromales mesenquimales alogénicas sanas podrían ser una estrategia atractiva para reducir los efectos colaterales de la respuesta inflamatoria del SIRS debido principalmente al potente efecto inmunosupresor y antiinflamatorio de estas células.

3. OBJETIVOS

Objetivo general

Analizar de forma multiparamétrica la respuesta SIRS de distinto origen y a diferentes tiempos, en pacientes de la unidad de cuidados intensivos con el fin de encontrar nuevos marcadores de pronóstico, y evaluar el potencial inmunomodulador de las células estromales mesenquimales sobre la maduración de los macrófagos.

Objetivo 1

Caracterizar y comparar la respuesta inflamatoria según su origen a través del estudio de múltiples poblaciones celulares circulantes y secreción de citocinas.

Objetivo 2

Identificar potenciales marcadores de sangre periférica para conocer el pronóstico de pacientes con SIRS.

Objetivo 3

Cuantificar y caracterizar las vesículas extracelulares plasmáticas de los pacientes de estudio y analizar su contenido en microRNAs.

Objetivo 4

Evaluar el potencial inmunomodulador de las células estromales mesenquimales sobre la población de macrófagos en el contexto del SIRS.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Pacientes y muestras

Previo a la inclusión de los pacientes en el estudio, los pacientes o sus familiares en caso de incapacidad del sujeto, firmaron el consentimiento informado aprobado por el Comité de Ética del Hospital Universitario de Salamanca (código de referencia 201912400) (Fig. Suple. 1). El estudio se desarrolló siguiendo los principios éticos de la Declaración de Helsinki. A cada paciente incluido se le asignó un código de identificación que permitiera la trazabilidad de las muestras y asegurara un total anonimato. Los criterios de inclusión/exclusión utilizados en el estudio fueron los siguientes: edad entre 18-80 años, ausencia de infección crónica activa de origen vírico (virus de la inmunodeficiencia humana, SARS-CoV-2, ...), y ausencia de tratamiento inmunosupresor crónico. Los pacientes elegibles en el estudio debían presentar 2 o más criterios SIRS en el momento de inclusión (Tabla Suple. 1).

Para este trabajo se incluyeron muestras de 50 pacientes SIRS todos ellos ingresados en la unidad de cuidados intensivos (UCI). La mitad de ellos derivados de un politraumatismo (ISS, *Injury Severity Score* ≥ 16) y los otros 25 pacientes SIRS de otro origen (No Politrauma, ej. infecciones). De todos los pacientes se obtuvieron muestras de sangre periférica en tres tiempos, a las 0, 24 y 72 horas desde el inicio del SIRS. El esquema general seguido en este trabajo se representa en la Fig. 9.

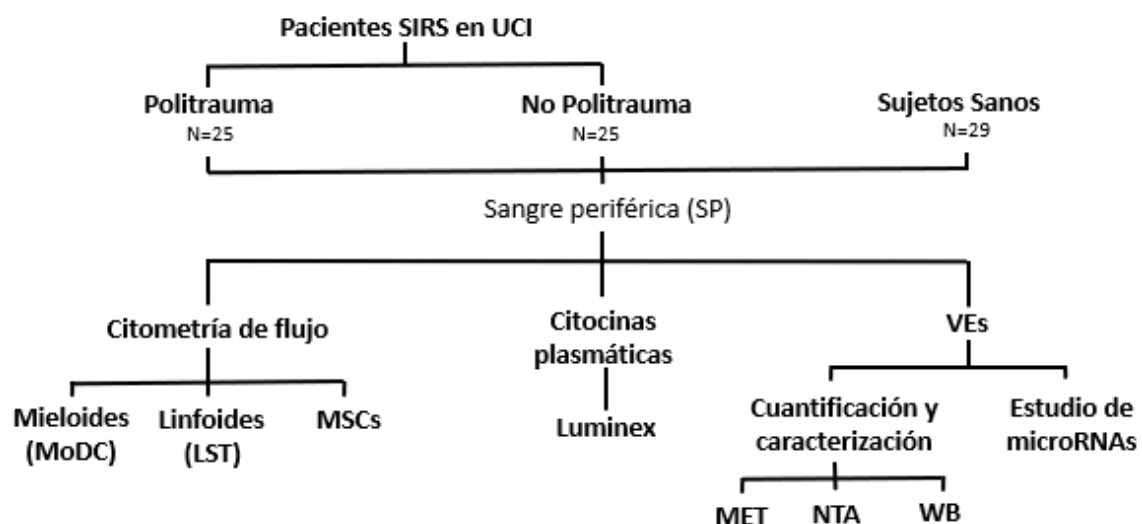


Figura 9. Esquema principal seguido para la obtención y análisis de las muestras de estudio de sangre periférica.

Las variables empleadas para el cálculo de los sistemas de puntuación de ISS, APACHE II (*Acute Physiology and Chronic Health disease Classification System II*) y SOFA (*Sequential Organ Failure Assessment*) se recogen en las Tablas Suplementarias 2, 3 y 4, respectivamente. Los datos clínicos y biológicos (hemograma, bioquímica, coagulación, tratamientos, etc.) se recopilaron accediendo al repositorio de datos clínicos electrónicos ICCA (IntelliSpace Cuidados Críticos y Anestesia), Modulab y Jimena v.4. Pasado un mes desde el alta hospitalaria se contactó con los pacientes incluidos en el estudio para conocer el estado y la calidad de vida mediante los cuestionarios (Tablas Suple. 5 y 6) para el cálculo del índice Katz y el sistema de puntuación EUROQOL-5D (EQ5D). En los apartados de Resultados y Anexos se recoge información adicional sobre las características de los pacientes incluidos (Tabla Suple. 7).

Como controles se obtuvo sangre periférica de donantes sanos. Para los estudios de diferenciación de macrófagos se utilizaron concentrados de leucoaféresis (*Buffy Coat*) procedentes Centro de Hemoterapia y Hemodonación de Castilla y León. Para la obtención y expansión de células estromales mesenquimales (MSCs) se extrajeron muestras de médula ósea (MO) igualmente de donantes sanos.

4.2 Procesado de las muestras sangre periférica

Inicialmente, se separó el plasma de la fracción celular mediante centrifugación (800 g durante 10 min a temperatura ambiente (T_{amb})). El plasma se centrifugó en dos ocasiones a 3000 g durante 20 min, con el fin de eliminar el *debris* (restos celulares, plaquetas, u otras moléculas de gran tamaño) y se recogió en todo momento el sobrenadante. Finalmente, se almacenó a -80°C hasta su posterior utilización (Fig. 10).

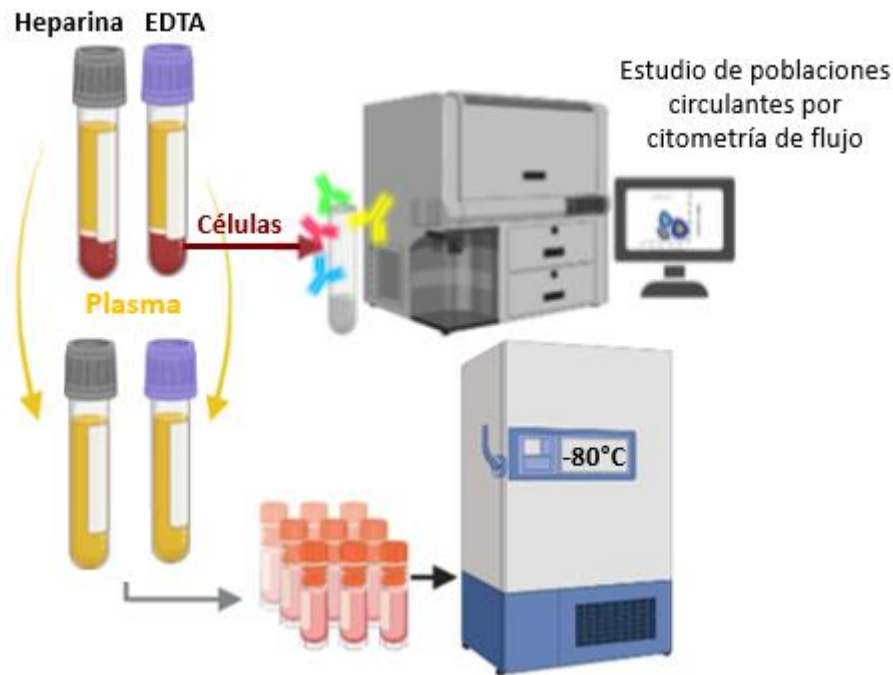


Figura 10. Esquema de trabajo seguido para el procesamiento de las muestras de sangre periférica en tubos de heparina (gris) y EDTA (morado) de pacientes con SIRS y los sujetos sanos.

4.2.1 Poblaciones leucocitarias circulantes

Para el estudio de las poblaciones leucocitarias circulantes mediante citometría de flujo (CMF) se siguió el protocolo de lisis-marcaje-fijación de los leucocitos recomendado por EuroFlow Consortium¹⁵⁸. A partir de $20\text{-}30 \times 10^6$ células, se lisaron los eritrocitos con Bulklysis (Cytognos S.L ref. CYT-BL) durante 15 min a T_{amb} en agitación, se centrifugaron los tubos a 800 g 10 min. Seguidamente, se retiró el sobrenadante y los precipitados celulares se resuspendieron en PBS (*Phosphate-Buffered Saline*, Gibco ref. 14190-094) para su lavado y posterior marcaje. Las células se dividieron en dos tubos para estudiar por separado las subpoblaciones mieloides y las subpoblaciones linfoides. Para el primero se marcó con los anticuerpos del panel mieloides MoDC de 14 colores¹⁵⁹ y 50 μl de Brilliant Stain Buffer (BD ref. 563794). Para el estudio de subpoblaciones linfocitarias las células se incubaron con los 12 anticuerpos liofilizados del panel LST (*OneFlow Lymphoid Screening Tube*, BD ref. 658619)¹⁶⁰. Las especificaciones de los anticuerpos conjugados y los fluorocromos empleados para cada panel se detallan en la Tabla 1.

Tabla 1. Combinación de los anticuerpos monoclonales conjugados con fluorocromos dirigidos frente a los antígenos cluster of differentiation (CD) específicos para el tubo MoDC y LST.

Tubo MoDC		Tubo LST	
Anticuerpo	Fluorocromo	Anticuerpo	Fluorocromo
Slan	PE	CD8	FITC
FcεRI	PE	Cadena λ	FITC
CD36	PerCp-Cy5.5	CD56	PE
CD34	PE-CF594	Cadena κ	PE
CD33	PE-Cy7	CD5	PerCp-Cy5.5
CD303	APC	TCRγδ	PE-Cy7
CD300e (IREM)	APC	CD19	PE-Cy7
CD45	AF700	CD3	APC
CD14	APC-H7	CD38	APC-H7
CD141	BV421	CD4	PB
CD5	BV510	CD20	PB
CD192	BV605	CD45	PO
CD62L	BV650		
HLA-DR	BV711		
CD16	BV786		

Tras 30 min de incubación en oscuridad y a T_{amb} , las células se fijaron 10 min con 2 ml de FACSLysing solution (BD ref. 349202). El sobrenadante se retiró tras centrifugar a 560 g durante 5 min y se repitió el lavado con PBS. Ambos tubos se resuspendieron con un volumen de PBS determinado para su adquisición en el citómetro.

Del tubo de MoDC se adquirieron aproximadamente $5-10 \times 10^6$ eventos en el citómetro FACSymphony (BD) empleando el software FACSDiva (BD). En el tubo de LST se adquirieron $3-5 \times 10^6$ de eventos en el citómetro FACSLytic (BD) con el software FACSuite (BD).

Los resultados exportados en formato (.fcs) fueron analizados en el programa Infinicyt 2.0 (Cytognos). Pevio a la identificación de las poblaciones leucocitarias, se eliminaron

del análisis los dobletes usando el diagrama FSC-A/FSC-H y el *debris* con la fracción CD36 positivo/CD45 negativo para el tubo MoDC, y con la fracción CD45 negativa para el tubo LST.

Finalizada la identificación de todas las poblaciones siguiendo la guía de expresión de marcadores estudiados (Tabla Suple. X), se determinó el número absoluto de células/mililitro de la muestra a partir del valor del hemograma (leucocitos/ μl). Los valores de las poblaciones de eosinófilos, basófilos, neutrófilos, monocitos (Mo), células dendríticas (DCs) y células progenitoras hematopoyéticas (HPC) se obtuvieron del análisis del tubo MoDC. Los valores de las poblaciones de linfocitos T, linfocitos B y células NK se obtuvieron del tubo de LST.

Además, se estudió la mediana de intensidad de fluorescencia (MFI) para marcadores que pueden servir para conocer la actividad migratoria, la capacidad de presentar antígenos o el grado de maduración (CD62L y HLA-DR) de las principales poblaciones leucocitarias a partir del tubo MoDC.

4.2.2 Células mesenquimales circulantes

El procedimiento para la identificación de células con perfil mesenquimal es similar al comentado en el apartado de las poblaciones leucocitarias. En este caso, las células (aproximadamente $20\text{-}30 \times 10^6$) fueron lisadas con solución BulkLysis. Tras la centrifugación a 800 g durante 10 min, el precipitado celular se resuspendió con 50 ml de PBS se lavaron dos veces y se cuantificaron de nuevo. Tras la centrifugación a 560 g por 5 min, las células se resuspendieron en PBS para el marcaje con 1 μl del marcador de viabilidad celular Fixable Viability Stain 700 - AF700 (BD ref. 9139527) durante 15 min en oscuridad a T_{amb} . Tras la incubación se añadió Running Buffer (Miltenyi Biotec ref. 130-091-221) para lavar a 560 g durante 5 min y se marcaron las células con los anticuerpos conjugados con fluorocromos especificados en la Tabla 2, durante 30 min en oscuridad y 50 μl de Brilliant Stain Buffer. Se retiró el excedente de anticuerpos añadiendo Running Buffer y se lavaron en las condiciones mencionadas.

Tabla 2. Panel de anticuerpos empleados para la identificación de células mesenquimales circulantes.

Marcador	Fluorocromo
CD34	FITC
MSCA1/TNAP	PE
CD146	PE-Cy7
CD271	APC
Viabilidad	APC-R700
CD73	APC-H7
CD45	PerCP
CD105	BV421
HLA-DR	BV510
CD10	BV605
CD13	BV711
CD90	BV786

Aproximadamente 10×10^6 células fueron adquiridas en el FACSymphony (BD) bajo una compensación específica para este panel y los controles de calidad diarios del citómetro. El archivo de citometría se analizó empleando el mismo software de análisis Infinicyt v.2.0.

La estrategia de análisis consistió en eliminar las células muertas por presentar positividad ante el marcaje con el Viability Stain 700, y también los dobletes con el diagrama FSC-A/FSC-H. Seguido, se identificó la población de células progenitoras hematopoyéticas circulantes ($CD34^{pos}$, $CD45^{dim}$), que sirvió de referencia para los siguientes cortes. Después se seleccionó la población que cumple los criterios de perfil mesenquimal propuesto por la ISCT ($CD34^{neg}$, $CD45^{neg}$, $CD73^{pos}$, $CD90^{pos}$, $CD105^{pos}$, $CD13^{pos}$ y $HLA-DR^{neg}$). El resto de los marcadores de membrana estudiados descritos en la bibliografía ($CD271$, $MSCA-1$, $CD10$ y $CD146$) se emplearon para conocer cómo era su expresión en los eventos finalmente identificados. Se consideró población celular a una agrupación o *cluster* de células con un mínimo de 10 células que cumpliesen todos los criterios mencionados por cada 10×10^6 eventos adquiridos. La cuantificación de células

hematopoyéticas y aquellas células con perfil mesenquimal fue determinada utilizando los valores del hemograma de cada muestra y tiempo.

4.3 Estudio de la concentración de citocinas en plasma sanguíneo mediante Luminex

Para conocer cómo es la evolución de la inflamación a nivel sistémico en los pacientes con SIRS se estudió la concentración de múltiples factores (citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento). La concentración de 21 factores solubles (Tabla 3) en las muestras obtenidas de todos los pacientes a las 0, 24 y 72 horas desde el inicio del SIRS, se determinó mediante la técnica de Luminex siguiendo las especificaciones del fabricante. También se analizó la concentración en 5 muestras de sujetos sanos en un solo tiempo como grupo control. El ensayo de Luminex es un procedimiento que permite la cuantificación simultánea de múltiples moléculas de una solución.

Para ello, el plasma recogido previamente de los tubos de EDTA, de cada muestra y tiempo se descongeló y se centrifugó a 16000 rpm durante 4 min a 10°C para eliminar posibles agregados formados durante el proceso de congelación. Se emplearon 25 µl del sobrenadante por muestra y tiempo. Para el estudio de factores celulares se siguió el protocolo de Luminex Multiplex Bead Assay (R&D Systems ref. LXSAHM-21), empleando para el análisis el instrumento LX-200 (R&D Systems) y el software eXPONENT (R&D Systems). Brevemente, se preparó un curva patrón con dilución 1:3 de los estándares del kit para un total de 6 puntos de la curva y un blanco (control). Al mismo tiempo, las muestras se diluyeron (1:2) con el correspondiente diluyente. Todas ellas se incubaron por dos horas junto con esferas (únicas para cada panel) empleadas para la adhesión específica e identificación de las citocinas presentes en el plasma. Tras los sucesivos lavados con la solución al 1X sobre una placa magnética, se añadió la solución de biotina (1 hora) usada para la cuantificación de las citocinas adheridas al formarse un complejo tipo sándwich (esfera específica – anticuerpo - citocina plasma – anticuerpo-biotina). Se lavó y se añadió la solución de estreptavidina-PE por 30 min para completar el ensayo inmunoenzimático biotina-estreptavidina (Fig. Suple. 2). Tras los últimos lavados se procedió a la lectura de la placa. Para la determinación de las concentraciones se importaron los valores de MFI neta (valores con la señal del ruido de fondo descartada)

sobre una curva patrón logística de 5 parámetros (no lineal) para cada una de las moléculas analizadas. Para aquellas muestras que presentaron un valor por debajo del mínimo detectable (<LLOQ – *Lower Limit of Quantitation*) se les asignó el valor correspondiente indicado por la casa comercial.

Tabla 3. Listado de citocinas analizadas mediante la tecnología de Luminex y el valor mínimo detectable por la sensibilidad de la técnica.

S100A8	IL-6	CCL4/MIP-1b
RAGE/AGER	IL-8/CXCL8	CXCL1/GRO α
TNF α	IL-10	MIF
IFN γ	IL-12/IL-23 p40	G-CSF
IL-1 β /IL-1F2	IL-18/IL-1F4	GM-CSF
IL-2	CCL2/MCP-1	FasL/TNFSF6
IL-4	CCL3/MIP-1a	VEGF

4.4 Estudio de las vesículas extracelulares (VEs) plasmáticas

4.4.1 Obtención de VEs por ultracentrifugación (UC)

Las vesículas extracelulares (VEs) se aislaron mediante ultracentrifugación. Para los ensayos de cuantificación, de imagen por microscopía electrónica y cocultivos, se utilizó plasma procedente de tubos de heparina. Para el estudio de proteínas y para el análisis del contenido en microRNAs se emplearon los plasmas procedentes de tubos EDTA.

El protocolo de obtención de las VEs fue común para todas las muestras, tiempos y ensayos, cambiando simplemente el diluyente final (determinado por el tipo de ensayo). Se apuntó el volumen de plasma de partida empleado para la obtención de las VEs. El plasma almacenado a -80°C se descongeló y se centrifugó a 3800 g durante 30 min en la microcentrífuga 5415R (Eppendorf) para eliminar restos celulares o agregados de mayor tamaño (Fig. 11). El sobrenadante se filtró empleando filtros de $0,22\ \mu\text{m}$ de tamaño de poro (Millipore ref. SLGV033RB) y se pasó el volumen a tubos de ultracentrífuga de policarbonato (Beckman Coulter). Los tubos completos con PBS (doblemente filtrado) y equilibrados por parejas (siempre con $< 0,1$ gramos de diferencia) se centrifugaron a 39000 rpm (100000 g) durante 120 min a 4°C en la ultracentrífuga Optima L-90K (Beckman Coulter) empleando el rotor 70Ti y en la ultracentrífuga CP100NX (Himac) con el rotor P70AT-1648 ¹⁶¹. Se retiró el sobrenadante, se realizó un lavado adicional

completando de nuevo con PBS (doblemente filtrado) y se centrifugó en las mismas condiciones durante 70 min. El pellet se recogió en el diluyente determinado.

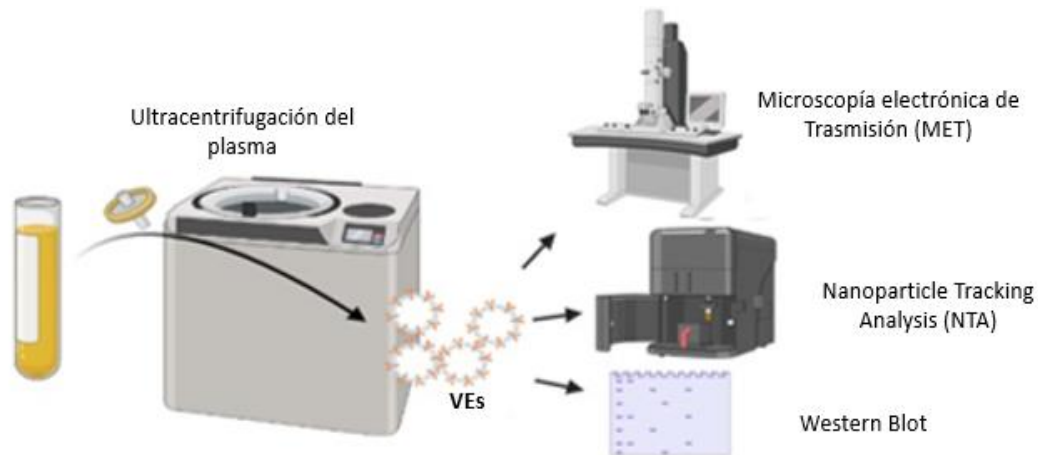


Figura 11. Esquema representativo de la obtención, caracterización y cuantificación de las VEs procedentes de plasma de pacientes SIRS.

4.4.2 Cuantificación y caracterización de las VEs

4.4.2.1 Estudio morfológico mediante Microscopía Electrónica de Trasmisión (MET)

Para el estudio morfológico de las VEs aisladas, el precipitado formado tras las ultracentrifugaciones se resuspendió en 50 μ l de PBS (doblemente filtrado) y se almacenó a -80°C hasta su análisis. El estudio mediante MET se realizó en el Servicio de Microscopía de la Universidad Autónoma de Madrid empleando un microscopio electrónico FEITecnaí G2 (Spirit Biotwin). Para la captura de imágenes, las muestras fueron fijadas con paraformaldehído al 2% y 1% glutaraldehído sobre rejillas recubiertas de carbono (Formvar). Se empleó una solución de uraniloalato como solución de contraste previo a la toma de las imágenes con una cámara digital.

4.4.2.2 Análisis del tamaño medio y de la concentración de las VEs con la tecnología Nanoparticle Tracking Analysis (NTA)

Para la cuantificación y determinación del tamaño medio de las VEs se empleó la técnica de NTA en el instrumento Nanosight NS300 equipado con una cámara sCMOS, láser azul 488 y el software NTA de análisis v.3.4. Para este análisis se emplearon las VEs aisladas a partir de 1 ml de plasma a los tiempos 0 y 72 horas de cada muestra SIRS, y únicamente a un tiempo en las muestras del grupo control. Las VEs aisladas se resuspendieron en un total de 150 μ l de PBS (doblemente filtrado) y se congelaron a -

80°C hasta su análisis. Todas las capturas se realizaron en la cámara de flujo continuo bajo las condiciones de: 23-25°C de temperatura a 25 FPS (imágenes por segundo). La cuantificación y análisis del tamaño de las VEs fue realizado en el servicio SOFT-ICMAB/U6-Nanbiosis del Instituto de Ciencia de Materiales de Barcelona (ICMAB-CSIC). Los resultados se expresan como número de partículas por mililitro de plasma y el tamaño medio en nanómetros.

4.4.2.3 Identificación de la tetraspanina CD63 por Western Blot

Tras la ultracentrifugación las VEs se resuspendieron en 150 µl de Lysis Buffer (RIPA ChemCruz ref. sc-24948) con inhibidor de proteasas, 200mM PMFS 100 mM SOV) Tras 20 min en hielo y agitándose con vórtex, se centrifugó a 13000 rpm durante 15 min, se recogió y almacenó el sobrenadante a -20°C.

Para la preparación del gel de electroforesis, 50 µl de cada muestra se combinó con 50 µl de *sample buffer* (Bio-Rad ref. 1610747) con β-mercaptoetanol (3 ml con 60 µl, respectivamente) y se desnaturalizó a 100°C durante 10 min. Para la separación por peso molecular del contenido proteico se corrieron las muestras mediante electroforesis en un gel de acrilamida al 12%.

La transferencia del contenido proteico a membrana desde el gel de acrilamida se hizo mediante la técnica de sándwich por transferencia húmeda sobre una membrana de PVDF. Tras 2 horas de transferencia, la membrana se extrajo y se bloqueó con leche; Blotting-Grade Blocker, Bio-Rad ref. 170-6404) durante 1 hora. Tras este periodo se incubó durante la noche el anticuerpo primario anti-CD63 (1:500 System Biosciences ref. EXOAB-CD63A-1). Después de la incubación, se hicieron 3 lavados y se añadió el anticuerpo secundario (1:5000). Se incubó en agitación durante 2 horas, y se lavó 3 veces previo a la revelación de la membrana en el iBright Imaging Systems (Invitrogen).

4.4.3 Análisis bioinformático del contenido en microRNAs

4.4.3.1 Extracción de RNA

Para el estudio del contenido interno de microRNAs (miRNAs), se aislaron VEs de un mínimo de 4 ml de plasma en el tiempo 0 horas desde el SIRS y se resuspendió el precipitado en 500 µl de la solución de trizol (Tripure Isolation Reagent, Roche ref.

15596026). Siguiendo el protocolo de separación de RNA por gradiente con Trizol-cloroformo, se añadieron 200 μ l de cloroformo. Después de 20 min en hielo, se centrifugó 10000 rpm durante 30 min a 4°C en la microcentrífuga, y se recogió la fase superior transparente (RNA total). Se añadieron 500 μ l de isopropanol y se almacenó durante toda la noche a -20°C o 1 hora a -80°C, para después centrifugarlo a 12000 rpm durante 15 min a 4°C y conseguir precipitar el RNA extraído. Se eliminó el isopropanol y se hidrató el RNA con 100 μ l de etanol al 70% y centrifugando a 12000 rpm por 5 min. Tras dejar evaporarse el excedente de etanol se recompuso el RNA con 12 μ l de agua libre de RNAsas. El contenido y la pureza del extracto de RNA de todas las muestras se midió con el NanoDrop (Thermo Fisher) a una longitud de onda de 260 nm. El extracto en RNA se almacenó a -80°C hasta su posterior uso. Hasta este punto son contantes los pasos del protocolo para cualquier estudio de RNA que se realizó en este trabajo de tesis.

4.4.3.2 Arrays de microRNAs

Para el estudio del contenido en miRNAs fue necesario hacer las reacciones de retrotranscripción o transcripción reversa (RT-PCR), preamplificación y de PCR cuantitativa (qPCR). Con la primera fase de RT-PCR se transformó las cadenas de miRNAs en cDNA empleando y siguiendo las indicaciones del kit Megaplex RT Reactions (Applied Biosystems ref. 4366596) en el termociclador ProFlex PCR System (Applied Biosystems). Parte del producto de esta reacción (2,5 μ l) se utilizó para hacer la amplificación de material genético y así conseguir una mayor señal (detectable) utilizando los reactivos del Megaplex PreAmp (Applied Biosystems ref. 4399233) y siguiendo las instrucciones del fabricante. La cuantificación del contenido específico de 384 miRNAs para cada muestra se midió empleando la tarjeta de array tipo A TaqMan (Applied Biosystems) y los reactivos del kit (TaqMan Universal PCR Master Mix, Applied Biosystems ref. 4324018). El instrumento 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) con el software SDS v.2.2.2 se empleó para la cuantificación a tiempo real y transformación de los resultados obtenidos.

Para determinar la expresión relativa de cada miRNA por muestra, se utilizó el software de análisis DataAssist v.2.2 (Thermo Fisher) tomándose los valores de C_T (ciclo en el que se consigue señal detectable y es relativo a la concentración específica de cada

miRNA). La expresión de cada miRNA se normalizó con los valores del U6 snRNA y el RNU48 (controles endógenos o de referencia). Para el análisis de la expresión de los miRNAs, se utilizó el paquete Limma del software R. Además, se calcularon los valores del ΔC_T ($\Delta C_{T \text{ miRNA Grupo SIRS}} - \Delta C_{T \text{ miRNA Grupo Control}}$) y el *Fold Change* (FC; $2^{-\Delta C_T}$). Se consideraron que los miRNAs diferencialmente expresados entre los grupos fueron aquellos que presentaron un q-valor (o p-valor ajustado) $\leq 0,05$ y tuvieron un rango de expresión diferencial o Fold Change (FC) $[\leq 0,5 \text{ y } \geq 2]$ y de $[\leq 0,1 \text{ y } \geq 10]$ con respecto al grupo de referencia. Las bases de datos miRPath v.3 (Diana Tools)¹⁶² y miRBase (febrero del 2023)¹⁶³ se emplearon para conocer el papel de los miRNAs. Además, se estudiaron los genes que estaban regulados por estos miRNAs, las vías de señalización intercelular en las que participan, así como su relevancia en otras patologías.

4.5 Estudio de diferenciación de macrófagos en condiciones SIRS

4.5.1 Obtención, cultivo y maduración de macrófagos a partir de monocitos

Para la obtención de un gran número de monocitos de sangre periférica se optó por procesar concentrados de leucoaféresis (*Buffy Coat*) de donantes sanos. Para ello, se aislaron células mononucleadas (MNCs) mediante centrifugación en gradiente de densidad con Ficoll-Paque (Sigma-Aldrich ref. GE17-1440-02). Las MNCs se marcaron con esferas de separación inmunomagnéticas anti-CD14 (MACS ref.130-050-201) siguiendo el protocolo de la casa comercial. La separación de la fracción de interés se hizo en un equipo AutoMACS (Miltenyi). De todas las separaciones se hizo un control de calidad de la fracción positiva y negativa para conocer el grado de eficiencia pureza de la separación. Se contaron los monocitos separados ($CD14^{pos}$) y se plantaron aproximadamente 5×10^5 cél/cm² (por pocillo) en una placa de 48 pocillos durante 5 días (Fig. 12). Como medio base para todos los cultivos se utilizó RPMI suplementado (con 10% de FBS (suero bovino fetal, Gibco ref. 11560636) inactivado, 1% de L-glutamina (Corning ref. 25-005-CI) y 1% antibiótico (Gibco ref. 15140-122)). A este medio se le añadió 5 ng/ml de GM-CSF (PeproTech ref. 300-03) o 50 ng/ml de M-CSF (Gibco ref. PHC9504) cada 2 días para la diferenciación a macrófago. De esta manera se obtuvo un

cultivo *in vitro* de macrófagos diferenciados únicamente con GM-CSF (control M0). En el último día se activaron/maduraron los macrófagos, con 20 ng/ml IFN γ (PeproTech ref. 300-02) al pocillo de GM-CSF para generar un perfil M1 (proinflamatorio) y con 50 ng/ml de IL-4 (R&D Systems ref. 204-IL) al pocillo de M-CSF para obtener un perfil M2 (antiinflamatorio).

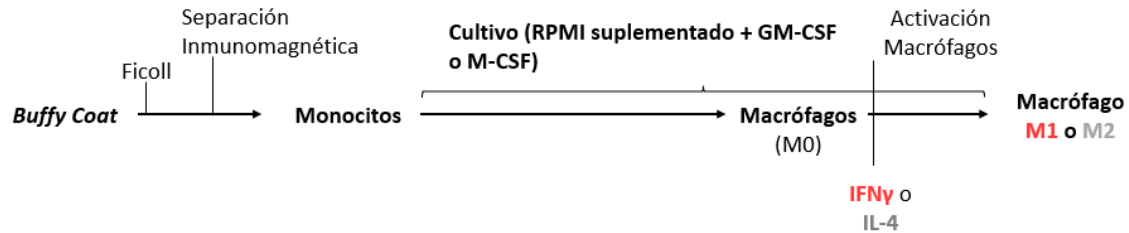


Figura 12. Esquema seguido para la obtención de macrófagos derivados de monocitos de Buffy Coat.

Para simular las condiciones que ocurren en los pacientes SIRS, se cocultivaron los monocitos (CD14^{pos}) directamente con el plasma de los pacientes. Para ello los monocitos se cultivaron desde el primer día con 250 μ l de plasma de los pacientes SIRS politrauma, plasma de pacientes no politrauma o plasma de los sujetos sanos (Fig. 13) junto con 250 μ l de RPMI suplementado y la citocina GM-CSF (como se indica arriba). Estos experimentos se realizaron con el plasma recogido a tiempo 0 y 72h después del SIRS con el fin de comprobar si el efecto era el mismo o transcurrido un tiempo la capacidad de activación variaba.

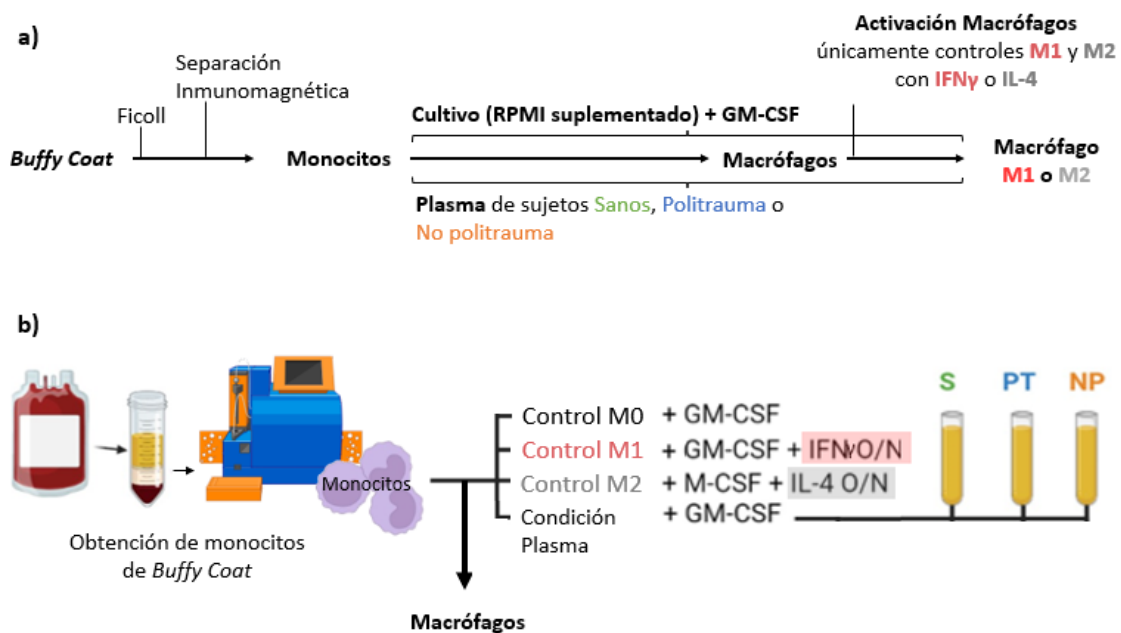


Figura 13. Esquema seguido para evaluar el efecto de las condiciones SIRS sobre la maduración y activación de los monocitos sanos. a) Esquema lineal seguido para el cultivo de los monocitos sanos en

condiciones SIRS. Los controles M1 y M2 fueron los únicos que recibieron una dosis de IFN γ o IL-4. b) Representación de los controles y todas las condiciones de cultivo estudiadas. S: sano, PT: Politrauma, NP: No politrauma.

Tras el cocultivo del apartado anterior se realizaron los siguientes procedimientos (Fig. 14): estudio de la morfología, el inmunofenotipo de macrófagos tipo M1/M2, la secreción de citocinas en el sobrenadante, la expresión de genes implicados en la maduración, metabolismo, regulación inflamatoria, migración, etc. También se midió la capacidad fagocítica.

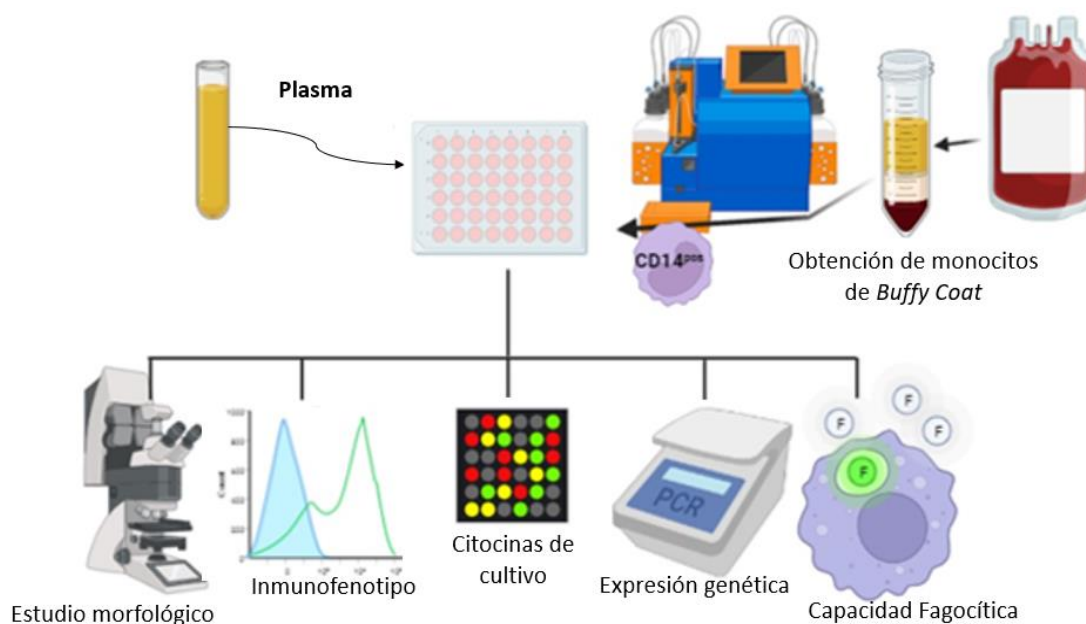


Figura 14. Metodología seguida para evaluar el efecto que tiene el plasma SIRS de diferente origen sobre la diferenciación y activación de monocitos sanos.

4.4.4 Caracterización macrofágica

4.4.4.1 Estudio morfológico de los macrófagos

Durante el desarrollo del cultivo se realizaron fotos con el microscopio Leica CTR6000 con el software de imagen Leica Application Suite (Leica). Se evaluó la morfología (redonda o irregular), el tamaño celular, la aparición de colonias y la densidad del cultivo.

4.4.4.2 Estudio del inmunofenotipo de los macrófagos

Tras retirar el sobrenadante, se procedió a la separación de las células de la superficie de cultivo con PBS en frío durante 30-45 min. Las células se lavaron y se marcaron con el panel de anticuerpos monoclonales que se indica en la Tabla 4. Las células se adquirieron en el citómetro FACSCanto II, y el análisis se realizó con el software Infinicyt v.2.0. El marcador 7AAD se utilizó para excluir a las células no viables del análisis.

También se eliminaron del análisis los dobletes con el diagrama FSC-A/FSC-H. En este apartado se midió principalmente la expresión media (MFI) de los antígenos estudiados.

Tabla 4. Panel de anticuerpos utilizado para el estudio del perfil de macrófagos tipo M1/M2 por citometría de flujo.

Marcador	CD36	CD64	7AAD	CD163	CD14	CCR7	CD206	CD80
Fluorocromo	FITC	PE	PerCP	PE-Cy7	APC	APC-H7	P.B.	BV510

4.4.4.3 Análisis de citocinas del sobrenadante por Cytometry Bead Assay (CBA)

Tras el cultivo, el sobrenadante de cada pocillo se retiró y se centrifugó a 2000 g durante 5 min y se almacenó a -80°C hasta su análisis. Para el estudio de las citocinas expresadas durante el cultivo se empleó el kit de Cytometric Bead Assay (CBA Th1/Th2/Th17 para muestras humanas (BD ref. 560484) que analiza IFN γ , TNF α , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 e IL-17. Las muestras se adquirieron en el citómetro FACSCanto II bajo una compensación adecuada, y se analizó la concentración (según la curva estándar) en el software FCAP Array (BD).

4.4.4.4 Estudio del perfil de expresión genética de los macrófagos

Una vez obtenidos los macrófagos se extrajo el RNA con Trizol siguiendo los mismos pasos del apartado 4.4.3.1). Se sintetizó el cDNA utilizando el kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystem ref. 4368813) y se procedió a hacer la PCR cuantitativa con el kit TaqMan Universal PCR Master Mix 2x, No AmpErase (Applied Biosystem ref. 4352042) para los primers indicados en la Tabla 5. El gen ACTB (*housekeeping gene*) se utilizó como gen de referencia para normalizar los cálculos de expresión entre las muestras.

Tabla 5. Genes estudiados para la caracterización del perfil M1/M2 de los macrófagos.

GEN	CÓDIGO
IDO1	Hs00984148
CD209	Hs1588349
CXCR4	Hs00607978
ACTB	Hs01060665

4.4.4.5 Estudio de la capacidad fagocítica de los macrófagos

Para evaluar la capacidad fagocítica de los macrófagos activados con plasma de pacientes SIRS o donantes sanos, las células tras 5 días de cultivo se levantaron con PBS en frío y se cuantificaron. En pocillos de placa de 96 con fondo opaco se añadieron 1×10^4 células de cada condición con 100 μ l de RPMI suplementado.

Al mismo tiempo se prepararon las partículas fagocitables pHrodo *S. aureus* Bioparticles (Invitrogen ref. P35382). Las partículas se reconstituyeron con 1 ml de plasma de donante sano previamente centrifugado para eliminar el debris, se mezclaron y se dejaron reposar durante 1 h a 37°C en agitación (proceso de opsonización). Pasado este tiempo se lavaron 2 veces las esferas opsonizadas con PBS (1500 g durante 5 min a 4°C). Las esferas se cuantificaron para añadir a cada pocillo 100 unidades por macrófago. Este kit permite detectar la fluorescencia que se emite solamente cuando las partículas están en un ambiente ácido (pH<5). Las partículas al ser fagocitadas pasan al complejo del fagolisosoma y su fluorescencia aumenta siendo detectable y proporcional al número de partículas fagocitadas.

Para la detección de fluorescencia, la placa se leyó cada 30 min en el lector de placas de fluorescencia Infinite 200 PRO Plate Reader (Tecan) a una longitud de onda de excitación/emisión de 509/533 nm. Pasadas 3 horas, la actividad fagocítica se detuvo poniendo las células sobre hielo, se lavaron con PBS y se fijaron las células paraformaldehído al 4% en una placa de 96 pocillos con fondo transparente. Las imágenes se adquirieron en el microscopio de fluorescencia Thunder Imaging System (Leika) y se analizaron con el programa ImageJ.

4.6 Células mesenquimales (MSCs) de médula ósea procedentes de donantes sanos como agentes moduladores.

4.5.1 Cultivo y expansión de MSCs de médula ósea

Para obtener MSCs procedentes de médula ósea de sujetos sanos se aislaron las MNCs mediante centrifugación en gradiente de ficoll y cultivo posterior en placa. Brevemente la MO se diluyó 1:3 en HBSS (Hank's Balanced Salt Solution, Lonza 10-543F) y se realizó la centrifugación en Ficoll en condiciones estándar. Tras obtener las MNCs, se plantaron a razón de 1×10^6 cél/cm² en frascos de cultivo (*flask*) con DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*, Gibco ref. 13345364) suplementado con 10% de FBS y 1% de penicilina-estreptavidina (Gibco ref. 11568876) (Fig. 15). Tras 2-3 días de cultivo a 37°C, 5% CO₂ y 90% humedad se cambió el medio de cultivo y se siguió expandiendo hasta alcanzar una confluencia del 80-90%. En ese momento las células se lavaron y se levantaron de la superficie usando tripsina (Gibco ref. 11580626) durante 5 min a 37°C. Se cuantificaron y se volvieron a plantar a una densidad de 5000 cél/cm², y así continuamente hasta P3, momento en el que se utilizaron para los experimentos.

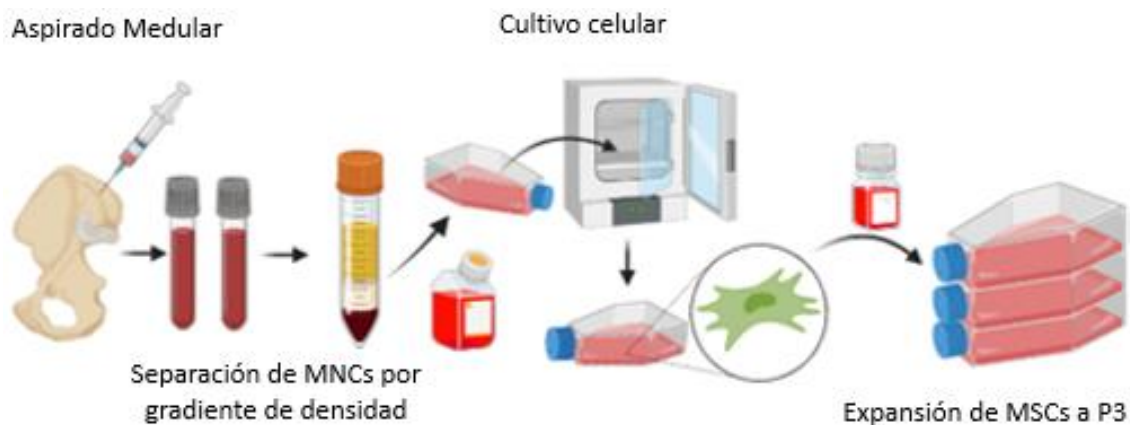


Figura 15. Esquema de trabajo para la obtención de células mesenquimales estromales (MSCs) de médula ósea de sujetos sanos.

4.5.2 Efecto de las MSC sobre los macrófagos en condiciones SIRS

Con el fin de conocer la capacidad inmunorreguladora de las MSCs se realizaron cultivos de transwell sobre los macrófagos activados de la misma forma que en el apartado 4.5.1. Para ello, primero se cultivaron los macrófagos en las condiciones SIRS previamente descritas. Pasados 4 días, se prepararon los insertos transwell plantándose

5×10^4 MSCs por inserto durante 4 horas en 200 μ l de DMEM suplementado para favorecer la adhesión. Seguido se pusieron los transwell sobre los pocillos y se cocultivaron *overnight* (Fig. 16).

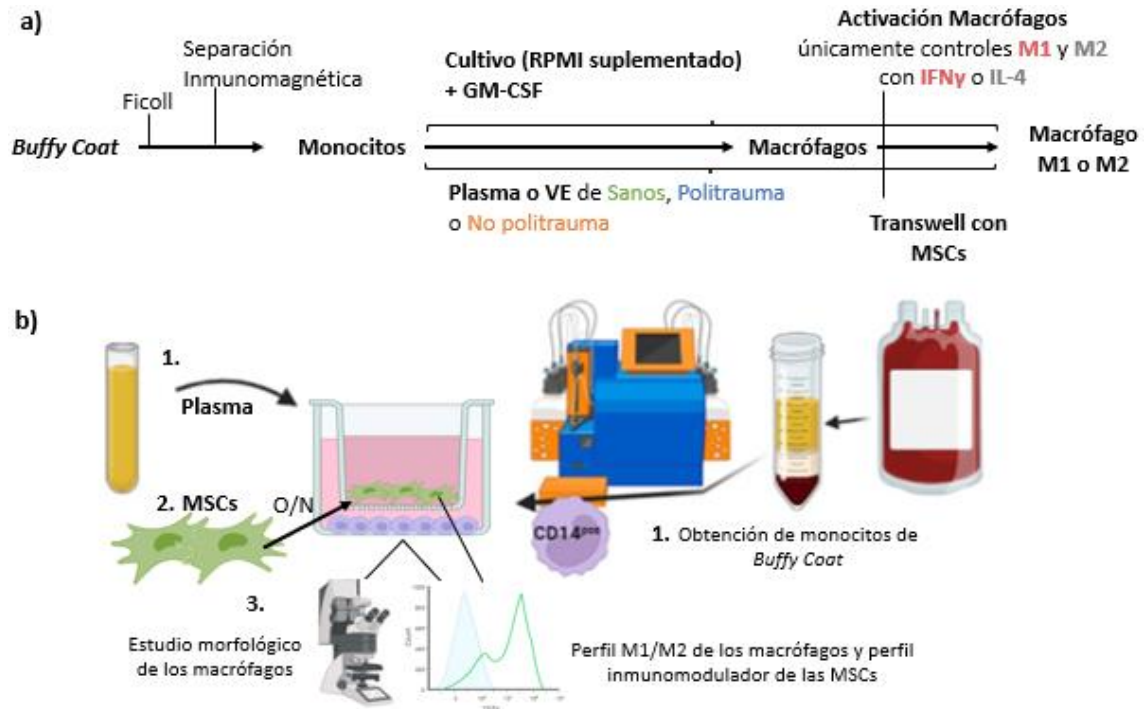


Figura 16. Esquema seguido para el medir el efecto inmunomodulador de las MSCs sobre los macrófagos en condiciones SIRS. a) Esquema lineal seguido para evaluar el efecto de las MSCs sobre los macrófagos cultivados en condiciones SIRS. Los controles M1 y M2 fueron los únicos que recibieron una dosis de IFN γ o IL-4. b) 1. Los monocitos se cultivaron con plasma de pacientes SIRS o de donantes sanos. 2. El último día se cocultivaron *overnight* (O/N) con MSCs en un injerto de transwell. 3. Se analizó la morfología y el inmunofenotipo de los macrófagos. Además, se estudió el perfil inmunomodulador de las MSCs por CMF.

Al día siguiente, se tomaron imágenes con el microscopio de la población de macrófagos. Los macrófagos se separaron posteriormente con PBS frío para estudiar su perfil M1/M2. Además, las MSCs se tripsinizaron evaluar potenciales cambios en su perfil inmunomodulador tras el cocultivo (ver siguiente apartado).

4.5.3 Estudio del perfil inmunomodulador de las MSC en condiciones SIRS

Para el estudio del fenotipo inmunomodulador de las MSCs en condiciones SIRS, las MSCs del cocultivo *overnight* durante la noche (Fig. 16) se levantaron con tripsina, y se lavaron para el marcaje intracitoplasmático y de membrana siguiendo las indicaciones

del kit FIX&PERM (Nordic MUBio, GAS-002-1). El panel de CMF empleado para el estudio del perfil inmunomodulador de las MSCs se recoge en la Tabla 6.

Tabla 6. Combinación de anticuerpos monoclonales utilizados para la caracterización inmunomoduladora de las MSCs cocultivadas con plasma y macrófagos.

Marcador	CD274	CD106	CD273	CD90	IDO	CD54	-	Live/Dead
Fluorocromo	FITC	PE	PerCP	PE-Cy7	APC	APC-H7	-	BV510

Para este apartado se estudió a modo de control el efecto que podía tener el plasma de pacientes SIRS o de sujetos sanos sobre el perfil inmunomodulador de las MSCs sanas. Para ello, se cultivaron las MSCs con plasma de diferente origen *overnight* en ausencia de macrófagos y se analizó el perfil por CMF.

4.7 Análisis estadístico

El estudio estadístico para todos los resultados de este trabajo se realizó mayoritariamente con el software SPSS v.23 (IBM). Para la organización de los datos y representación de los resultados se emplearon además del SPSS, los programas de Excel (Microsoft), R y GraphPad Prism v.6 (GraphPad). Para el análisis estadístico se empleó la mediana como valor de tendencia central para un conjunto de datos (grupo) y el rango intercuartílico como medida de dispersión de los datos. Para el estudio comparativo de muestras independientes (entre grupos) se utilizó la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney y para la comparación de más de tres grupos la prueba de Kruskal-Wallis (análisis no paramétrico). Para los estudios de cinética o cambios en dos tiempos de muestras dependientes (relacionadas) se empleó la prueba estadística de Wilcoxon. Para los análisis de variables cualitativas se empleó el test de Fisher. La determinación de puntos de corte para los estudios de subagrupación en función de una variable se determinó mediante el estudio por curvas ROC (según sensibilidad y especificidad) y por agrupación visual (bloques de muestras definidos). Además, se utilizó el modelo de Kaplan-Meier para la estimación de la supervivencia de los pacientes.

Los estudios de relación y medida del grado de dependencia de dos variables, empleado para el análisis estadístico de la relación entre parámetros clínicos y biológicos se hicieron empleando el coeficiente de correlación de Spearman o el de Pearson

(si $n > 30$). Para la identificación de variables relacionadas/dependientes y conocer el grado de determinación de un conjunto de variables sobre una variable independiente se emplearon modelos de regresión logística lineal multiparamétrica. Además, se emplearon modelos de escalado multidimensional para la agrupación de las muestras según un conjunto de variables específicas (dendrograma, PCA).

5. RESULTADOS

5.1 Demografía y evolución clínica de los pacientes con SIRS

De todos los pacientes incluidos en el estudio se recogieron las muestras de sangre a las 0, 24 y 72 horas desde el inicio del SIRS. La primera muestra de cada paciente se obtuvo justo al ingreso del paciente en la UCI (mayoritariamente entre las primeras 0-12 h desde el ingreso) tras obtenerse el consentimiento informado.

Se incluyeron 25 pacientes que desarrollaron SIRS tras un politraumatismo (ISS \geq 16) con una mediana de ISS de 26 (22-29) y de APACHE II de 18 (14-24) de riesgo de mortalidad. El 56% de estos pacientes presentaron un traumatismo craneoencefálico (TCE). En el otro grupo de estudio (no politrauma, NP) se incluyeron también 25 pacientes que desarrollaron SIRS derivados de otro origen (mayormente de infección urinaria, Fig. Suple. 3), con un APACHE II de 22 (17-26). Los valores de marcadores de evolución clínica (bioquímica, coagulación, hemograma) del momento de inclusión de los pacientes en el estudio, y el soporte médico y los tratamientos recibidos en los primeros 3 primeros días y otras características se recogen en la Tabla 7.

Tabla 7. Demografía, evolución y marcadores clínicos de los sujetos en el momento de la inclusión en el estudio.

	Sanos (n=29)	Politrauma (n=25)	No Politrauma (n=25)	p-valor
Demografía y scores clínicos				
Edad	56 (50-58)	50 (44-62)	66 (53-73)	0,01
Hombres/Mujeres	15/14	23/2	15/10	0,009
APACHE II	-	18 (14-24)	22 (17-26)	ns
ISS	-	26 (22-29)	-	-
SOFA (0 horas)	-	7 (6-10)	8 (6-10)	ns
SOFA (72 horas)	-	6 (5-10)	4 (4-9)	ns
TCE (%)	-	14 (56)	-	-
Evolución clínica				
Días en UCI	-	16 (11-21)	5 (4-10)	\leq 0,001
Días en hospital	-	27 (18-37)	11 (7-25)	\leq 0,001
Mortalidad (28 d)	-	2/25 (8)	4/25 (16)	ns
Terapia de soporte y reemplazo orgánico				
Ventilación mecánica (%)	-	24 (96)	22 (88)	ns
Resucitación fluidica (%)	-	25 (100)	23 (92)	ns
Vasopresores (%)	-	23 (92)	23 (92)	ns
CRRP (%)	-	1 (4)	5 (20)	ns
Transfusión plaquetas (%)	-	5 (20)	5 (20)	ns
Transfusión hematíes (%)	-	14 (756)	5 (20)	0,019

Poblaciones leucocitarias y marcadores de inflamación				
<i>Rango de referencia</i>				
Leucocitos (x10 ³ /μl)	4,5-10,8	16 (12-18,1)	20,3 (12-28,6)	0,013
Neutrófilos (x10 ³ /μl)	1,4-6,5	13,1 (9,3-15,2)	14,9 (9,6-21,8)	0,007
Linfocitos (x10 ³ /μl)	1,2-3,5	1 (0,8-1,6)	0,6 (0,5-1)	ns
Monocitos (x10 ³ /μl)	0,3-0,9	1 (0,6-1,2)	0,7 ± (0,5-1)	ns
PCR (mg/dL)	0-0,5	1,5 (0,4-5,2)	24,9 (18,8-30)	≤ 0,001
Procalcitonina (ng/mL)	0-0,5	2,1 (1,3-13)	32,3 (15,3-83)	≤ 0,001
Marcadores de daño y función orgánica				
Lactato	≤ 2 mmol/L	2,8 (2-3,9)	2,1 (1,6-3)	0,045
AST	0-40 U/L	221 (76-505)	131,5 (66,5-646,5)	ns
ALT	0-41 U/L	73 (35-233)	22 (16-44,5)	0,004
GGT	0-60 U/L	38 (17-51,5)	75 (25-101,5)	ns
Bilirrubina (mg/dL)	0,15-1,2	0,5 (0,4-0,7)	0,8 (0,4-1,1)	0,028
Creatinina (mg/dL)	0,7-1,2	1 (0,8-1,2)	1,6 (1,1-2,8)	0,002
Urea (mg/dL)	17-49	35 (31-41)	64 (47-104)	≤ 0,001
Coagulación				
Plaquetas (x10 ³ /μl)	150-450	174 (148-226)	188 (137,5-249,3)	ns
Fibrinógeno (mg/dL)	200-400	209 (172,6-242,8)	533 (401-702,6)	≤ 0,001
TP INR (s)	0,8-1,2	1,2 (1,1-1,3)	1,3 (1,2-1,5)	ns
Otros marcadores				
LDH (U/L)	135-280	491 (305-708)	208 (168-257)	≤ 0,001
Glucosa (mg/dL)	76-110	181 (149-208)	148 (105-180)	0,008

Nota: Los valores representados corresponden a la mediana y el rango intercuartílico, o el número de sujetos seguidos del porcentaje entre paréntesis en el primer día de inclusión en el estudio. El seguimiento de los tratamientos se hizo para los 3 primeros días. APACHE II: *Acute Physiology and Chronic Health Evaluation score*, ISS: *Injury Severity Score*, SOFA: *Sequential Organ Failure Assessment*, UCI: unidad de cuidados intensivos, CRRT: Terapia de reemplazo renal continuo, PCR: Proteína C Reactiva, PCT: Procalcitonina, AST: aspartato transaminasa, ALT: alanina transaminasa, GGT: gamma-glutamil transferasa, TP INR: tiempo de protombina ratio internacional normalizado, LDH: Lactato deshidrogenasa.

Los valores de SOFA (*Sequential Organ Failure Assessment*), fueron de 7 (6-10) en el grupo politrauma y de 8 (6-10) en el grupo no politrauma en el inicio del SIRS. Los valores de SOFA calculado en los primeros días desde el inicio del SIRS en ambos grupos de estudio fue similar (Fig. 17).

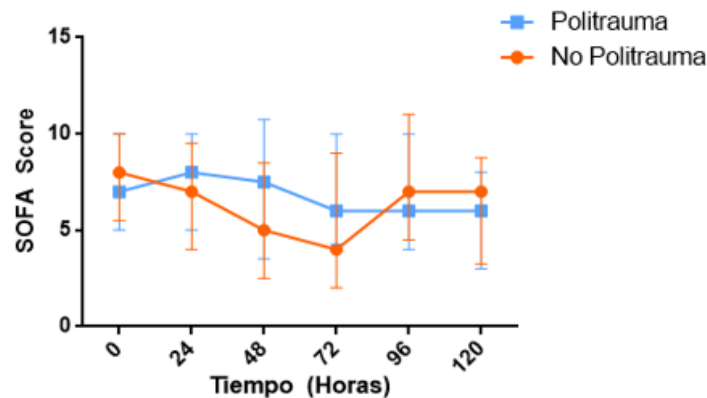


Figura 17. Evolución de los valores de los sistemas de puntuación SOFA utilizados para determinar el pronóstico de los pacientes evaluando el nivel de daño multiorgánico. p-valor: '*' $\leq 0,05$; '**' $\leq 0,01$; '***' $\leq 0,001$.

En cuanto a la evolución clínica, se observaron diferencias significativas entre los dos grupos SIRS en el tiempo de estancia de los pacientes en la UCI y los días de hospitalización, que fue mayor en politraumatizados. La mortalidad tras los 28 días desde la inclusión en el estudio fue similar en ambos grupos. Respecto a la calidad de vida de los pacientes tras un mes desde el alta hospitalaria, los pacientes con SIRS derivados de un politrauma presentaron un menor índice de Katz (mayor dependencia en el cuidado personal), y una peor calidad de vida (menor valor EQ5D) que los pacientes no politrauma (Fig. 18).

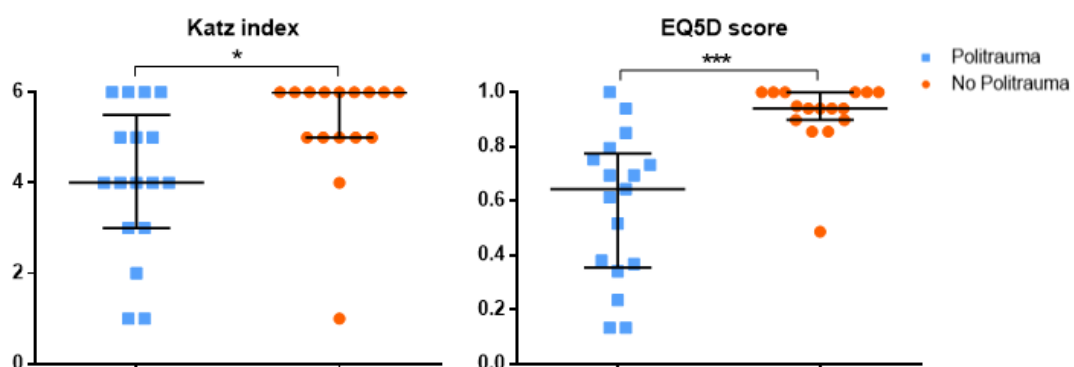


Figura 18. Valores del grado de dependencia (ayuda personal) y calidad de vida tras 1 mes desde la salida de los pacientes del hospital. p-valor: '*' $\leq 0,05$; '**' $\leq 0,01$; '***' $\leq 0,001$.

Respecto a los parámetros de inflamación, los pacientes del grupo no politrauma mostraron niveles superiores de PCR y PCT. La evolución en los primeros 3 días de estos marcadores fue diferente entre ambos grupos de estudio (Fig. 19). En el grupo politrauma el valor más alto de PCR se obtuvo a las 48 horas, mientras que el del grupo no politrauma fue dentro de las primeras 24 horas. La PCT se mantuvo elevada en el

grupo no politrauma (significativo frente al grupo politrauma) durante la primeras 72 horas.

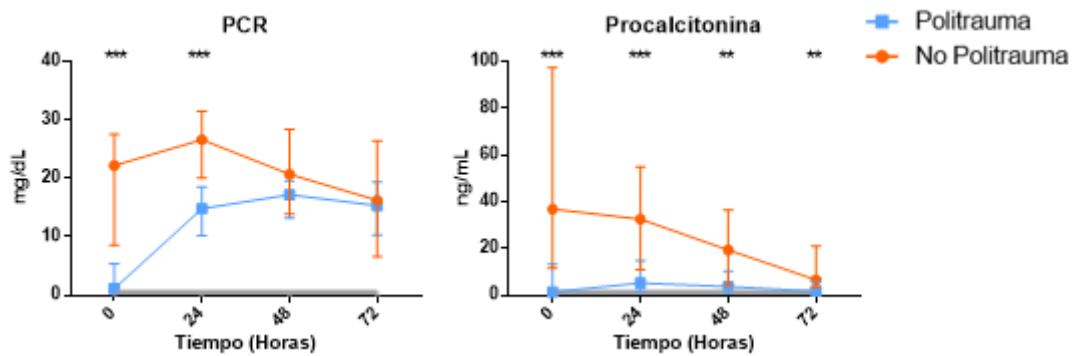


Figura 19. Evolución en la concentración en sangre de marcadores inflamatorios: proteína C reactiva (PCR) y procalcitonina. Las líneas horizontales grises son indicadores del rango de referencia en sujetos sanos. p-valor: '*' $\leq 0,05$; '**' $\leq 0,01$; '***' $\leq 0,001$.

Los niveles de glucosa, lactato y de la lactato deshidrogenasa (LDH) fueron superiores en los pacientes politrauma. Los pacientes no politrauma presentaron niveles superiores de creatinina y urea. En ambos grupos SIRS los valores de la transaminasa AST fueron superiores a los niveles de referencia. Por otro lado, la ALT (expresada especialmente en el hígado), solo se vio aumentada significativamente en el grupo politrauma en las primeras 48 horas con respecto al grupo no politrauma. Inversamente, los valores de la GGT se vieron aumentados significativamente en los pacientes no politrauma y por encima de las concentraciones normales en las primeras 48 horas.

El tiempo de protombina (TP INR; ratio internacional normalizado) y el tiempo de tromboplastina parcial activada (TTP α) se mantuvieron cerca de los valores normales durante el SIRS. El fibrinógeno fue superior en los pacientes no politrauma frente a los politrauma durante las primeras 48 horas.

Respecto a los cuidados y terapias recibidas en los primeros 3 días desde el inicio del SIRS, ambos grupos de pacientes requirieron en su mayoría la administración de vasoactivos (noradrenalina), ventilación mecánica y fluidoterapia. Algunos pacientes de cada grupo (similar en número) requirieron de soporte renal y de transfusión de plaquetas. Por otro lado, el grupo politrauma (56%) requirió de más transfusiones de hematíes frente al grupo no politrauma (20%).

5.2 Análisis de poblaciones celulares de sangre periférica

5.2.1 Poblaciones leucocitarias mieloides

Los resultados analizados de las poblaciones mieloides proceden de los observados con el tubo MoDC. Para las poblaciones de linfocitos T, B y células NK, se utilizaron los resultados obtenidos del tubo de *Lymphocyte Screening Tube* (LST).

Tras el inicio del SIRS el recuento de leucocitos en circulación aumentó significativamente en todos los casos respecto a los donantes, siendo todavía mayor en los pacientes no politrauma (Fig. 20). Sin embargo, a las 72h el recuento leucocitario en muestras de pacientes politrauma disminuyó significativamente hasta alcanzar valores dentro del rango normal. Este hecho no se observó en los pacientes no politrauma, aunque presentaron menor número de leucocitos totales que en el inicio. Este aumento de los leucocitos en circulación fue debido principalmente por la alta movilización de la población de neutrófilos (Fig. 20)

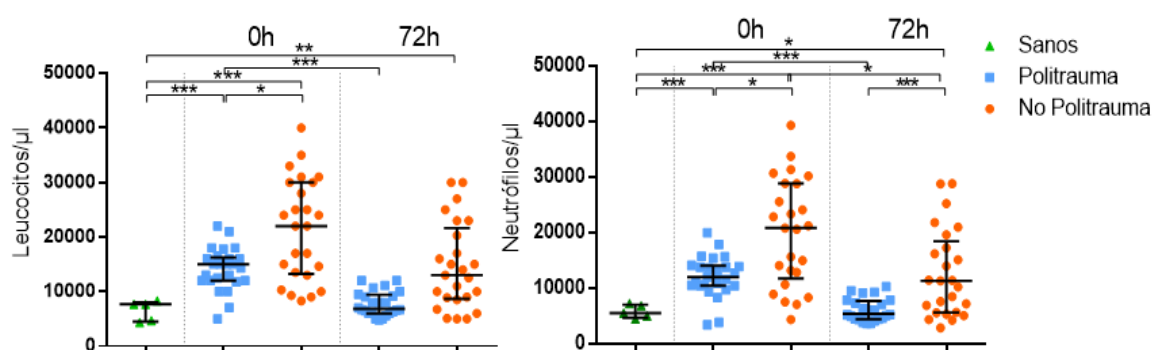


Figura 20. Recuento de leucocitos totales y neutrófilos en sangre periférica desde el inicio del SIRS. p-valor: '*' $\leq 0,05$; '**' $\leq 0,01$; '***' $\leq 0,001$.

Además del aumento de neutrófilos maduros ($CD16^{pos}/CD62L^{pos}$), se observó una liberación masiva de neutrófilos inmaduros ($CD16^{neg}/CD62L^{neg}$ y $CD16^{neg}/CD62L^{pos}$) principalmente en las primeras horas tras el SIRS (Fig. 21). En condiciones basales estas poblaciones inmaduras de neutrófilos fueron mínimas en sangre periférica. Del mismo modo que la población de neutrófilos maduros, estas poblaciones inmaduras tendieron a normalizarse pasadas 72h.

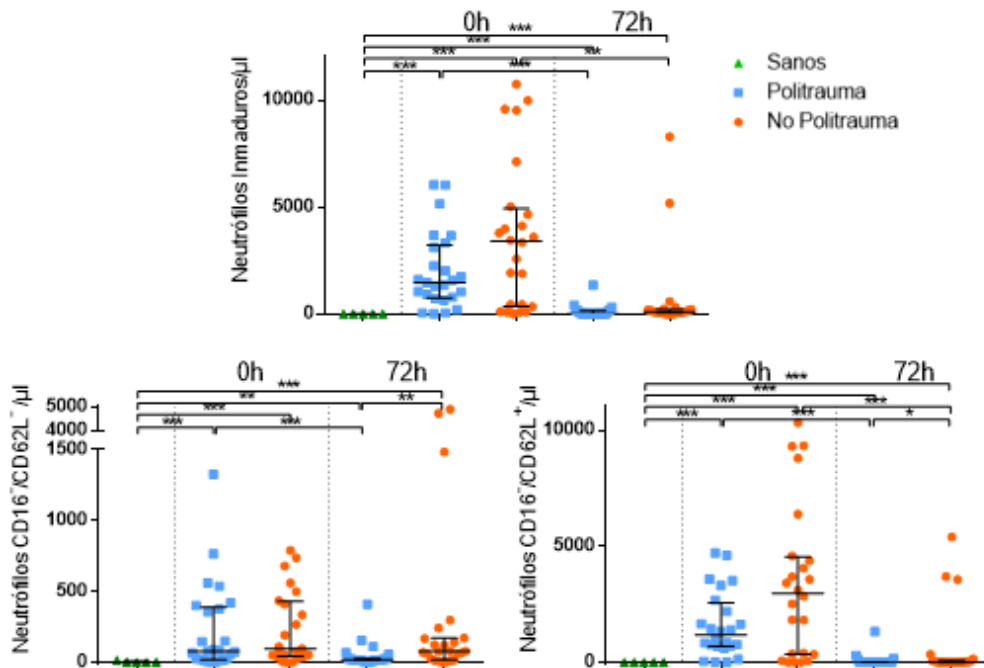


Figura 21. Recuento de poblaciones de neutrófilos inmaduras. p-valor: '*' $\leq 0,05$; '**' $\leq 0,01$; '***' $\leq 0,001$.

El recuento de otras poblaciones de granulocitos como los eosinófilos y basófilos disminuyó significativamente después del inicio de SIRS en ambos grupos en comparación con los sujetos sanos (Fig. 22). Las concentraciones de las dos poblaciones aumentaron significativamente a las 72h en ambos grupos llegando a los niveles normales.

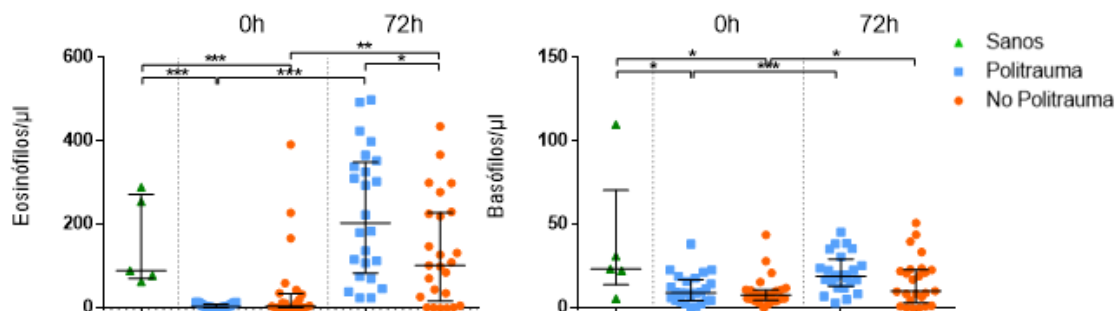


Figura 22. Cuantificación de las poblaciones de eosinófilos y basófilos en sangre periférica. p-valor: '*' $\leq 0,05$; '**' $\leq 0,01$; '***' $\leq 0,001$.

Con respecto a otras poblaciones mieloides, los niveles de monocitos totales solo se vieron incrementados en el grupo de pacientes politrauma en las primeras horas del SIRS respecto al resto de grupos. A las 72h ambos grupos presentaron niveles normales de esta población. Esta distribución de monocitos fue determinada por el aumento de la población mayoritaria en circulación, la de monocitos clásicos (cMo, CD14posCD16neg). El balance en las otras dos poblaciones de monocitos vino

determinado por un aumento en la subpoblación de monocitos intermedios o inflamatorios (iMo, CD14^{pos}CD16^{pos}) en los no politrauma respecto a los otros grupos durante los 3 días compensado con la disminución de la subpoblación de los monocitos no clásicos (ncMo, CD14^{dim}CD16^{pos}) en ambos grupos (Fig. 23).

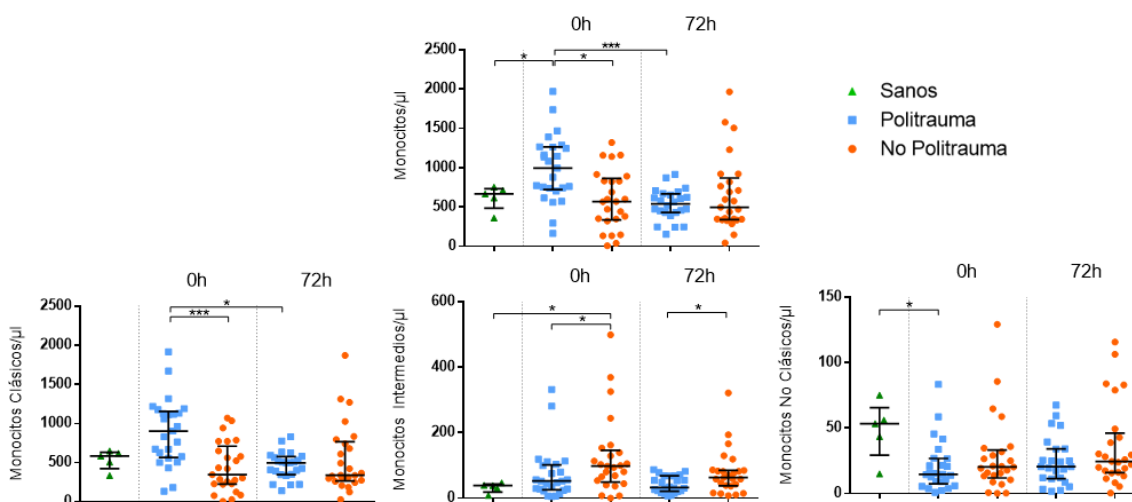


Figura 23. Recuento de poblaciones de monocitos en circulación. p-valor: '*' $\leq 0,05$; '**' $\leq 0,01$; '***' $\leq 0,001$.

Dentro de las subpoblaciones de monocitos clásicos (cMo, determinados por la expresión de los marcadores CD62L/FcεRI) se observó un aumento significativo en la población mayoritaria (CD62L^{pos}FcεRI^{neg}) únicamente en el grupo politrauma. Por otro lado, las poblaciones minoritarias se redujeron en el grupo no politrauma. Por otro lado, todas las subclases de los monocitos no clásicos (ncMo, según la expresión de CD36/Slan) disminuyeron justo después del inicio de SIRS y permanecieron bajos después de las 72h con respecto al grupo control. Sin embargo, estas diferencias solo fueron significativas en las subpoblaciones ncMo CD36^{neg}Slan^{neg} y CD36^{pos}Slan^{neg} (solo en las muestras del grupo politrauma).

A diferencia de la población de monocitos, otras células claves en la presentación de antígenos y en la activación del sistema inmune adaptativo son las células dendríticas (DCs), las cuales disminuyeron tras el inicio del SIRS (Fig. 24). Siguiendo la misma tendencia que las DCs, las DC AxI^{pos} (células precursoras de las DCs) también se vieron reducidas por debajo de los niveles normales desde el inicio del SIRS. La población de DCs más abundante son aquellas de origen mieloide (mDCs) seguida por las DCs plasmocitoides (pDCs). Ambas disminuyeron de forma más aguda en los pacientes del

grupo no politrauma (Fig. 24). Dentro de los pacientes politrauma se observó una alta heterogeneidad en el recuento de las pDCs. Estos niveles se mantuvieron bajos incluso pasadas 72h desde el inicio del SIRS. Este mismo perfil de evolución se observó en el resto de las subpoblaciones de las mDCs (según la expresión de CD5/CD14) y las CD141^{POS}.

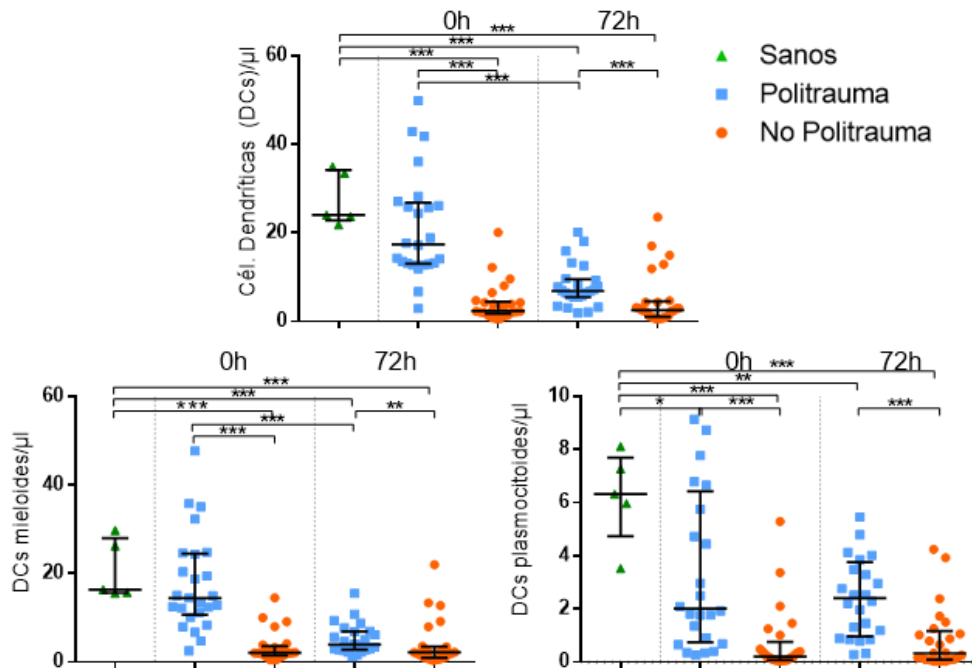


Figura 24. Recuento de subclases de células dendríticas y las subclases. p-valor: ‘*’ $\leq 0,05$; ‘**’ $\leq 0,01$; ‘***’ $\leq 0,001$.

Las células supresoras derivadas de mieloides (MDSCs) claves en la regulación de la inflamación aumentaron en las primeras horas en el grupo politrauma con respecto a los valores del grupo sano y recuperaron los valores basales al cabo de las 72h (Fig. 25). En el caso de los pacientes no politrauma los niveles de la población de MDSCs no variaron en las primeras horas, aunque pasadas 72 horas fueron superiores a los de los pacientes politrauma y los sujetos sanos.

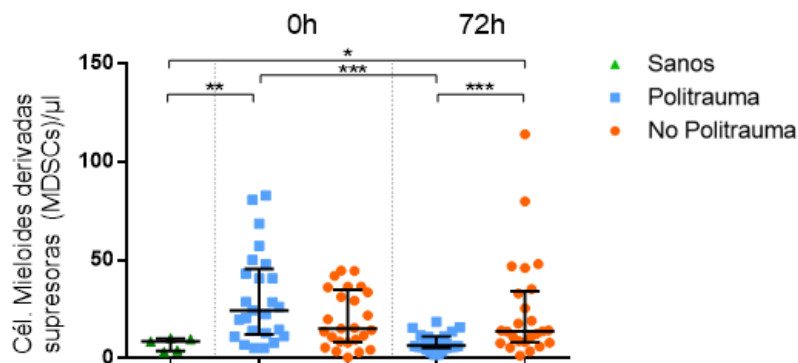


Figura 25. Recuento de células supresoras derivadas mieloides (MDSCs) en pacientes SIRS. p-valor: ‘*’ $\leq 0,05$; ‘**’ $\leq 0,01$; ‘***’ $\leq 0,001$.

5.2.2 Poblaciones leucocitarias linfoides

A pesar del incremento de leucocitos en sangre, la concentración de otras poblaciones se vio muy reducida tras el inicio del SIRS. Un parámetro empleado en la clínica que sirve de referencia para conocer la distribución de las principales poblaciones leucocitarias es la ratio neutrófilo/linfocito. Siguiendo la misma tendencia ya descrita de los neutrófilos, la ratio de la población de neutrófilos con respecto a la de linfocitos se vio incrementada en las muestras del grupo no politrauma, siendo muy heterogénea, seguido por los pacientes politrauma al inicio del SIRS (Fig. 26). Las diferencias se mantuvieron a las 72h para los pacientes no politrauma, aunque la ratio descendió de forma significativa. También se observa que los niveles de linfocitos no se recuperan incluso pasados 3 días en ninguno de los grupos patológicos.

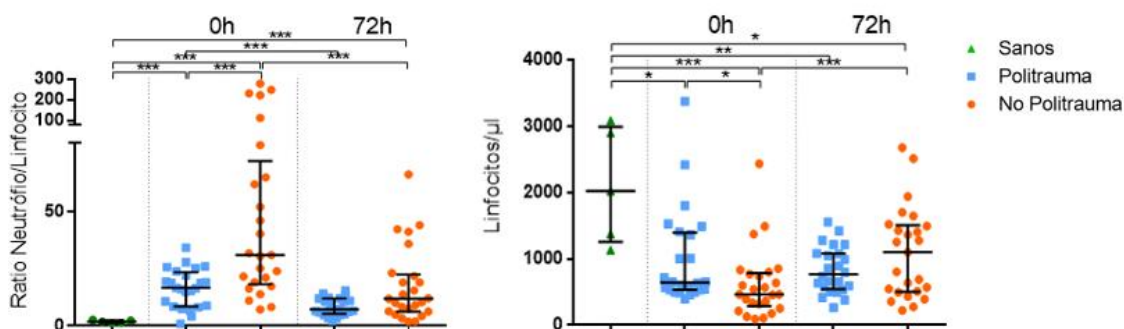


Figura 26. Valores del cociente entre el número absoluto de neutrófilos y linfocitos (Ratio neutrófilos/linfocitos) y los linfocitos en general. p-valor: '*' $\leq 0,05$; '**' $\leq 0,01$; '***' $\leq 0,001$.

Esta reducción en las poblaciones linfocitarias durante el SIRS se debió principalmente al descenso agudo de poblaciones de linfocitos T, aunque también, en menor medida por cambios de las poblaciones de linfocitos B y NK. Todas las subpoblaciones de células T identificadas con la estrategia de análisis descrita para el tubo LST ($CD4^{pos}CD8^{neg}$, $CD4^{neg}CD8^{pos}$, $CD4^{neg}CD8^{neg}TCR\gamma\delta^{pos}$, $CD4^{neg}CD8^{neg}TCR\gamma\delta^{neg}$) disminuyeron desde el inicio del SIRS (similar en ambos grupos) (Fig. 27). En ambos grupos patológicos las poblaciones de linfocitos T se mantuvieron por debajo de los niveles normales en el rango de tiempo de estudio.

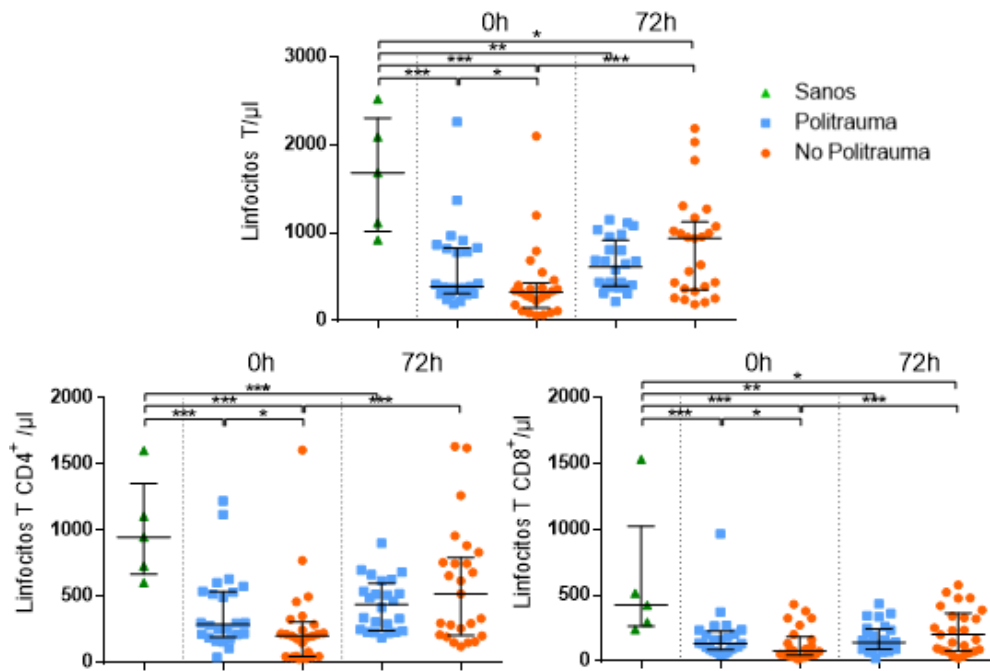


Figura 27. Recuento absoluto de las subpoblaciones de linfocitos T. p-valor: ‘*’ $\leq 0,05$; ‘**’ $\leq 0,01$; ‘***’ $\leq 0,001$.

Los linfocitos B claves en la respuesta adaptativa con capacidad de presentar antígenos y producir anticuerpos en su forma madura (células plasmáticas) se redujeron en ambos grupos patológicos (Fig. 28). La ratio de subpoblaciones de células B Lambda/Kappa se mantuvo estable en los pacientes SIRS. A diferencia de los linfocitos B, las células plasmáticas aumentaron después de 72h en el grupo de pacientes no politrauma como respuesta al agente infeccioso.

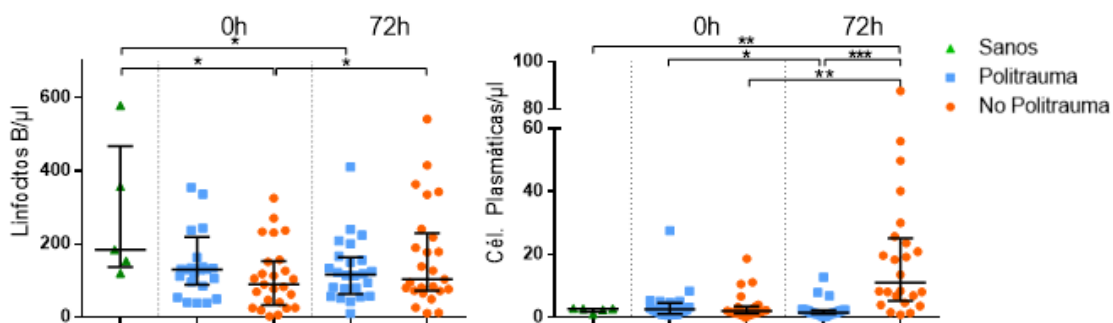


Figura 28. Recuento de linfocitos B y células plasmáticas. p-valor: ‘*’ $\leq 0,05$; ‘**’ $\leq 0,01$; ‘***’ $\leq 0,001$.

Con respecto a las células NK, éstas presentaron un descenso al cabo de 72h en ambos grupos SIRS (Fig. 29). Las subpoblaciones de NK dependiendo de la expresión de CD56 (a menor expresión de este marcador mayor es la producción de perforinas y menor IFN γ), se observó una tendencia similar a la descrita de la población general de células NK en ambos grupos de SIRS.

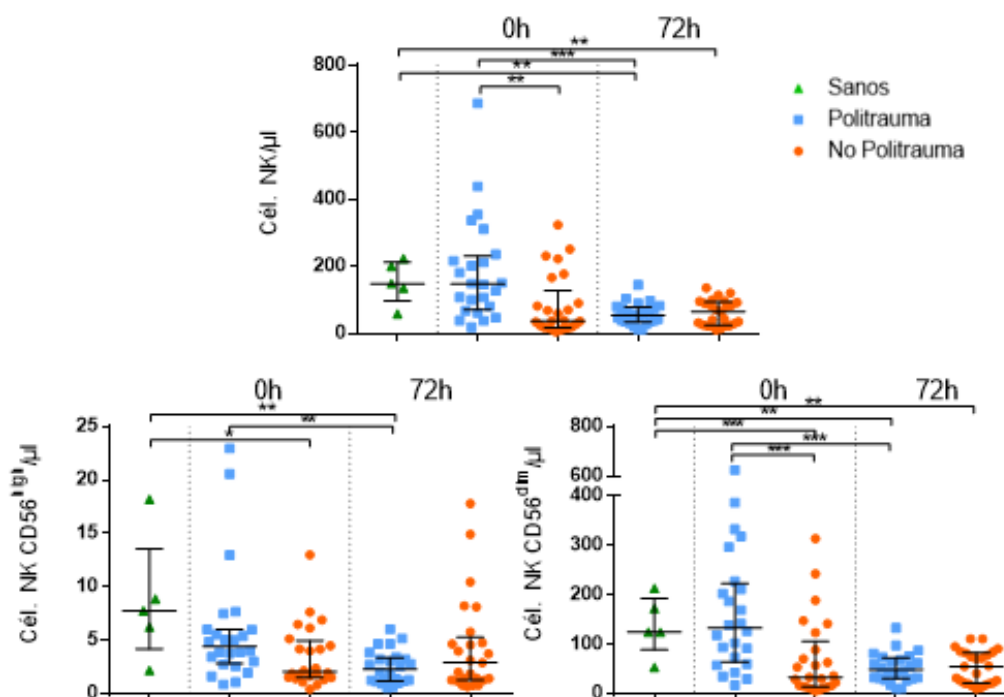


Figura 29. Subclases de células NK identificadas y cuantificadas mediante citometría de flujo. p-valor: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Por último, en la Fig. 30, se observa como los pacientes SIRS se separan bien en dos grupos definidos según el perfil de células analizadas por citometría de flujo. Por lo tanto, la movilización leucocitaria viene condicionada por el tipo de lesión originaria del SIRS.

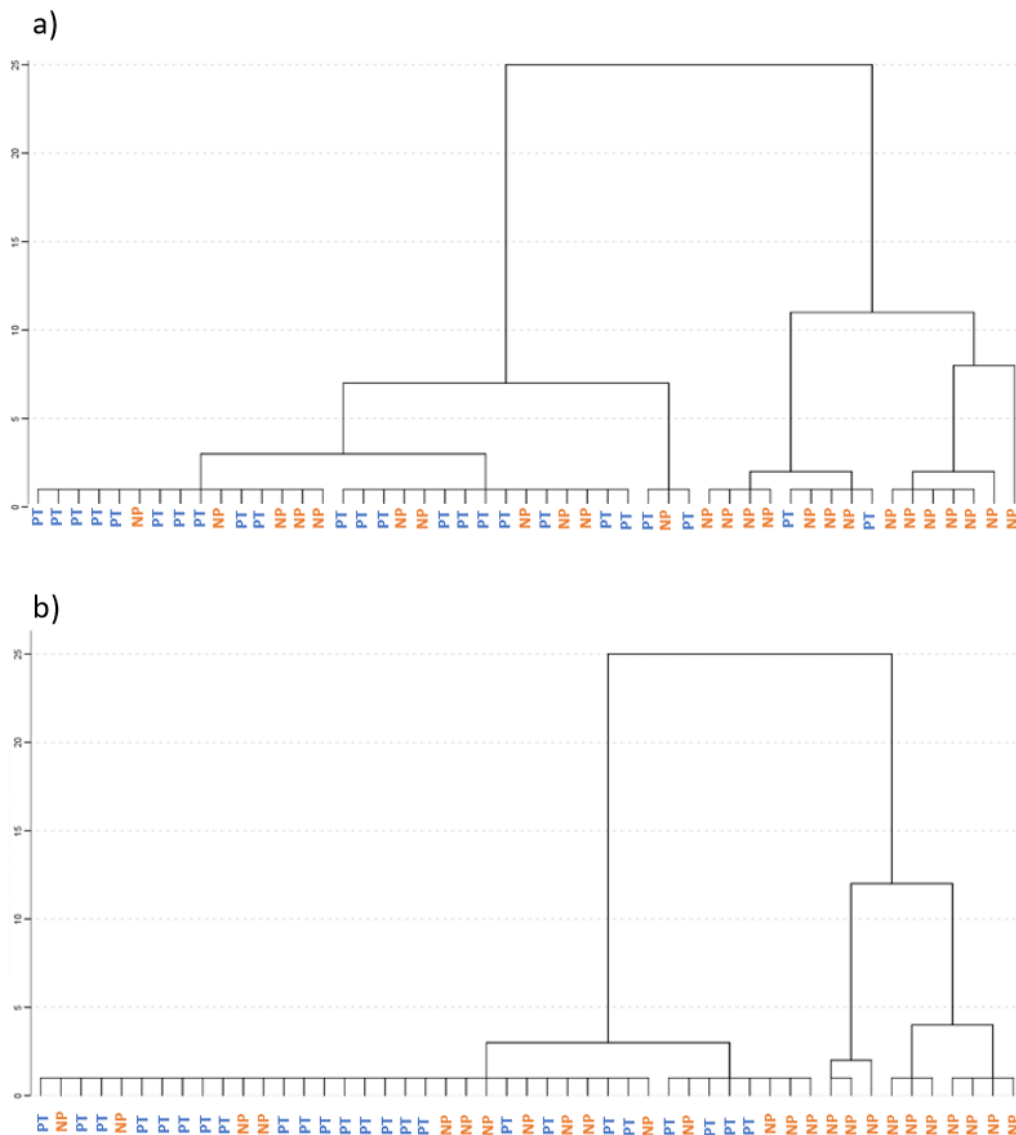


Figura 30. Agrupación no supervisada (dendrograma) de las muestras SIRS según los resultados obtenidos del estudio de poblaciones leucocitarias por citometría de flujo a las a) 0h y b) 72h del inicio del SIRS. Se observa como existe una separación entre las muestras con SIRS derivado de un politrauma (PT, azul) de aquellas que proceden de pacientes con SIRS derivado de otro origen (NP, naranja) en función de las principales poblaciones leucocitarias estudiadas (neutrófilos, eosinófilos, basófilos, monocitos, células dendríticas, linfocitos T, B y células NK).

5.2.3 Células progenitoras hematopoyéticas y células mesenquimales circulantes

Los pacientes politrauma presentaron mayor número de HSC a las 0h que los pacientes no politrauma (Fig. 31). Sin embargo, con el tiempo se normalizó la concentración de esta población en circulación para los dos grupos.

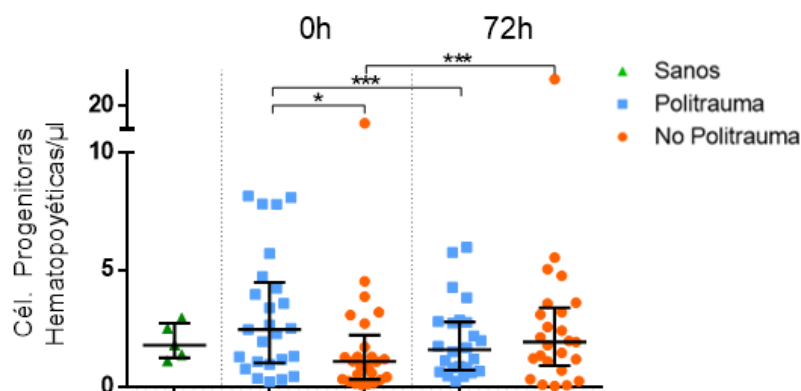


Figura 31. Cuantificación de células progenitoras hematopoyéticas en circulación. p-valor: '*' $\leq 0,05$; '**' $\leq 0,01$; '***' $\leq 0,001$.

Con respecto a las MSCs circulantes se observó un incremento en pacientes con politrauma a las 0 horas (Fig. 32), que se normalizó 72h. Por otro lado, las muestras de origen no politrauma siguieron una tendencia de crecimiento desde el inicio del SIRS con una mayor proporción con respecto al grupo control pasadas las 72h. Entre los dos grupos SIRS no hubo diferencias significativas en ninguno de los tiempos de estudio.

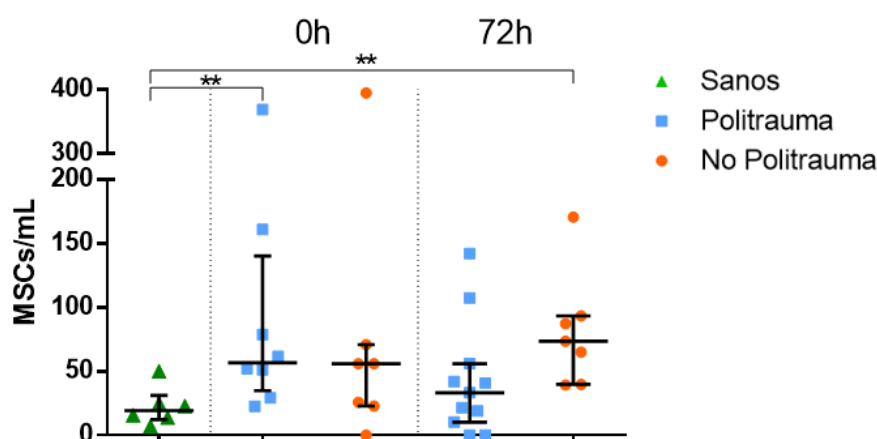


Figura 32. Resultados de la cuantificación de células con perfil mesenquimal en circulación en pacientes SIRS (politrauma y no politrauma) con respecto a los de sujetos sanos. p-valor: '*' $\leq 0,05$; '**' $\leq 0,01$; '***' $\leq 0,001$.

5.2.4 Análisis de expresión (MFI) de marcadores de actividad celular

Además de identificar y cuantificar las células circulantes a distintos tiempos desde el inicio del SIRS, se estudió la expresión de algunos marcadores de membrana que son informativos sobre el estado de activación o de respuesta celular. El HLA-DR, el cual está presente de forma basal en las células presentadoras de antígenos (monocitos, DCs y los linfocitos B), juega un papel clave en el control de la respuesta adaptativa. En la población de monocitos se observó una reducción de este marcador desde el inicio del SIRS siendo de forma más acusada en el grupo de pacientes no politrauma (Fig. 33). Por

otro lado, hubo un aumento de expresión de este marcador en la población de linfocitos B en las primeras horas tras el politrauma.

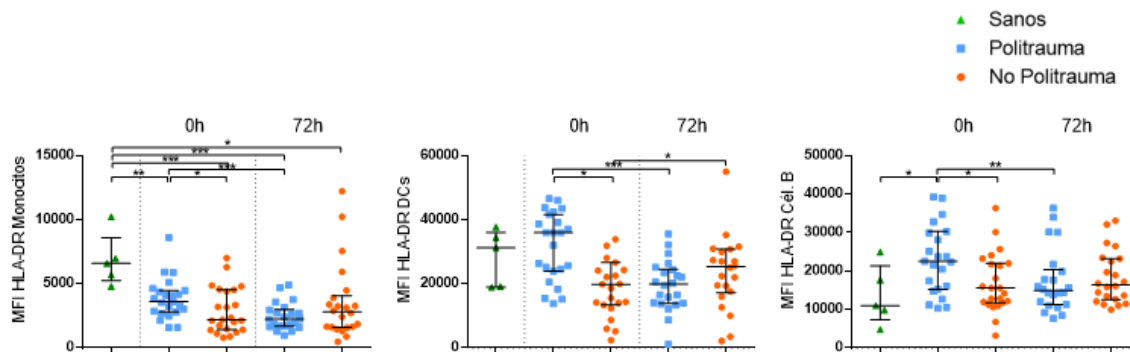


Figura 33. Expresión (MFI) del marcador HLA-DR en poblaciones presentadoras de antígenos. La proteína HLA-DR se presenta en condiciones basales en las poblaciones de monocitos, DCs y linfocitos B.

Otro marcador estudiado fue el CD62L, que aumentó en la mayoría de las células leucocitarias en ambos grupos de SIRS (de forma similar) y se mantuvieron en valores similares pasadas las primeras 72 horas (Fig. Suple. 4). En cambio, en las poblaciones leucocitarias adaptativas (células T y B), el aumento de expresión del marcador CD62L fue progresivo alcanzándose los valores superiores al cabo de las 72 horas.

5.3 Concentración de citocinas en plasma sanguíneo

5.3.1 Citocinas involucradas en inflamación

La concentración en plasma de la mayoría de las citocinas estudiadas fue mínima o nula (por debajo del límite de detección) en condiciones basales (sujetos sanos), y solo fueron detectables en los casos SIRS. La concentración de algunas citocinas fue indetectable en determinadas muestras (de ambos grupos SIRS), por lo que se les asignó el valor del límite de detección (valor de referencia) de la técnica indicado por la casa comercial. Los resultados indicaron que el pico máximo de mayor concentración de citocinas se presentó a las 0 horas del SIRS en ambos grupos patológicos. (Fig. Suple. 5-8). La evolución de la concentración de las moléculas detectadas fue similar en los casos patológicos, con un descenso desde el inicio del SIRS hasta las 72 horas, donde se recuperaron los niveles basales en la mayoría de las moléculas estudiadas.

Algunas citocinas como la IL-2, IL-12, CXCL1/GRO α , CCL3 o el GM-CSF solo fueron detectadas en un porcentaje reducido de muestras del grupo no politrauma a las 0h, y en menor número de casos del grupo politrauma (no presentaron diferencias

significativas entre los grupos). En la Fig. 34 se presenta la concentración a las 0 horas de las citocinas involucradas en el inicio de la señalización de alarma y promotoras de la inflamación. En la mayoría de los casos esta señalización fue superior en ambos grupos SIRS, pero siendo mayor en los pacientes no politrauma.

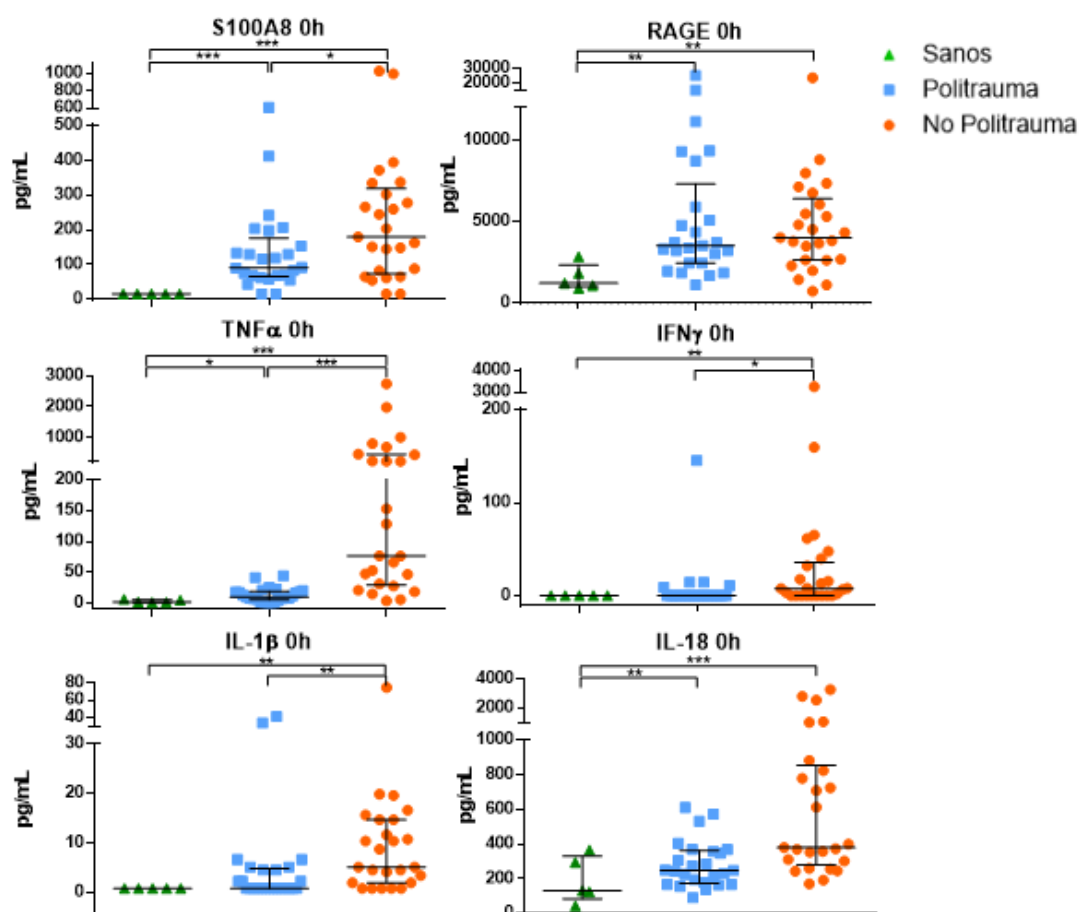


Figura 34. Concentración plasmática de proteínas de fase aguda e inflamatorias en las 0 horas del SIRS en comparación con los de sujetos sanos. p-valor: '*' $\leq 0,05$; '**' $\leq 0,01$; '***' $\leq 0,001$.

Siguiendo la misma tendencia que las citocinas proinflamatorias, la concentración de las interleucinas IL-6, IL-10 e IL-4 (función reguladora en procesos inflamatorios) a las 0 horas aumentó en los casos SIRS con respecto al grupo control (Fig. 35). Además, fueron los pacientes no politrauma los que presentaron una concentración superior de las citocinas antiinflamatorias IL-4 e IL-10. Ambos grupos SIRS presentaron una mayor concentración de IL-6 e IL-10 con respecto al grupo control.

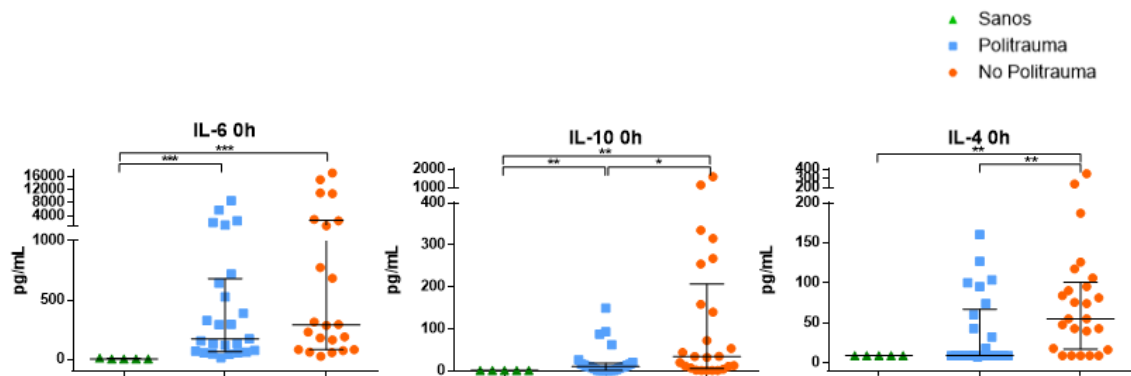


Figura 35. Concentración plasmática de proteínas involucradas en el control de la inflamación tras el inicio del SIRS en comparación con los de sujetos sanos. p-valor: '*' $\leq 0,05$; '**' $\leq 0,01$; '***' $\leq 0,001$.

5.3.2 Quimiocinas y moléculas involucradas en la migración celular

Referente a las quimiocinas involucradas en la movilización y reclutamiento leucocitario, se observó un aumento significativo de la concentración plasmática de las moléculas IL-8, CCL2 o CCL4 con respecto al grupo control a las 0 horas en ambos grupos (Fig. 36). Esta última citocina además fue superior en el grupo de pacientes no politrauma. Por otro lado, solo en los pacientes politrauma se observó una mayor concentración de MIF con respecto al grupo sano.

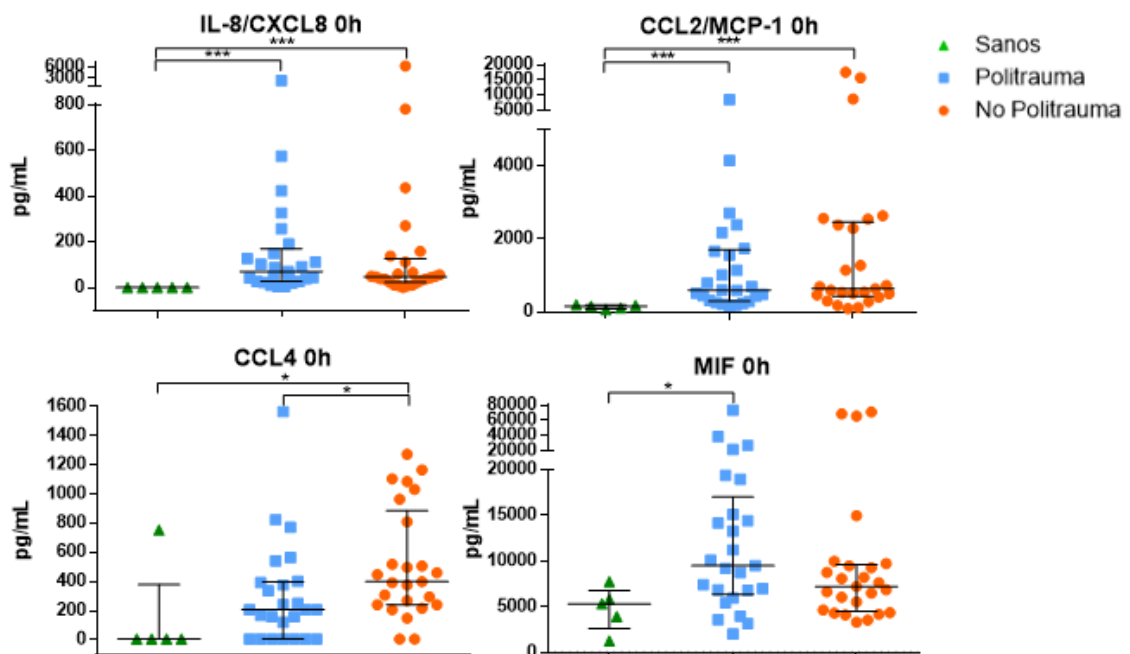


Figura 36. Concentración plasmática de quimiocinas en las primeras horas del SIRS en comparación con los de sujetos sanos. p-valor: '*' $\leq 0,05$; '**' $\leq 0,01$; '***' $\leq 0,001$.

5.3.3 Otras moléculas implicadas en comunicación y regulación intercelular

Respecto a otros factores como el M-CSF y VEGF fueron altamente expresados en ambos grupos SIRS a las 0 horas (Fig. 37). La concentración de FasL siguió una cinética inversa fue significativamente menor en los pacientes no politrauma con respecto a los politrauma a las 0h.

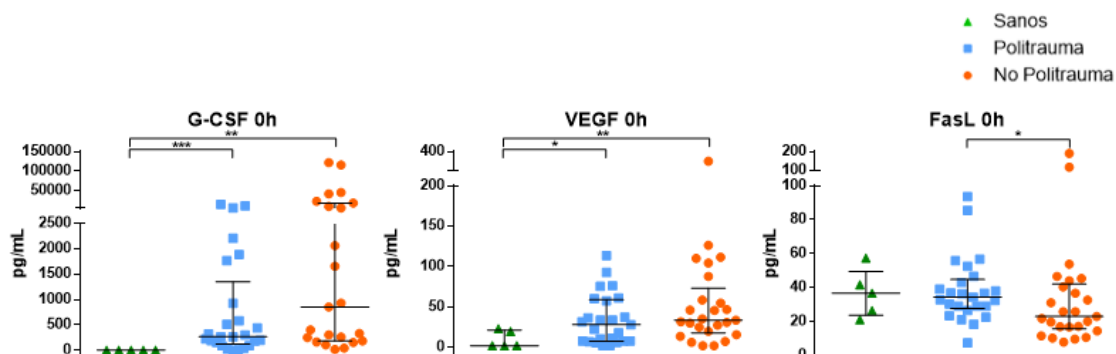


Figura 37. Concentración plasmática de factores de crecimiento y de regulación de la actividad celular en las primeras horas del SIRS en comparación con los de sujetos sanos. p-valor: '*' $\leq 0,05$; '**' $\leq 0,01$; '***' $\leq 0,001$.

5.4 Relación de los valores de laboratorio con la clínica y evolución de los pacientes SIRS

5.4.1 Relación de variables y subagrupación

A través del análisis de correlación de todas las muestras SIRS se estudió el grado de relación entre las variables clínicas y los resultados de laboratorio. Esta estrategia permitió identificar potenciales relaciones entre todas las variables estudiadas como se observa en la Fig. 38. A pesar de existir una correlación entre múltiples variables con significación estadística ($p\text{-valor} \leq 0,05$), no se observaron relaciones muy determinantes ($R^2 \geq 0,7$ o $R^2 \leq -0,7$) entre las variables de pronóstico (o de evolución de los pacientes) como APACHE II, SOFA o días de hospitalización; con las poblaciones leucocitarias, citocinas y marcadores clínicos estudiados.

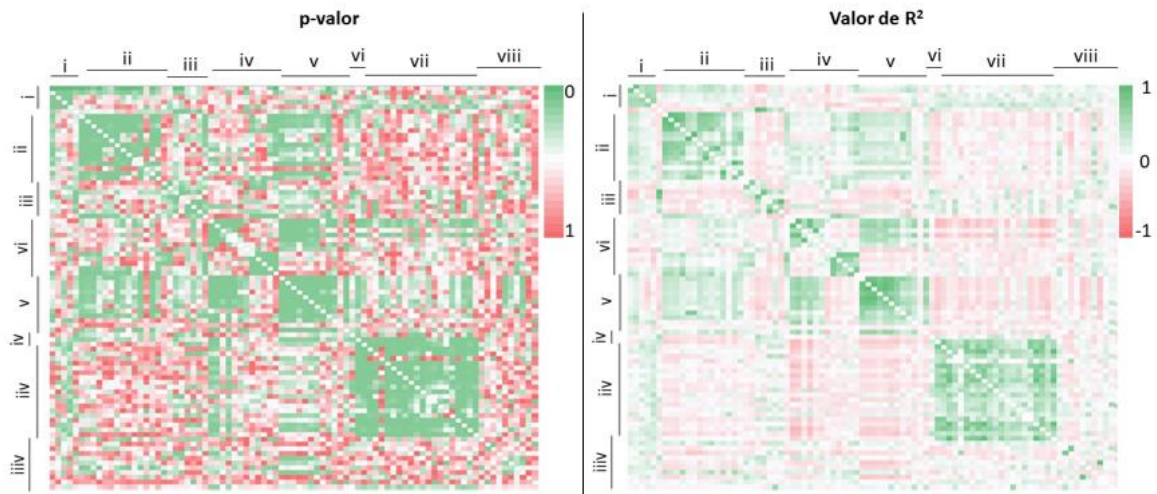


Figura 38. Mapas de calor del análisis de correlación de las variables de estudio a las 0 horas de todos los pacientes SIRS. El gráfico de la izquierda representa el grado de significación de la correlación, indicándose en verde más oscuro aquellas correlaciones que son significativas estadísticamente ($p\text{-valor} \leq 0,05$). El gráfico de la derecha representa el grado de relación que existe entre dos variables, cuanto más cercano a 1 mayor es la relación positiva (verde), y cuanto más próximo a -1 mayor es la relación inversa (rojo). Las variables se agrupan siendo: i) Escalas de riesgo y días de hospitalización, ii) recuento de poblaciones linfocitarias, iii) eosinófilos, neutrófilos y basófilos, iv) poblaciones monocíticas, v) poblaciones de células dendríticas, vi) MDSCs y células progenitoras hematopoyéticas, vii) citocinas y viii) marcadores clínicos (lactato, creatinina, glucosa, etc.). Este tipo de análisis permite identificar agrupaciones o clusters de variables que pueden estar relacionadas.

Para comprobar cómo era la distribución de las correlaciones dentro de cada uno de los grupos SIRS, se repitió el mismo análisis de correlación lineal bivariado (Fig. Suple. 9). La correlación de los resultados de pacientes politrauma tampoco mostró relaciones relevantes entre los valores clínicos de evolución y otras variables de estudio (Fig. Suple. 9a). Referente al grupo no politrauma, este mostraba unas agrupaciones más definidas que el grupo politrauma. Sin embargo, tampoco se identificaron potenciales relaciones. Ejemplo de una correlación más definida fue la de la concentración de la citocina MIF, la cual presentó cierta relación positiva ($R^2 \approx 0,6$) con los sistemas de puntuación APACHE II y SOFA 72 horas (Fig. 39).

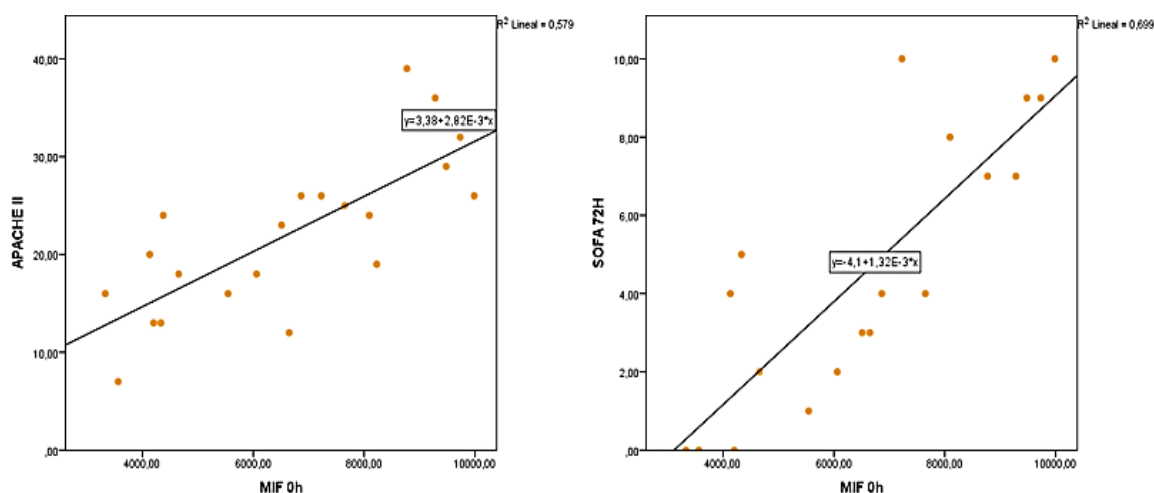


Figura 39. Representación de la correlación dentro del grupo de muestras no politrauma entre los sistemas de puntuación APACHE II (al ingreso) y SOFA a las 72h desde el inicio del SIRS con la citocina MIF.

Con el fin de profundidad en el análisis, se observó que dentro de los grupos politrauma, los pacientes se separaban en dos subgrupos según el valor de algunas variables. Esto mismo ocurría con el grupo no politrauma. En la Tabla 8 se recogen los ejemplos más significativos y las variables que tienen una relación de expresión durante la comparación de los subgrupos (según el punto de corte de la variable de agrupación). Ejemplo de ello es el punto de corte para la citocina G-CSF a una concentración de plasma de 500 pg/mL a las 0 horas. Este tipo de análisis permitió identificar patrones y relaciones entre variables a partir de diferencias o similitudes dentro de cada grupo.

De manera general se puede concluir que en aquellos pacientes en los que la concentración plasmática de citocinas como IL-6, G-CSF o CCL3, puede provocar un aumento en los niveles de otras moléculas. Más concretamente en los pacientes no politrauma, un aumento en la concentración de citocinas podría relacionarse con un mayor valor de APACHE II (riesgo de mortalidad) y con una mayor afectación orgánica (SOFA) a distintos tiempos desde el inicio del SIRS.

Tabla 8. Análisis comparativo de diferentes subgrupos generados a partir de una variable.

Pacientes incluidos	Variable de agrupación (punto de corte)	Variables diferencialmente expresadas entre los subgrupos generados
Politrauma		
	CCL3 (50 pg/ml)	APACHE II, HSC, Neutrófilos, TNF α , IL-18, Urea, PCT
	G-CSF (500 pg/ml)	CD4 ^{neg} CD8 ^{pos} , iMo, pDCs, TNF α , IL-6, IL-8, IL-10, CCL2, CCL4, IL-2, IL-4, IL-18, Bilirrubina, Creatinina
	TCE (Sí/No)	SOFA 0h, Basófilos, ncMo, pDCs, Neutrófilos, Plaquetas
	ISS	Días UCI (p-valor: 0,06), eosinófilos, pDCs
No Politrauma		
	TNF α (200 pg/ml)	IL-6, IL-10, CCL2, IFN γ , CCL3, CCL4, IL-2, G-CSF, IL-12 IL-4
	IL-6 (1000 pg/ml)	Linfocitos, Linfocitos T, CD4 ^{pos} CD8 ^{neg} , Linfocitos B, TNF α , IL-8, IL-10, CCL2, IL-1 β , CCL3, CCL4, IL-2, G-CSF, IL-12, IL-4
	IL-18 (600 pg/ml)	SOFA 24h, SOFA 48h, Linfocitos, Linfocitos T, CD4 ^{pos} CD8 ^{neg} , Linfocitos B, Células NK, HSC
	IL-10 (100 pg/ml)	SOFA 72h, Linfocitos B, iMo, DCs, TNF α , IL-6, CCL2, CCL3, CCL4
	IL-4 (40 pg/ml)	Monocitos, cMo, TNF α , IL-6, IL-8, IL-10, CCL2, IL-1, CCL4, RBC
	CCL4 (600 pg/ml)	SOFA 24h, SOFA 48h, SOFA 72h, SOFA 120h, Linfocitos, Linfocitos T, CD4 ^{pos} CD8 ^{neg} , CD4 ^{pos} CD8 ^{neg} , Linfocitos B, TNF α , IL-6, IL-8, IL-10, IFN γ , CCL2, CCL3, CCL4, IL-2, G-CSF, IL-12, IL-4, IL-18
	CCL3 (50 pg/ml)	SOFA 24h, SOFA 72h, Linfocitos, Linfocitos T, CD4 ^{pos} CD8 ^{neg} , ncMo, DCs, TNF α , IL-6, IL8, IL-10, IFN γ , CCL3, CCL4, FasL, IL-2, G-CSF, IL-4
	G-CSF (500 pg/ml)	Eosinófilos, Neutrófilos inmaduros, TNF α , IL-6, IL-8, IL-10, CCL2, IL-1 β , CCL3, CCL4, IL4
	APACHE-II (22)	SOFA 0h, SOFA 24h, SOFA 48h, SOFA 72h, Linfocitos T, CD4 ^{pos} CD8 ^{neg} , MDSCs, IL-10
	Neutrófilos (2x10 ⁴ / μ L)	Días Hospital
	Días UCI (5)	Días Hospital, APACHE II, SOFA 24h, SOFA 48h, SOFA 72h, Linfocitos, Linfocitos T, CD4 ^{neg} CD8 ^{pos} , IL-8, MIF
	SOFA 72 horas (4)	Días UCI, APACHE II, SOFA 0h, SOFA 24h, SOFA 48h, SOFA 96h, SOFA 120h, HSC, IL8, S100A8, IL-10, RAGE, MIF, G-CSF, lactato, bilirrubina

Nota: Estos subgrupos son determinados por la distribución de las muestras en dos grupos en función de una variable (punto de corte). Las variables estudiadas corresponden al tiempo 0 horas desde el inicio del SIRS, salvo que se especifique el tiempo de estudio (Ej. SOFA 72h). Los puntos de corte se seleccionaron de manera visual cuando la distribución de las muestras en dos subgrupos estaba muy definida o mediante el análisis por curva ROC (se detalla más adelante).

Siguiendo esta estrategia también se planteó el estudio de variables que pudieran predecir si los pacientes politraumatizados podían desarrollar una infección tras su ingreso en la UCI. En la Fig. 40 se observan los marcadores que se expresaron diferencialmente entre los subgrupos que presentaron o no una infección en los días posteriores al inicio del SIRS.

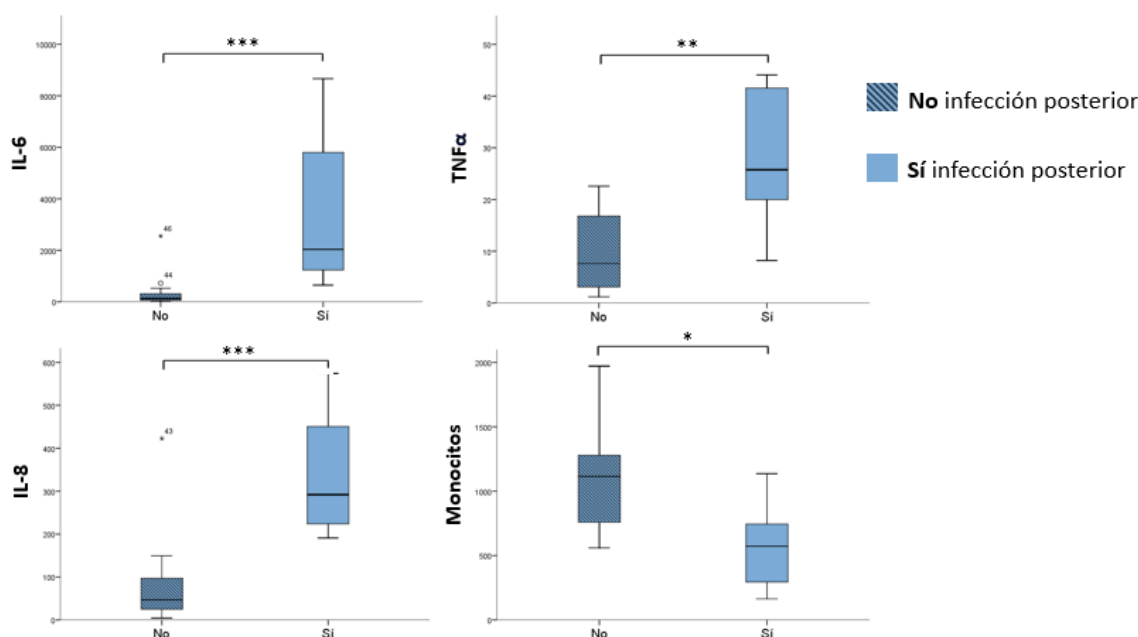


Figura 40. Marcadores predictores de infecciones en pacientes SIRS derivados de un politraumatismo. El grupo 'No' son aquellos pacientes politrauma que no presentaron infección, mientras que el grupo "Sí" son los pacientes que presentaron una infección tras su ingreso en la UCI.

5.4.2 Potenciales marcadores de pronóstico

Con una idea más definida de la distribución de las variables de los grupos SIRS, se continuó el estudio para la identificación de biomarcadores de pronóstico a través de modelos de curva ROC (*Receiver Operating Characteristic*, modelo de clasificación binaria), modelos de supervivencia de Kaplan-Meier y modelos de regresión lineal. Algunas variables como el APACHE II (empleado en clínica para estimar la supervivencia) y el SOFA al inicio del SIRS fueron marcadores altamente discriminativos para el estudio de la supervivencia obteniendo en el análisis un AUC (área bajo la curva) de 0,81 y 0,69, respectivamente (Fig. 41). De la misma manera el recuento de MDSCs y la citocina IL-8 presentaron un AUC de 0,84 y 0,74, alcanzando niveles similares a los sistemas de puntuación empleado en la clínica. Respecto al daño multiorgánico al cabo de 72 horas desde el inicio del SIRS, se observó también que las variables APACHE II y SOFA 0h presentaban un AUC alto (0,79 y 0,82 respectivamente). Además, con este análisis se ha podido confirmar que la concentración de las citocinas RAGE y MIF también pueden servir para estimar el valor de daño multiorgánico al cabo de 72 horas.

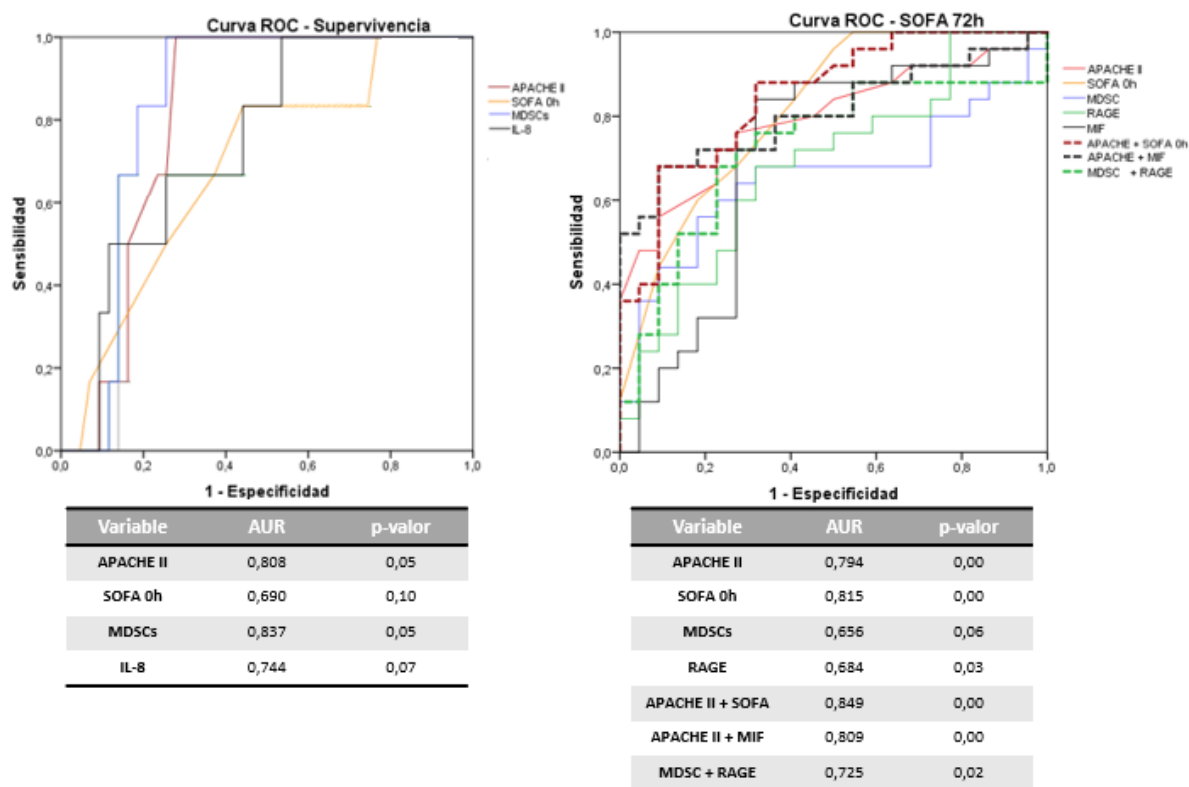


Figura 41. Análisis ROC para el estudio de la supervivencia y fallo multiorgánico (SOFA 72h) tras el SIRS. En este análisis se determina el poder discriminativo de las variables de estudio sobre un variable binaria: supervivencia [Sí / No] o SOFA 72h [≤ 5 / ≥ 5]. AUC: Área Bajo la Curva.

Por otro lado, se observó que la combinación entre los parámetros anteriormente definidos puede mejorar el valor de estimación del pronóstico de los pacientes, como es el caso de la combinación del [APACHE II + MIF] o [MDSCs + RAGE] (Fig. 41).

Con el análisis de curvas ROC se pudieron establecer puntos de corte determinados (según la Sensibilidad y 1 - Especificidad) para cada variable que permitiesen separar los pacientes con mayor riesgo de muerte. Ejemplo de estos valores fue la división en dos grupos de los pacientes con SIRS según el valor de APACHE II \geq o $<$ a 22. Con los análisis de supervivencia por Kaplan-Meier se corroboró que los marcadores como el APACHE II, la población de MDSCs y la concentración de la citocina IL-8 presentaban un alto valor de pronóstico para los pacientes SIRS (Fig. 42).

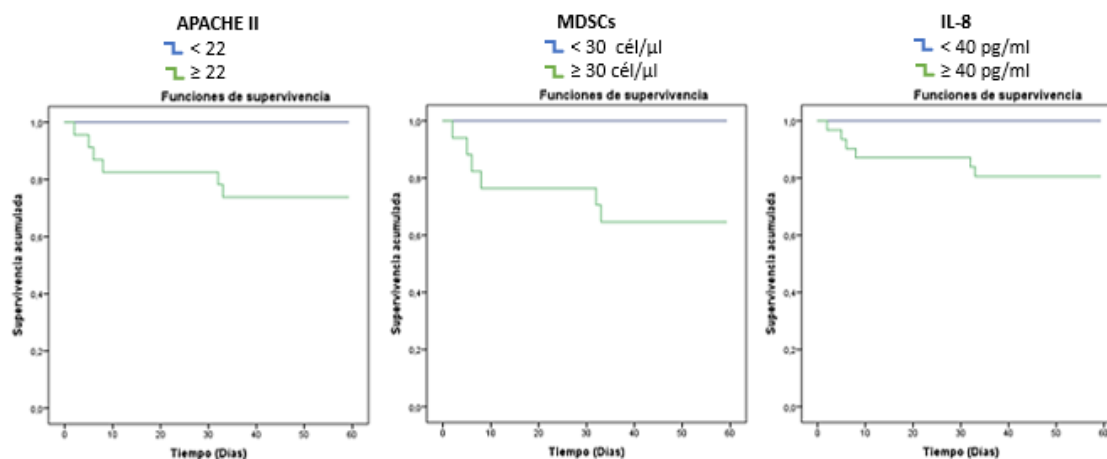


Figura 42. Enfoque de múltiples marcadores para la predicción de la mortalidad tras el inicio del SIRS con todos los pacientes del estudio. Los análisis de Kaplan-Meier muestran que las variables APACHE II (≥ 22), el recuento de MDSC ($\geq 30 \text{cél}/\mu\text{l}$) y la concentración de IL-8 ($\geq 40 \text{pg}/\text{ml}$) pueden ser útiles para la estimación de la mortalidad de los pacientes con SIRS. Cuanto mayor sea la separación entre las líneas, mayor será la capacidad de discriminación.

Los modelos de regresión permitieron conocer cuánto influye una variable sobre otra variable dependiente (inferencia). Este tipo de análisis además de informar sobre la relación de dos o más variables, permitió predecir un valor, una respuesta o un resultado determinado en función de una variable o combinación de varias. Para este proyecto se empleó esta herramienta con el objetivo de establecer modelos matemáticos que predijesen la evolución de los pacientes a partir de los resultados en las primeras horas del ingreso cómo predecir el tiempo de estancia en la UCI. Con el análisis de regresión lineal no se obtuvo una ecuación óptima para predecir la evolución de todos los pacientes del estudio. Se decidió realizar este tipo de análisis de cada grupo SIRS por separado debido a la heterogeneidad existente entre los grupos. En el caso de los pacientes politrauma se observó que el valor de linfocitos T en sangre periférica en el ingreso se relacionó con el tiempo de estancia en la UCI (Fig. 43).

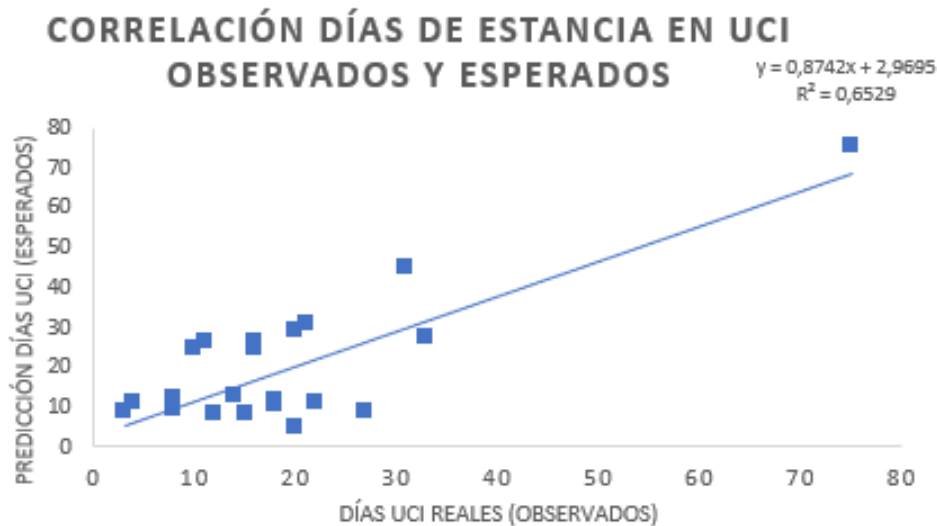


Figura 43. Correlación entre los días de estancia en la UCI (reales) y los esperados de los pacientes politrauma según el modelo de regresión lineal. Siguiendo la ecuación obtenida por este modelo de predicción ($y = -2,503 + 0,034 \times [\text{Linfocitos T}/\mu\text{l}]$) se calcularon los valores esperados y se correlacionaron con los valores obtenidos.

Sin embargo, se repitió esta estrategia estadística para otros parámetros de relevancia clínica como el SOFA a las 72 horas y tiempo de estancia en el hospital de los pacientes politrauma, pero no se obtuvieron variables con alto poder discriminativo. Tampoco se observaron relaciones fuertes en el modelo de regresión lineal para las muestras de pacientes no politrauma por separado.

5.5 Caracterización de las vesículas extracelulares (VEs) y estudio del perfil de microRNAs

5.5.1 Caracterización de las VEs aisladas de plasma

5.5.1.1 Morfología de las VEs

Las partículas aisladas del plasma por ultracentrifugación presentaron una morfología clásica de las vesículas extracelulares (VEs) con forma esférica y una depresión central. En la Fig. 44 se observan imágenes de estas vesículas tomadas con un microscopio electrónico de transmisión a escala nanométrica.

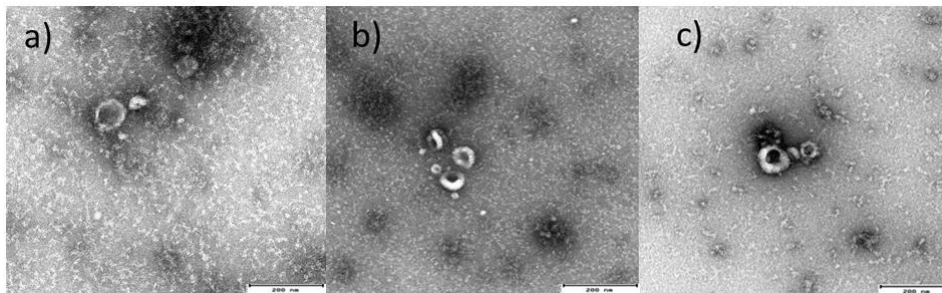


Figura 44. Morfología de las vesículas extracelulares de plasma de a) donante sano, b) paciente politrauma y c) paciente no politrauma.

5.5.1.2 Concentración y tamaño medio de las VEs

Los resultados de la medición de VEs de plasma mediante NTA mostraron un aumento significativo en la concentración de partículas en los pacientes con SIRS respecto a los controles sanos (Fig. 45). Los pacientes de origen no politrauma presentaron una concentración de VEs plasmáticas muy superior a la de los pacientes politrauma. Pasadas 72 horas los niveles de estas partículas en plasma seguían siendo similares a las encontradas tras el inicio del SIRS.

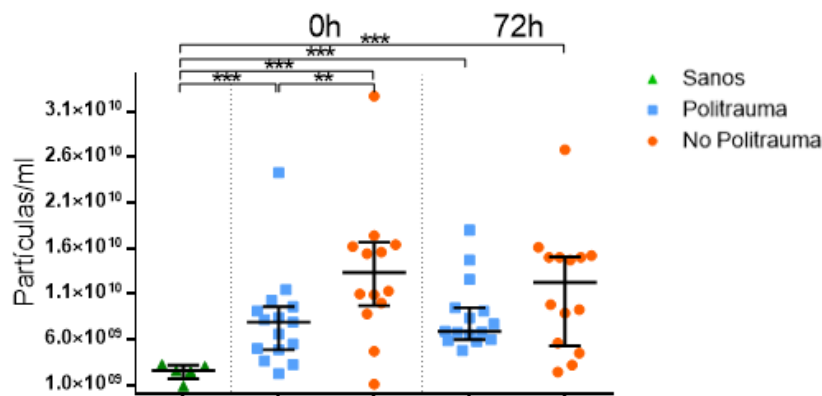


Figura 45. Resultados de la cuantificación mediante NTA de vesículas extracelulares en el plasma en pacientes con SIRS en comparación con los de sujetos sanos. *p*-valor: '*' $\leq 0,05$; '**' $\leq 0,01$; '***' $\leq 0,001$.

Con la tecnología del NTA también se pudo conocer el tamaño medio de las partículas. En todos los casos y tiempos fue similar, con un tamaño cercano a los 180 nm (Fig. 46).

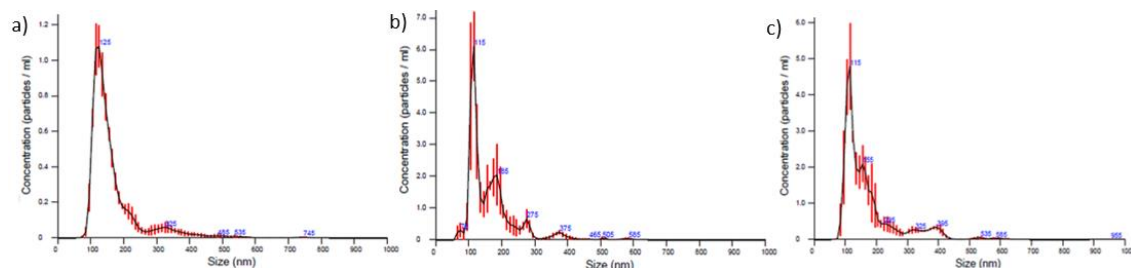


Figura 46. Representación del análisis por NTA de la concentración de VEs plasmáticas y la distribución según el tamaño de las partículas. a) VEs de plasma sano, b) politrauma y c) plasma no politrauma.

5.5.1.3 Expresión de la proteína CD63 en las VEs

Para corroborar que el producto de la ultracentrifugación del plasma correspondía a las VEs, se estudió la presencia de la tetraspanina CD63. Como resultado de este Western Blot, todos los aislados presentaron dos bandas en cada carril pertenecientes a la proteína CD63 simple (banda inferior) y en su estado glicosilado (banda superior) (Fig. 47).

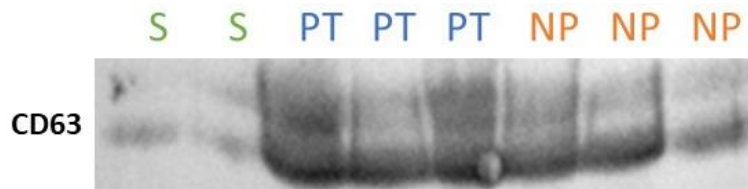


Figura 47. Análisis de presencia de la tetraspanina CD63 por Western Blot en las vesículas extracelulares aisladas de plasma mediante ultracentrifugación. S: sano, PT: politrauma, NP: No politrauma.

5.5.2 Análisis comparativo del contenido en microRNAs de las VEs plasmáticas

5.5.2.1 Agrupación de las muestras según el perfil de microRNAs

El contenido genético de las VEs se analizó empleando un array que permitió conocer la expresión de 377 microRNAs (miRNAs). Tras el análisis de expresión, se observó que las VEs procedentes de plasma de pacientes politrauma tenían un patrón de microRNAs muy similar entre sus muestras (Fig. 48). Del mismo modo, las muestras de sujetos sanos formaron una agrupación separada de los dos grupos SIRS. En el caso de las VEs del grupo no politrauma (diferentes orígenes del SIRS) se observó una mayor dispersión de las muestras según su contenido en miRNAs. Estos resultados indican que el contenido en microRNAs de las VEs plasmáticas fue dependiente de la condición de cada sujeto o paciente.

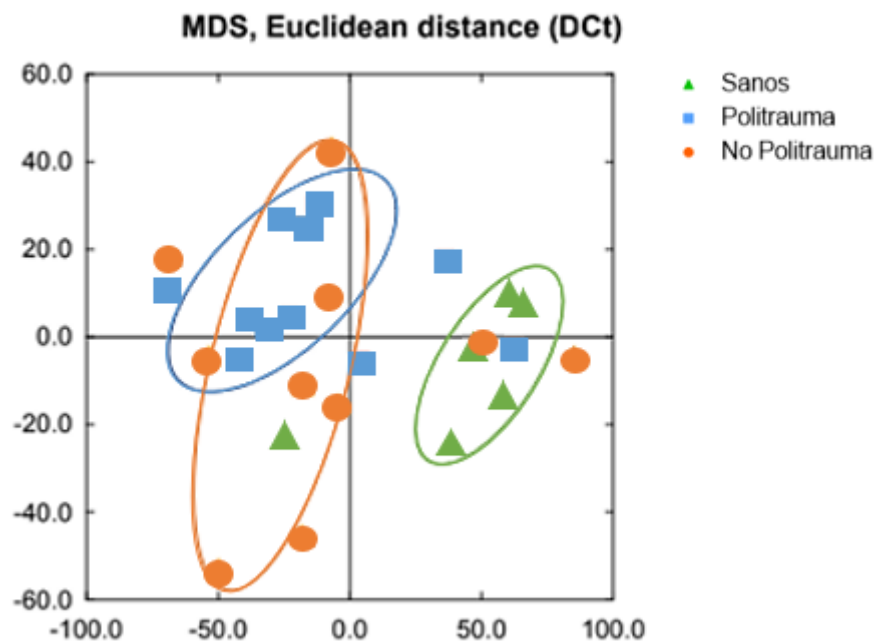


Figura 48. Agrupación de las muestras según el perfil de microRNAs de las vesículas extracelulares de plasma. Cada marca en el diagrama representa un muestra.

5.5.2.2 Análisis de expresión diferencial de los microRNAs entre los grupos

Analizando en detalle cuáles fueron los miRNAs que estaban diferencialmente expresados entre los grupos se encontraron diferencias en la expresión en 125 miRNAs entre el grupo politrauma y el sano, siendo en su mayoría por una infraexpresión en el grupo patológico. Por otro lado, las VEs del grupo no politrauma no presentaron grandes diferencias con respecto al grupo sano ni con el grupo politrauma (Fig. 49).

Debido a la gran cantidad de miRNAs diferencialmente expresados, la búsqueda se redujo a aquellos que presentasen un FC de $[\leq 0,01$ y $\geq 10]$. Con este ajuste los miRNAs diferencialmente expresados entre los grupos se redujo a 17 en la comparativa del grupo sano y el politrauma (Fig. 49). Dentro de este análisis, 4 miRNAs fueron sobreexpresados en el grupo politrauma (Fig. Suple. 10). En el análisis comparativo entre el grupo no politrauma y el de sujetos sanos, solo se encontró el miRNA miR-23b, siendo este infraexpresado en el grupo no politrauma.

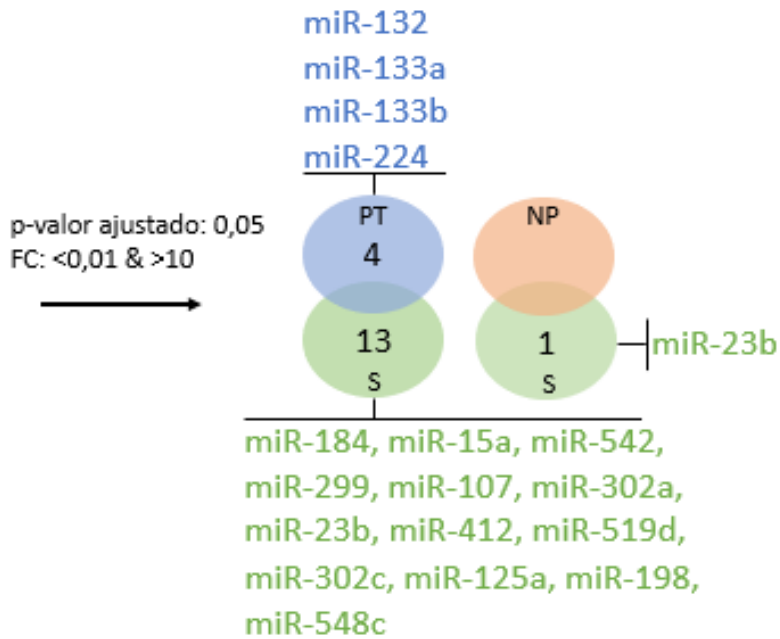


Figura 49. Número y listado de los microRNAs diferencialmente expresados entre los grupos de estudio politrauma (PT), no politrauma (NP) y los sujetos sanos (S). Se indica el número de miRNAs diferencialmente expresados entre cada análisis comparativo con un ajuste de FC de $[\leq 0,01$ y ≥ 10].

5.5.2.3 Papel regulador de los microRNAs más significativos

Para conocer cuál es la implicación biológica de los microRNAs más diferenciados, se realizó una búsqueda en diferentes bases de datos de los genes y vías celulares que pueden ser regulados por los miRNAs diferencialmente expresados entre los grupos (FC de $[\leq 0,01$ y ≥ 10]).

Ejemplo de los genes que son regulados por los miRNAs sobreexpresados en las VEs plasmáticas de pacientes politrauma con respecto al grupo sano se recogen en la Tabla 9. Entre los genes regulados, se destacan algunos como SP1, AKT3 o MAPK1 por estar involucrados en procesos inflamatorios.

Tabla 9. Genes de algunas vías regulados por los microRNAs sobreexpresados en las VEs plasmáticas de pacientes politrauma con respecto a los de sujetos sanos.

Genes regulados por los miRNAs sobreexpresados por el grupo politrauma con respecto al grupo control	Vía/actividad Celular
GSK3B, SMC1A, YWHAH, CCNB1, SMAD2, CCNA2, CDC25B, STAG-2, WEE1, CDK6, ATM , CCND1, E2F5, RBL1, RB1 , EP300, CDKN1A, PRKDC, RAD21, ORC5, MDM2	Ciclo celular
CCNB1, SMAD2, STK4, SIRT1, KRAS , IKBKB, ATM, NLK, PIK3R3, CCND1, PIK3R1, PRKAA1, EP300, AKT3 , SOD2, CDKN1A, PTEN, SGK3, MAPK1 , GRB2, MDM2, BCL2L11	Vía FoxO
GSK3B, YWHAH, YAP1, SMAD2, WNTSA, PPP1CC, ACTG1, AMOT, CDH1, CSNKID, CCND1, CTNNA1, FRMD6, PPP2CB, WNT3A, LATS2, PPP2RIB, CTGF	Vía Hippo
SMAD2, THBS1, ACUR2B, E2F5, SMURF1, RBL1, SMAD5, SP1 , EP300, PPP2CB, MAPK1, PPP2R1B	Señalización por TGFβ
HBEGF, ATF2, CALM1, ATF6B, KRAS, PIK3R3, PIK3R1, PRKX, SP1, AKT3, CREB3L2, HCNJ9, HSPA1B, MAPK1, GRB2	Señalización por estrógenos

Nota: los genes resaltados tienen una función relevante en el control de la activación, señalización, proliferación celular y en la regulación de la inflamación.

Algunas de las principales vías que regulan los microRNAs diferencialmente expresados en las VEs plasmáticas de los pacientes politrauma con respecto al grupo sano son las de migración celular (adhesión focal), ciclo celular (vías de FoxO e Hippo), regulación de la actividad celular (vía de MAPK), señalización intercelular y liberación de TGFβ. Se indican además otras vías relacionadas con procesos cancerígenos y relacionados con la señalización a través de hormonas (Fig. 50).

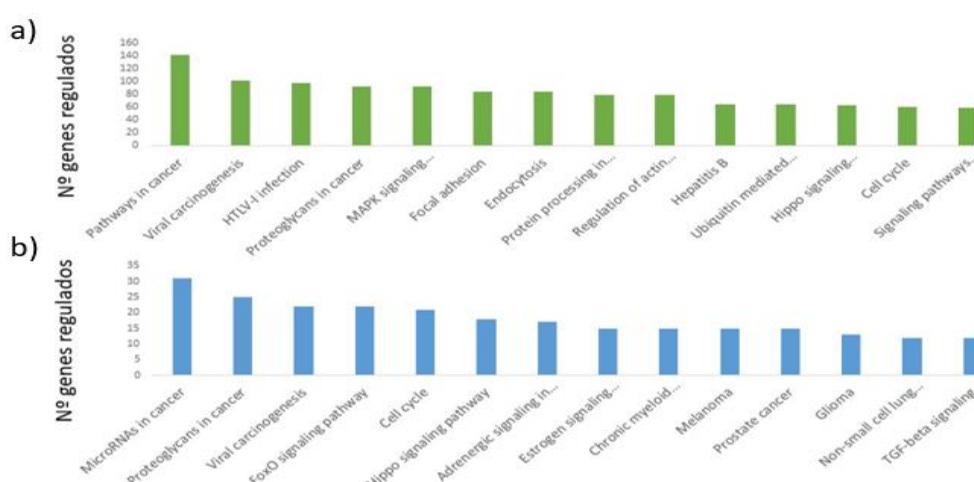


Figura 50. Vías celulares reguladas por los microRNAs diferencialmente expresados en las VEs de plasma de pacientes politrauma con respecto a los de sujetos sanos. a) Función de los genes que son regulados por los microRNAs que estaban infraexpresados en el grupo politrauma con respecto al grupo control. B) Vías pueden regular los microRNAs sobreexpresados en el grupo politrauma. Acceso a mirPath a fecha del 02/2023.

Respecto al miR-23b, infraexpresado en el grupo no politrauma con respecto al sano, se ha visto implicado en la regulación de genes involucrados en la migración celular (uniones adherentes, adhesiones focales, interacción con la matriz extracelular), regulación de la vía de p53, metabolismo y ciclo celular.

5.6 Estudio de diferenciación de macrófagos en diferentes condiciones SIRS

5.6.1 Morfología de los macrófagos en diferentes condiciones de cultivo

Los monocitos durante el cultivo en las diferentes condiciones se diferenciaron y maduraron hacia macrófagos M0 (cultivados con GM-CSF), M1 (con GM-CSF + IFN γ) y M2 (con M-CSF + IL-4).

Respecto al análisis de la morfología, los macrófagos M2 presentaron una forma más alargada que los controles M0 y M1 (Fig. 51). Estas dos últimas condiciones presentaron un número alto de colonias (agregados celulares). Otra diferencia visible entre los controles de estudio fue que en las condiciones M2 había una mayor densidad de células adheridas al plástico con respecto a los otros dos grupos y menor número de colonias.

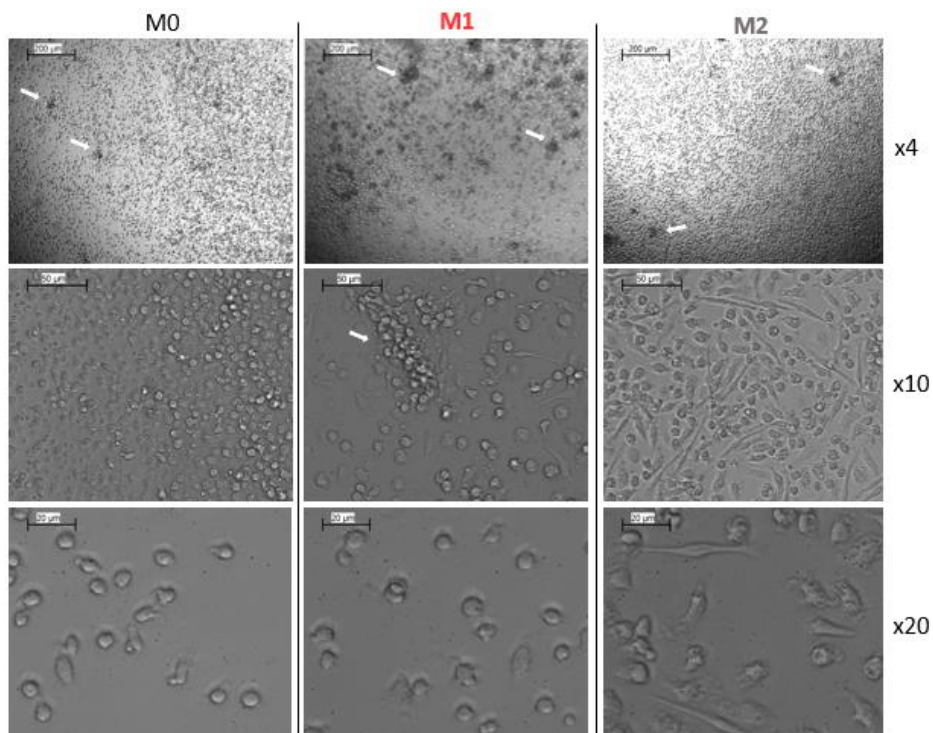


Figura 51. Morfología de los monocitos cultivados y madurados a macrófagos en las condiciones control. Las flechas blancas indican la formación de agregados o colonias celulares.

Con el fin de ver si el plasma de los pacientes provocaba los mismos cambios que con el uso de citocinas estimuladoras, analizamos la morfología tras los 5 días de cultivo con el plasma. A grandes rasgos el origen del plasma no provocó cambios significativos en la morfología y crecimiento de los macrófagos (Fig. 52). Sin embargo, al comparar el plasma a distintos tiempos (0 vs 72h), se observó que los macrófagos madurados con plasma de las 72 horas desde el SIRS presentaron una forma ligeramente más redonda, asemejándose más a la morfología del macrófago M1.

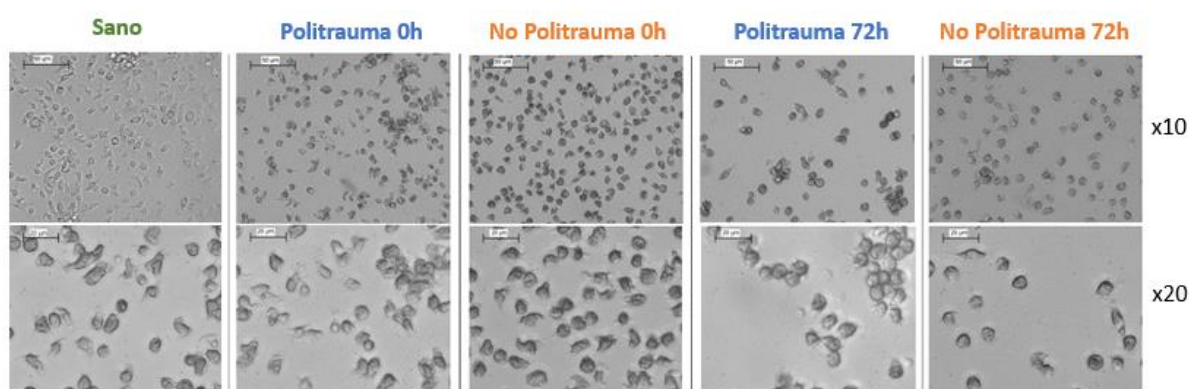


Figura 52. Morfología de los macrófagos crecidos en cultivo con plasma de pacientes politrauma y no politrauma recogidos a las 0 y 72 horas desde el inicio del SIRS.

5.6.2 Inmunofenotipo de los macrófagos

La diferenciación de macrófagos hacia un fenotipo más o menos inflamatorio también se determinó evaluando la expresión (MFI) de diferentes marcadores. El control M0 no mostró un aumento en la expresión de ninguno de los marcadores estudiados con respecto a los otros controles (Fig. 53). El control M1 (proinflamatorio) presentó una expresión alta en el marcador CD64. Por otro lado, el control M2 (antinflamatorio) mostró una expresión alta de los marcadores CD163 y CD206.

Los macrófagos madurados con plasma de pacientes no politrauma presentaron un perfil similar al del control M2 (Fig. 53). Esto se observó con un aumento significativo en el CD163 y una reducción del CD64 y del CD36. Los macrófagos cultivados con plasma de pacientes politrauma mostraron un perfil intermedio entre aquellos crecidos con plasma sano y los no politrauma para la mayoría de los marcadores estudiados. La expresión de otros marcadores estudiados como el CCR7 y el CD80 no varió entre los plasmas ni en los controles estudio. Por otro lado, se estudió el efecto del plasma de las

72 horas sobre el inmunofenotipo de los macrófagos, y se observó que los perfiles se mantenían similares a los de las 0 horas, aunque con un ligero descenso del marcador CD163.

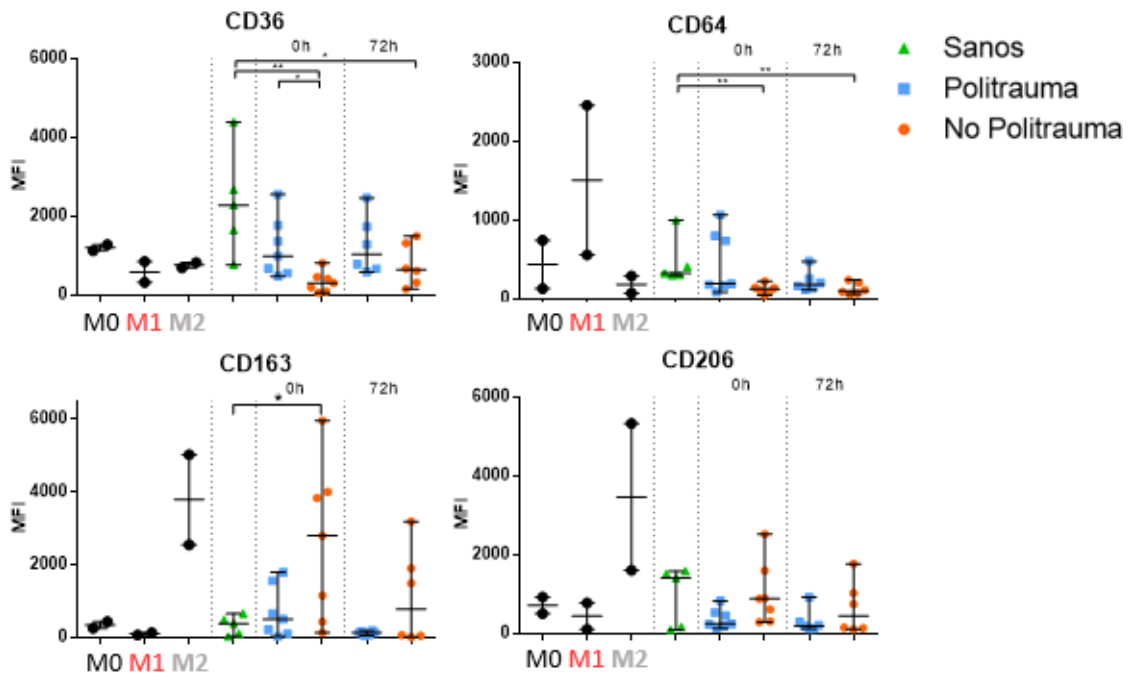


Figura 53. Expresión (MFI) de marcadores de diferenciación de macrófagos a fenotipo M1 y M2 tras el cultivo con plasma. *p*-valor: '*' $\leq 0,05$; '**' $\leq 0,01$; '***' $\leq 0,001$.

5.6.3 Liberación de citocinas de macrófagos en cultivo

Tras el cultivo, el sobrenadante se aisló para analizar la concentración de citocinas involucradas en la inflamación. Los macrófagos cultivados con plasma de paciente no politrauma secretaron gran cantidad de IL-6 únicamente a las 0 horas (Fig. 54). Este resultado solo se obtuvo con el plasma a las 0h y no con el de los mismos pacientes a las 72h. Los macrófagos cultivados con plasma de pacientes politrauma no presentaron mayor secreción de citocinas con respecto al resto de grupos de estudio. El resto de las citocinas evaluadas como la IL-2, IL-10, IL-17, IFN γ y TNF α fue muy baja o no presentaron diferencias entre los grupos.

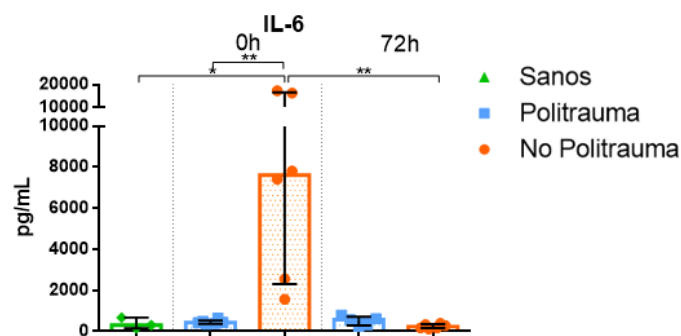


Figura 54. Concentración de la citocina IL-6 tras los cultivos de macrófagos en diferentes condiciones. Se representa la concentración de las citocinas en los cultivos con plasma sano, plasma politrauma y plasma no politrauma. p-valor: '*' $\leq 0,05$; '**' $\leq 0,01$; '***' $\leq 0,001$.

5.6.4 Perfil de expresión genética de macrófagos

Referente a la expresión de genes relacionados con el perfil macrófágico M1 (IDO) y M2 (CD209, CXCR4), solamente los macrófagos cultivados con plasma de pacientes no politrauma presentaron un aumento significativo en el marcador CXCR4, el cual está involucrado en el control de la movilización celular (Fig. 55). No se observaron diferencias en los otros marcadores y condiciones.

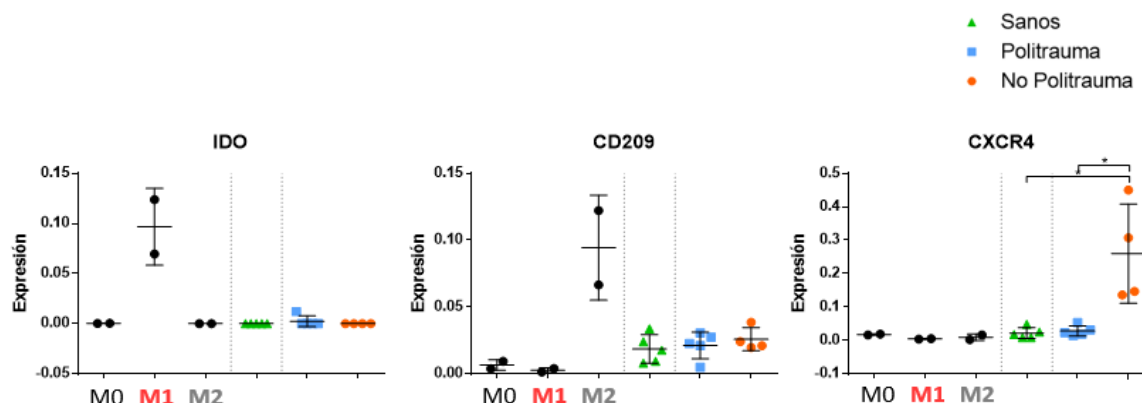


Figura 55. Niveles de expresión a nivel de RNA mensajero en macrófagos crecidos con plasma de diferentes sujetos. p valor: '*' $\leq 0,05$; '**' $\leq 0,01$; '***' $\leq 0,001$.

5.6.5 Capacidad fagocítica y funcional de los macrófagos en condiciones SIRS

En la Fig. 56 se observa la cinética de fagocitosis de las partículas pHRodo durante 3 horas. A diferencia de los controles M0 y M1, los macrófagos de perfil M2 presentaron baja capacidad fagocítica. Los macrófagos cultivados con plasma de pacientes politrauma y de sujetos sanos presentaron una capacidad fagocítica similar. Sin embargo, los macrófagos con plasma no politrauma requirieron de más tiempo para

alcanzar los niveles de intensidad de los otros dos grupos, asemejándose a la baja capacidad fagocítica de los M2.

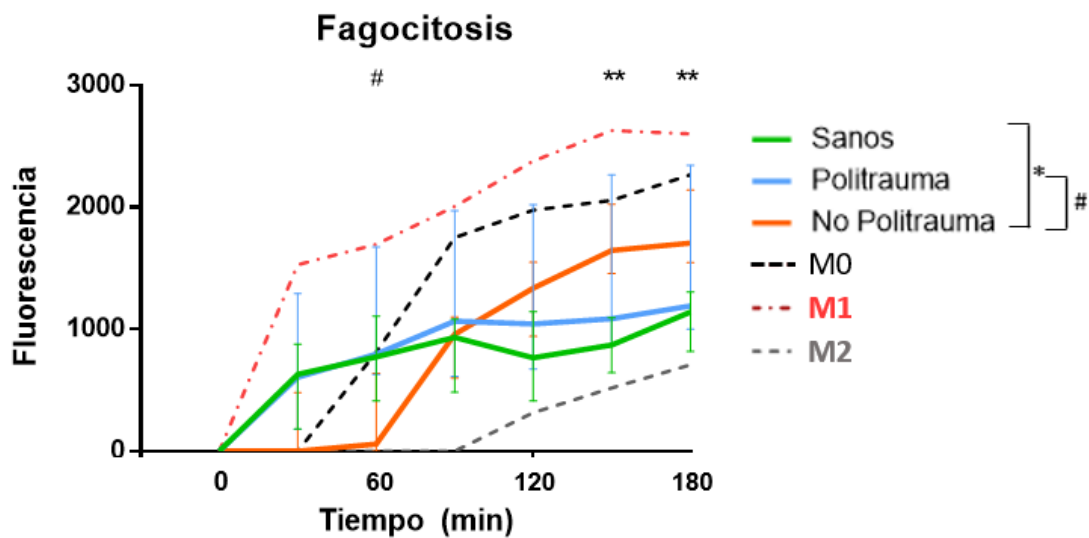


Figura 56. Cinética de fagocitosis de los macrófagos cultivados con diferentes plasmas. A mayor fagocitosis de partículas mayor es la intensidad de señal. El símbolo '' indica si hay diferencias significativas entre el grupo de plasmas sanos vs el grupo no politrauma, y el símbolo '#' entre el grupo politrauma y no politrauma. p-valor: '*' $\leq 0,05$; '**' $\leq 0,01$; '***' $\leq 0,001$.*

En la Figura Suple. 11 se observan imágenes de esta internalización de partículas dentro de los macrófagos en las diferentes condiciones de estudio.

5.7 Estudio del potencial inmunomodulador de las MSCs en condiciones SIRS

5.7.1 Estudio morfológico de los macrófagos cocultivados con las MSCs

Se observaron cambios visibles en los controles (M0, M1 y M2) con una morfología más fusiforme con la presencia de MSCs (Fig. 57), a diferencia de lo observado anteriormente en la Fig. 51. Sin embargo, los macrófagos cocultivados con MSCs y plasmas presentaron una morfología más redondeada. Por lo tanto, tanto en las condiciones control como en las de estudio, las MSCs condicionan la morfología de los macrófagos.

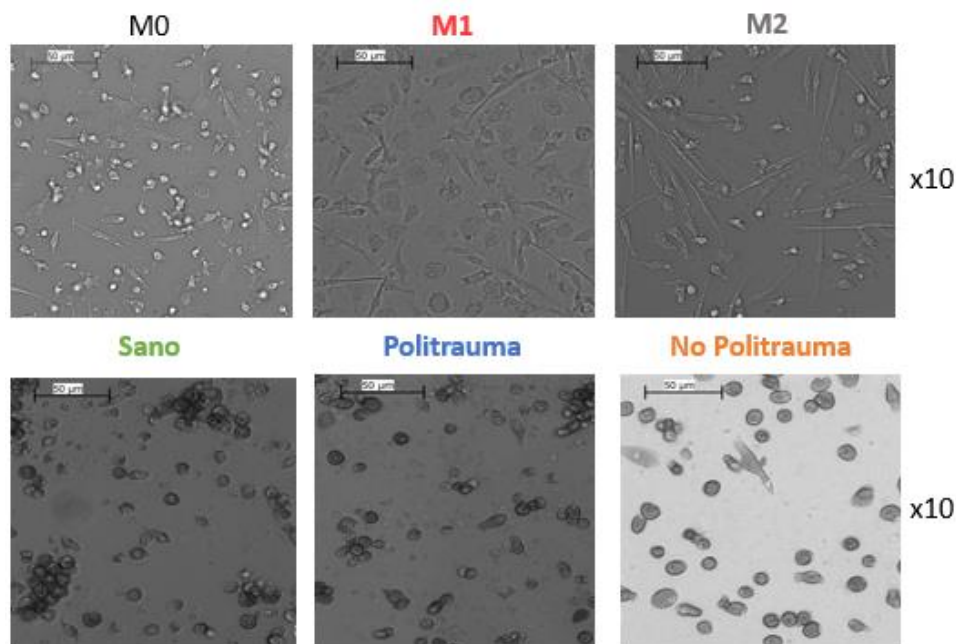


Figura 57. Morfología de los macrófagos tras ser cocultivados en transwell con MSCs en condiciones SIRS.

5.7.2 Inmunofenotipo de los macrófagos en cocultivo con MSCs

Los macrófagos cocultivados con plasma y MSCs presentaron una reducción general en la expresión de los marcadores identificativos de M1 y M2 al compararlo con los macrófagos crecidos únicamente con plasma (Fig. 58). A pesar de esta reducción de la intensidad de estos marcadores, se redujeron los valores del marcador CD64 (tipo M1) de aquellos macrófagos cultivados con plasma de ambos grupos SIRS.

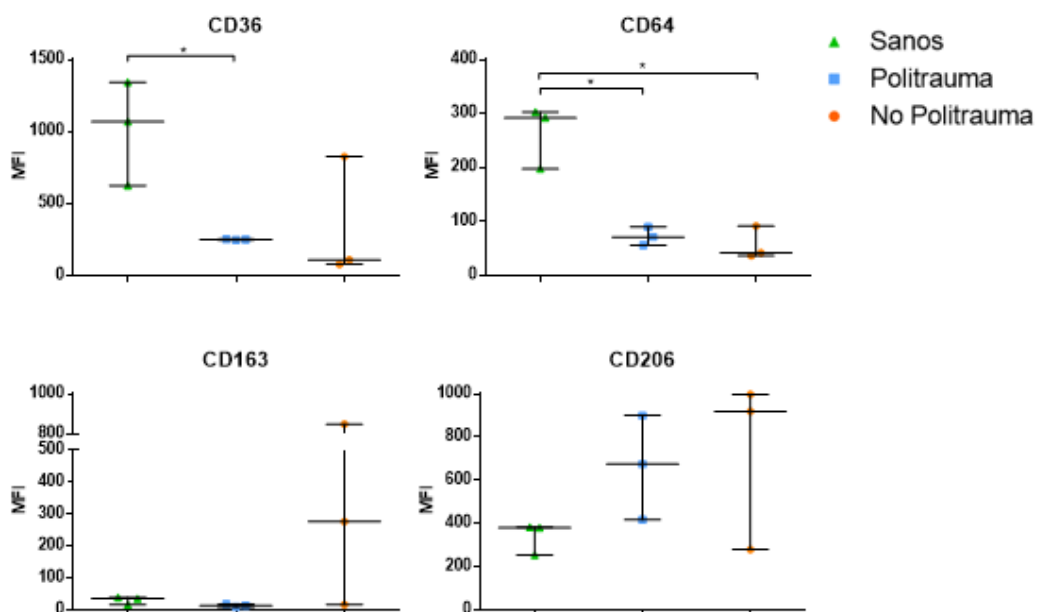


Figura 58. Expresión (MFI) de marcadores de membrana de diferenciación de macrófagos en condiciones SIRS en ausencia (izquierda) o cocultivo con MSCs (derecha).

5.7.3 Perfil inmunomodulador de las MSCs en condiciones SIRS

El cultivo de las MSCs en presencia de macrófagos y plasma de pacientes no politrauma mostró una activación de las MSCs con un incremento significativo en la expresión de marcadores de inmunomodulación como el IDO y el CD54 (Fig. 59). Las MSCs cocultivadas únicamente con los diferentes plasmas (en ausencia de macrófagos) no mostraron cambios en el perfil inmunomodulador.

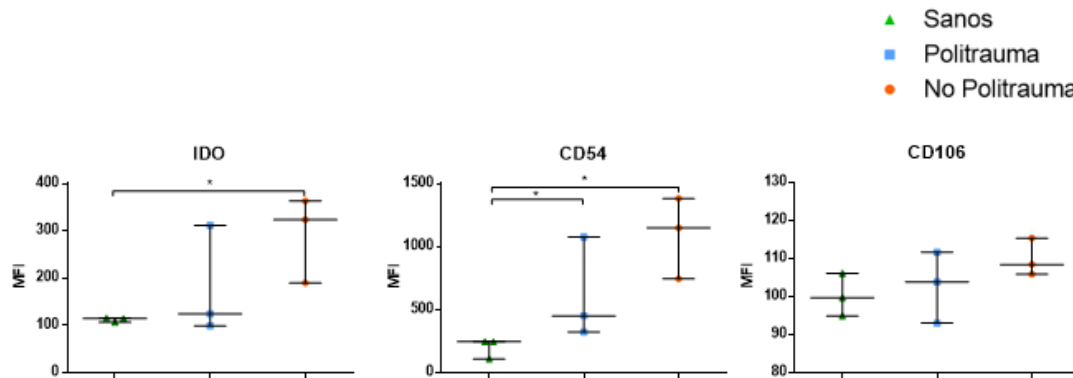


Figura 59. Expresión (MFI) de marcadores de inmunomodulación de las MSCs en condiciones SIRS en cocultivo con macrófagos.

6. DISCUSIÓN

El SIRS consiste en una reacción inflamatoria aguda derivada de un traumatismo, una quemadura, una pancreatitis o un proceso infeccioso (sepsis), que condiciona críticamente el estado del paciente aumentando el riesgo de fallo multiorgánico y de muerte ^{4,22}. A pesar de los avances en el tratamiento y en la supervivencia de los pacientes ingresados en la UCI, actualmente no se dispone de una terapia adecuada para el control de la respuesta inflamatoria sistémica ni para la reducción de sus efectos colaterales ^{47,164}. Además, existe un gran desconocimiento sobre los principales mecanismos de regulación de esta respuesta debido principalmente a su alta complejidad y heterogeneidad. Por ello, se plantea que una mayor comprensión de la fisiopatología del SIRS permitirá la identificación de nuevos marcadores de pronóstico y potenciales dianas terapéuticas ¹⁶⁵.

Uno de los objetivos principales de este trabajo es comparar de manera multiparamétrica la respuesta SIRS y ver cómo se regula según el tipo de lesión o afectación inicial. El estudio a varios tiempos nos permite conocer mejor cómo el organismo responde de forma aguda, y cómo tiende a recuperar la homeostasis. En este trabajo observamos que el momento con mayor grado inflamatorio ocurre en las primeras 24 horas del inicio del SIRS. En el caso de los pacientes politrauma, el proceso inflamatorio ocurrió justo después del accidente. Por otro lado, el grupo no politrauma, además de ser un grupo más heterogéneo el proceso de inicio de la infección se desconoce en la mayoría de los casos (comenzando días antes del desarrollo del SIRS). En un estudio comparativo entre pacientes se observa como en los pacientes trauma se consigue el pico máximo de leucocitos aproximadamente tras 3 horas después del accidente que en el modelo de endotoxina por LPS (también a las 3 horas) ¹⁶⁶. Este resultado se debe a la agudeza del traumatismo frente al proceso de escalado que supone la presencia de un patógeno durante la infección. Sin embargo, a pesar de estas diferencias entre los grupos, existió un perfil inflamatorio conservado. Los resultados mostraron que la respuesta SIRS en pacientes politrauma fue similar a la de pacientes no politrauma, pero con un menor grado (movilización de neutrófilos y concentración de citocinas, principalmente) ^{167,168}.

Los principales artífices de la respuesta inflamatoria de SIRS son las poblaciones leucocitarias que, inducidas por una señalización de alarminas, con un aumento

significativo durante el SIRS de las proteínas S100A8 y RAGE como muestran nuestros resultados, generan una cascada de activación sistémica y movilización descontrolada^{38,169}. Debido a la agudeza de la respuesta, el sistema inmune innato es el que juega un papel clave en los primeros instantes del SIRS. En este sentido, identificamos y cuantificamos más de 25 poblaciones celulares en circulación, siendo en su mayoría poblaciones innatas. Estudios anteriores han mostrado el recuento de parte de estas poblaciones, pero no en tanta profundidad^{167,170,171}. En nuestro estudio se incluyen además poblaciones inmaduras de neutrófilos, diferentes subclases de cMo y ncMo, hasta 6 subclases de DCs, las poblaciones de MDSCs, HSCs y MSCs circulantes

Los niveles de leucocitos en general aumentaron durante el SIRS en ambos grupos siendo determinado por la gran movilización de neutrófilos (siendo del 80-90% de los leucocitos en algunos casos). Los neutrófilos en condiciones basales salen a circulación maduros (núcleo segmentado), pero en condiciones inflamatorias aparecen poblaciones de neutrófilos bandeados (inmaduros) debida a la movilización masiva desde la médula ósea¹⁷². La presencia de la población de neutrófilos CD16^{neg} en sangre periférica se conoce como desplazamiento hacia la izquierda (*left shift*)^{173,174}. Este mismo proceso se observó en gran parte de las muestras donde aumentaron los neutrófilos inmaduros en los pacientes SIRS en las primeras horas. Se ha descrito que esta población es susceptible al estado inflamatorio y son activadas dando una población CD16^{neg}/CD62L^{pos}¹⁷⁵. La gran movilización y activación descontrolada de los neutrófilos (liberación de ROS, desgranulación, NETosis) es determinante en la fisiopatología (alteración barrera endotelial, daño orgánico) de los pacientes con SIRS^{172,176,177}. Estos factores hacen que esta población se plantee como una diana para reducir los efectos colaterales de la sobreactivación durante el SIRS^{77,178,179}.

Es importante destacar que en nuestro análisis observamos como en los pacientes SIRS y en mayor medida en los pacientes no politrauma hay una tendencia de activación y maduración desde los neutrófilos inmaduros (CD16^{neg}/CD62L^{neg}) hacia un perfil CD16^{pos}/CD62L^{pos}, pasando previamente por los CD16^{neg}/CD62L^{pos}, similar al previamente descrito tras la administración de LPS en sujetos sanos¹⁸⁰. Además, se ha descrito que aquellos pacientes traumatizados que presentan este perfil tienen un peor pronóstico¹⁸¹.

En ambos grupos de pacientes SIRS se vio una reducción aguda de los basófilos y eosinófilos en las primeras horas. Estas poblaciones *a priori* involucradas en procesos de respuesta alérgica y eliminación de parásitos no fagocitables puede que no desempeñen un papel tan relevante en la fisiopatología del SIRS (más allá de la producción de histamina como agente vasodilatador) como lo puedan hacer los neutrófilos ^{79,182}. Derivando todas las poblaciones granulocíticas de una célula progenitora común, se podría plantear que la diferenciación de los progenitores y la movilización desde la médula ósea esté promovida durante el SIRS hacia el tipo neutrófilo. Este aumento de neutrófilos puede estar directamente regulada por citocinas liberadas como el factor G-CSF (aumentada en los pacientes SIRS) ¹⁸³. Otro factor de crecimiento inductor de la proliferación de células mieloides es la GM-CSF. Esta molécula induce la formación de células tanto granulocíticas como monocíticas ⁴⁴. Sin embargo, la concentración de esta molécula no fue detectable en circulación en la mayoría de los pacientes.

Otra población clave en la respuesta innata durante el SIRS son los monocitos por su capacidad de fagocitosis, de presentación de antígenos, la gran producción de citocinas, migración y diferenciación a macrófagos en los tejidos ^{82,184}. Según el perfil transcriptómico y la actividad celular se diferencian tres tipos (clásicos, intermedios y no clásicos) que varían su proporción en sangre según el estado del paciente ^{83,185}. En los pacientes no politrauma la cinética de las principales poblaciones de monocitos fue similar a la descrita durante procesos inflamatorios en pacientes críticos con un aumento en la población de iMo ^{186,187}. Los iMo se consideran los más proinflamatorios por tener una alta capacidad de presentación de antígeno y mayor producción de citocinas como TNF α e IL-6 ⁸⁶, citocinas incrementadas en el plasma de estos pacientes. Pero también, bajos niveles de esta subpoblación durante procesos infecciosos se han relacionado con un peor pronóstico ¹⁸⁸. Por otro lado, los resultados mostraron que los pacientes politrauma aumentaron la población de monocitos. Se ha descrito que los pacientes politrauma con traumatismo craneoencefálico este aumento de los monocitos es un buen marcador de pronóstico ¹⁸⁹, pudiendo estar relacionado con el aumento significativo de la quimiocina MIF.

Otra aportación no descrita hasta la fecha en este contexto es la distribución de las subpoblaciones de cMo y ncMo según la expresión de CD62L/Fc ϵ RI y CD36/SLAN,

respectivamente. Un incremento en la población con CD62L^{pos} se puede interpretar como una respuesta a la movilización leucocitaria y extravasación regulada hacia tejidos ¹⁹⁰. Los receptores FcεRI y SLAN se relacionan con la actividad de presentación de antígenos y con una mayor producción de citocinas como el TNFα y la IL-6 ¹⁹¹. Así mismo, la expresión de SLAN por las poblaciones ncMo se relaciona también con mayor capacidad fagocítica ^{82,192}. Por otro lado, el marcador CD36 se ha visto involucrado en procesos de migración, señalización y fagocitosis en los macrófagos ¹⁹³. Los resultados muestran que durante el SIRS la subpoblación ncMo mantienen o disminuyen los niveles mientras que la subpoblación cMo mayoritaria en sangre (CD62L^{pos}/FcεRI^{neg}) aumenta significativamente en los pacientes politrauma. Es interesante observar que las poblaciones con positividad para los marcadores FcεRI en los cMo y el SLAN en los ncMo disminuyeron en ambos grupos SIRS. Estos cambios en las subpoblaciones de monocitos pueden ser determinados por cambios en la expresión de marcadores como el CD36 o el CD62L involucrados en la movilización (reclutamiento) de las células desde el torrente sanguíneo hacia los tejidos ¹⁹⁴.

Estos últimos marcadores al igual que el HLA-DR expresado por células presentadoras de antígeno (como monocitos y células dendríticas) disminuyeron durante el SIRS. En un estudio en pacientes politrauma, observaron que los monocitos disminuyen la expresión de HLA-DR y no recuperaban los niveles normales hasta pasados 14 días. Un cambio en la expresión de este marcador puede servir para conocer la fase inmunológica de respuesta ¹⁹⁵. También se ha visto correlación entre los valores del ISS (grado de lesión traumática) y el nivel de expresión de este marcador, siendo menor la expresión del HLA-DR cuanto mayor en la gravedad del traumatismo ¹⁹⁶. En estudios anteriores han visto que una reducción en la expresión de HLA-DR se relaciona con una mayor predisposición de infecciones nosocomiales y una mayor estancia en la UCI ^{38,197,198}. Es por ello, por lo que el estudio de expresión de esta proteína se ha planteado como biomarcador en pacientes sometidos a cirugía que puedan desarrollar sepsis entre otros escenarios ¹⁹⁹.

Pero además de usar el HLA-DR como marcador de pronóstico de los pacientes, es interesante conocer que las células involucradas en la presentación de antígenos tienen una menor capacidad de activación del sistema inmune adaptativo ⁹² y por tanto una

menor capacidad de respuesta ²⁰⁰. Una población relevante en la activación del sistema inmune adaptativo son las células dendríticas (DCs) a través de la presentación de antígenos y la secreción de múltiples citocinas ⁹¹. En este estudio se identificaron hasta 6 subpoblaciones de DCs. Todas ellas se vieron disminuidas en ambos grupos de estudio a lo largo del SIRS, y sin recuperar cifras normales pasadas 72 horas. Esta reducción puede deberse también a la migración de estas células a los ganglios linfáticos donde presentan los antígenos y activan la respuesta inmune adaptativa ²⁰¹.

Por otro lado, la reducción de las DCs y otras poblaciones (linfocitos) en circulación se puede deber a que las células migren directamente a los tejidos afectados durante el insulto o al foco de inflamación (siguiendo un gradiente de quimiocinas) ²⁰². En este sentido, se analizó la concentración de ciertas quimiocinas para conocer qué relación existía entre la liberación de las citocinas y la migración leucocitaria. Entre las moléculas analizadas destacaron la IL-8 y CCL4 con una alta expresión en la mayoría de los pacientes SIRS. Es interesante comentar que, la mayoría de las quimiocinas se mantuvieron con niveles similares entre los pacientes politrauma y no politrauma, salvo la CCL4. Sin embargo, los valores en circulación de los leucocitos sí que variaron entre los dos grupos SIRS. Por lo que, el control de la migración de los leucocitos puede que sea determinado además por otros factores.

Otro factor fundamental en la fisiopatología del SIRS y que puede explicar la reducción de los valores leucocitarios en sangre es la alteración en la integridad vascular. La actividad descontrolada de los neutrófilos altera el estado de la microvasculatura de órganos como los pulmones ²⁰³. El endotelio también es sensible a la hipercitocinemia provocando su activación inespecífica y favoreciendo la extravasación celular y de plasma incluso a tejidos no afectados inicialmente ⁶⁰. En los pacientes SIRS se observó un incremento del factor angiogénico VEGF que por un lado promueve la generación de vasos sanguíneos en aquellos tejidos que están en condiciones de hipoxia (debido a la inflamación, coagulación diseminada), pero que durante el SIRS puede estar involucrado en el aumento de la permeabilidad del endotelio ²⁰⁴. Además, el incremento de este factor se relaciona con un peor pronóstico en pacientes con infección ²⁰⁵. . En este trabajo se observó como la gran mayoría de poblaciones aumentan la expresión de este marcador durante el SIRS.

Otra de las hipótesis que se plantea para explicar la disminución de las células en circulación es la necrosis o la apoptosis debido a las condiciones de estrés y de inflamación intensa ²⁰⁶. Las células que reciben suficiente estímulo pueden entrar en un estado de piroptosis (apoptosis inducida por excesiva inflamación) ²⁰⁷. Entre las citocinas que pueden inducirlo se encuentran las citocinas del inflamasoma la IL-1 β y la IL-18 aumentadas en la sepsis ^{53,208}. Estas citocinas se vieron incrementadas en la mayoría de los pacientes del grupo no politrauma. La piroptosis o muerte celular inflamatoria que se da por la sobreactivación celular y detección de PAMPs, puede ser otro condicionante en la reducción de ciertas poblaciones ²⁰⁹.

Por otro lado, en el plasma de los pacientes SIRS, y con mayor diferencia en el grupo no politrauma, se observó una reducción del ligando FasL (proapoptótico). Se interpreta este descenso de concentración desde el inicio del SIRS como una señal promotora de la supervivencia celular sobre todo en los tejidos afectados por las condiciones de estrés y de inflamación ²¹⁰.

El sistema inmune adaptativo tiene un papel secundario en el inicio del SIRS, pero es fundamental para la resolución de la inflamación y del proceso infeccioso ^{73,211}. Como se ha visto en estudios de células circulantes en cirugías severas, traumatismos y sepsis, las poblaciones linfocitarias se ven disminuidas ^{212,213}. Los pacientes de este estudio presentaron un descenso tanto de las células T, B y NK, y con recuperación parcial de solo algunas subclases al cabo de las 72 primeras horas tras el inicio del SIRS. Las células plasmáticas (linfocitos B maduros), a diferencia del resto de linfocitos, sobrepasaron los niveles basales con el paso del tiempo en el grupo no politrauma. Este incremento de células plasmáticas corresponde a una respuesta secundaria y más específica (secreción de anticuerpos) contra el agente infeccioso ¹⁰⁵. Este descenso de poblaciones linfocitarias se puede relacionar también con la no detección de las citocinas inflamatorias como la IL-2 y la IL-12. El descenso en las poblaciones linfocitarias o una inadecuada activación pueden ser factores que condicionen la ausencia de estas citocinas en plasma en la mayoría de los pacientes. En estudios previos, la expresión de estas citocinas en pacientes críticos es heterogénea y dependiente del tipo de lesión originaria del SIRS que se estudie ^{214,215}.

Otra situación crítica se da cuando las poblaciones leucocitarias no se recuperan al cabo de unos días desde el inicio del SIRS. Esta falta en la renovación desde la médula ósea puede inducir un estado de inmunodeficiencia ²¹⁶. Un claro ejemplo de ello es la linfopenia prolongada que sufren ambos grupos de pacientes SIRS. Durante el SIRS se produce una mielopoyesis de emergencia donde el nicho hematopoyético queda alterado y donde las células progenitoras hematopoyéticas (HSCs) pueden entrar en un estado de agotamiento ^{216,217}. Respecto a la población de HSCs en circulación, su recuento fue bajo en condiciones basales y tendió a aumentar en los pacientes politrauma con respecto a los pacientes no politrauma. Este aumento se pudo deber además de por la señalización con G-CSF, por rotura de grandes huesos y liberación al torrente sanguíneo ^{106,218}. De manera similar, la población con perfil de células mesenquimales (MSCs) aumentó su concentración en circulación al inicio del SIRS en los pacientes politrauma ²¹⁹. En estudios anteriores se ha descrito que pacientes que han sufrido un traumatismo con fractura de hueso aumenta el número de esta población tras el accidente, siendo esta muy escasa en circulación ^{220,221}. Esta población de MSCs circulantes aumentó también en los pacientes no politrauma al cabo de 72 horas. Esta movilización de las MSCs puede interpretarse como una respuesta de recuperación o de regulación inflamatoria ^{110,111}.

Una población muy interesante en el contexto del SIRS con capacidades de inmunorregulación similares a la de las MSCs es la de las células supresoras derivadas mieloides o MDSCs. Estas células aumentaron durante el SIRS, siendo significativo en los pacientes politrauma con respecto al grupo control. En el contexto del SIRS un aumento de esta población puede estar relacionada con un control compensatorio y de regulación de la respuesta inflamatoria ⁹⁸. Esta población, al igual que la MSCs, interacciona con otras poblaciones leucocitarias promoviendo un efecto inmunosupresor a través del metabolismo de la arginina, TGF β , IDO y NOS ^{99,222}. Por lo que, estas células pueden ser claves en el control de la respuesta inflamatoria del SIRS.

En este sentido, junto con el aumento de citocinas proinflamatorias, también se observó un aumento de citocinas que regulan el estado inflamatorio como la IL-6 (según el estado del microambiente este factor puede actuar de manera pro- o antiinflamatoria) y las que tienen un efecto antiinflamatorio definido como la IL-4 e IL-10. Esta respuesta

antinflamatoria se entiende como un mecanismo de respuesta para controlar el exceso de inflamación, proceso conocido como CARS ²¹. Sin embargo, la coexistencia de moléculas tanto pro- como antiinflamatorias (tormenta de citocinas) en las primeras horas del SIRS denota una desregulación en la respuesta inflamatoria a nivel sistémico (MARS) ^{223,224}.

Un aspecto importante para evaluar es el estado de activación y funcional de las células movilizadas). Se ha descrito que en condiciones inflamatorias prolongadas las células inmunes pueden entrar en un estado de extenuación o agotamiento (del inglés *exhaustion*) dejando de ser inmunocompetentes ^{225,226}. Ejemplo de ello es la menor capacidad de producir IFN γ e IL-12 por parte de poblaciones como las NK ²²⁷. Este estado de disfunción se caracteriza por un bajo rendimiento en la producción de citocinas, aumento en la expresión de moléculas inhibitoras (PD-1, CTLA-4) y una menor capacidad de respuesta contra patógenos ^{206,226,228}. Por lo que será interesante no solo conocer cuáles son los cambios a nivel poblacional sino también cómo se encuentran estas células y cómo puede afectar a la fisiopatología del SIRS. Un estado de linfopenia severa, alteraciones en el recuento celular y anergia del sistema inmune suponen un aumento en la susceptibilidad a infecciones secundarias, readmisión y un peor pronóstico ^{170,213,229}. Es importante destacar que el estudio de poblaciones en sangre periférica realizado es una aproximación para comprender cómo se regula la respuesta inflamatoria a nivel sistémico. Sería interesante, además del recuento celular, conocer cómo se encuentran y se comportan estas células cuando llegan a los tejidos ¹⁶⁵. Algunos estudios se han aproximado a esta idea estudiando el comportamiento de poblaciones como los monocitos o neutrófilos movilizados en órganos a partir del estudio de, por ejemplo, el lavado bronco alveolar (pulmones) o directamente los órganos de pacientes fallecidos ^{230,231}.

En los últimos años se ha visto que las VEs participan directamente en la comunicación y la regulación intercelular ²⁰³. En este trabajo observamos que la concentración de las vesículas aisladas aumentó significativamente en los pacientes con SIRS. Además, este incremento en la concentración de las VEs siguió el patrón de inflamación visto previamente con las poblaciones leucocitarias y citocinas, con un valor significativamente superior en los pacientes del grupo no politrauma, seguido por los

pacientes politrauma en las primeras horas, similar al visto en otros trabajos ^{232,233}. En estudios previos se ha visto que una concentración alta de VEs se relaciona con mayor fallo multiorgánico y peor pronóstico ^{234,235}.

La función de las VEs viene determinada por su origen, el estado de la célula productora y la carga que transportan ^{236,237}. Se ha descrito que en condiciones basales la mayoría de las VEs de plasma proceden de plaquetas, neutrófilos, células endoteliales y eritrocitos ²³⁸.

Por otro lado, se ha propuesto el estudio de las VEs y de su contenido como biomarcadores de diagnóstico y pronóstico en sepsis y otras condiciones inflamatorias ⁵⁶. Los microRNAs transportados dentro de las VEs pueden jugar un papel clave en la regulación de la inflamación a nivel sistémico ¹¹⁹. En este estudio observamos que el contenido de las VEs en microRNAs viene muy determinado por el origen del SIRS. Los pacientes con SIRS derivado de un politrauma presentaron un patrón de microRNAs muy conservado y diferenciado del de los sujetos sanos. Este perfil fue más heterogéneo en el grupo no politrauma debido principalmente a la gran variedad de orígenes del SIRS (infección urinaria, neumonía, pancreatitis, etc.). Referente a las vías celulares en las que están involucrados los microRNAs que aparecen diferencialmente expresados entre el grupo politrauma y el sano, se destacan aquellas implicadas en la regulación de la migración celular, inflamación y señalización intercelular. En procesos inflamatorios se ha descrito que determinados miRNAs que aparecen sobreexpresados pueden ser utilizados como biomarcadores de pronóstico ⁵⁶. Un aumento en el miR-133a, visto en el grupo politrauma, se ha relacionado con un pronóstico desfavorable en pacientes críticos ²³⁹.

El estudio de múltiples factores es fundamental para la identificación de biomarcadores de pronóstico, la monitorización del paciente y la adecuación del tratamiento. Actualmente, hay descritos gran cantidad de factores relacionados con la evolución de pacientes críticos ^{72,240}. Entre los marcadores descritos se destaca el estudio de citocinas como la IL-6 o la IL-8, donde un incremento de estas se relaciona con un peor pronóstico en pacientes politrauma ²⁴¹. Sin embargo, existen muchas discrepancias entre los estudios debido principalmente a factores como el tiempo de recogida de la muestra o el origen del SIRS ³⁶. En los pacientes politrauma se observa

que estos marcadores son útiles para determinar qué pacientes presentan un mayor riesgo de infección tras el inicio del SIRS, al igual que un incremento en TNF α o un bajo número de monocitos. Otros marcadores estudiados como las alarminas (S100A8), el SOFA o MIF se han propuesto como complementarios a los valores de PCT, la PCR y el lactato para la estimación de mortalidad en pacientes críticos^{35,240,242}. En los pacientes SIRS se observó que las proteínas MIF y RAGE, o el recuento de MDSCs, al inicio del SIRS son buenos marcadores para determinar si el paciente presentará altos valores de SOFA pasadas 72 horas del inicio del SIRS. También, se ha visto que la combinación de estos marcadores con el APACHE o el SOFA mejoran la sensibilidad para estimar el pronóstico.

De la misma manera, la cuantificación de poblaciones leucocitarias se ha propuesto como indicadores de pronóstico²²³. El recuento de las MDSCs y la concentración de IL-8 presentaron un gran potencial para determinar el pronóstico de los pacientes con SIRS, alcanzando niveles muy similares a los obtenidos por el sistema de puntuación APACHE II, empleado comúnmente en la clínica para estimar la supervivencia⁴¹. El recuento de linfocitos también es un parámetro que puede indicar la evolución de los pacientes como el desarrollo de un síndrome de disfunción multiorgánica, o como en nuestro estudio, el tiempo de estancia en la UCI²²³. En este trabajo se ha visto que a pesar del origen y la heterogeneidad del SIRS existen patrones comunes, y que el estudio de marcadores puede ser útil para predecir la evolución de los pacientes.

El estudio de múltiples factores inflamatorios además permite plantear nuevas alternativas terapéuticas que prevengan o reduzcan los efectos deletéreos de la respuesta SIRS. La mayoría de las estrategias planteadas hasta la fecha se centran en el bloqueo de factores condicionantes de la tormenta de citocinas con anticuerpos dirigidos contra LPS, TNF α , IFN γ o MIF^{71,243}. Otra de las estrategias planteadas es la del control de la movilización masiva y la actividad descontrolada de los neutrófilos mediante el bloqueo del factor G-CSF o de la producción de NETs¹⁷⁸. Sin embargo, estas estrategias no han conseguido el rendimiento esperado más allá de los estudios en modelos animales¹³³. A pesar del avance en el tratamiento de soporte, el control de la hemodinamia, la coagulación, o de reemplazo orgánico, actualmente no se dispone de una terapia dirigida al control de la inflamación sistémica que proteja del daño colateral de la respuesta inmune la integridad y la función de los órganos vitales.

El uso de corticoides en estos pacientes no es recomendable, y se reserva solamente para casos concretos en los que hay indicios de insuficiencia suprarrenal ⁴⁹. A pesar de observarse una regulación en la liberación de citocinas como la IL-6 y TNF α con el tratamiento de corticoides, no se observan mejorías en la supervivencia ni en la evolución de los pacientes ^{244–246}. Además, el tratamiento con corticoides se ha relacionado con un mayor riesgo de hiperglicemia, una mayor incidencia en lesiones gastrointestinales y con un aumento en la susceptibilidad a infecciones ^{247,248}.

En este contexto, el empleo de células estromales mesenquimales (MSCs) sanas como terapia para el control de la respuesta inflamatoria del SIRS suscita gran interés. Las MSCs han demostrado un beneficio significativo en gran variedad de patologías de base inflamatoria e inmunológica, como la enfermedad de injerto contra huésped, artritis o la enfermedad de Crohn ^{249,250}. Actualmente, la terapia con MSCs se considera como un producto de terapia medica avanzada (ATMP) siendo empleada en decenas de ensayos clínicos ²⁵¹. En este artículo publicado durante el desarrollo de este trabajo por nuestro grupo, se recogen las principales ventajas que puede tener la terapia con MSCs en el contexto del SIRS ¹³⁵. Brevemente, las MSCs son capaces de responder ante esta situación inflamatoria presentando una gran capacidad inmunorreguladora, migratoria y regenerativa ^{135,252}. Durante el SIRS podrían reducir el daño colateral del sistema inmune, proteger y promover la regeneración de los tejidos, así como favorecer la recuperación del nicho hematopoyético ^{135,253}. Las MSCs han demostrado una gran capacidad inmunorreguladora en condiciones inflamatorias y en gran medida mediante la modificación de la actividad de otras poblaciones leucocitarias como los linfocitos T, neutrófilos y monocitos ^{135,254,255}.

Esta última, la población de los monocitos juega un papel clave en la regulación del SIRS por su gran producción de citocinas, eliminación de patógenos y la interacción con otras células del sistema inmune ²⁵⁶. La migración y diferenciación de los monocitos es clave para la regulación de la inflamación y recuperación de la homeostasis de los tejidos tras el inicio del SIRS ²⁵⁷. En los pacientes SIRS se observó que los niveles de esta población en general no se vieron tan alterados como ocurrió en el resto de las poblaciones, aunque sí que aumentaron en los pacientes politrauma.

En este marco, el último apartado planteado de este trabajo fue conocer cómo las condiciones SIRS pueden afectar en la diferenciación y maduración de macrófagos, y evaluar el potencial inmunomodulador de las MSCs en este contexto. Los resultados mostraron que la exposición de los monocitos a un ambiente inflamatorio severo induce a su maduración hacia un perfil antiinflamatorio (tipo M2) a distintos niveles. En condiciones inflamatorias, y en especial las del grupo no politrauma la activación de los macrófagos a tipo M2 se vio determinada con un aumento en la expresión CD163, en la producción de la citocina IL-6, alteración en la capacidad fagocítica y en una expresión alta de CXCR4. Este último marcador forma parte del sistema CXCR4/CXCL12 clave en el control de la migración celular y la respuesta inmunitaria ²⁵⁸. Estos resultados informan que ante una exposición prolongada de factores inflamatorios del SIRS, la población de macrófagos tiende a revertir la situación de inflamación mediante el control o reprogramación de los macrófagos a un fenotipo M2 pudiendo ser una alternativa terapéutica en condiciones inflamatorias como se da en la sepsis ²⁵⁹.

Al igual que en otros estudios ^{151,260}, nuestros resultados también demostraron que las MSCs en condiciones SIRS promueven una activación de los macrófagos hacia el perfil M2. mediante la liberación de mediadores como el TGF β , la IL-10 o la prostaglandina-E2 (PGE-2) ^{260,261}.

Por otro lado, las MSCs sanas tras el cultivo directo con el plasma SIRS no mostraron una activación en el perfil inmunomodulador. Sin embargo, resultó muy interesante observar un incremento en la expresión deIDO y CD54 (marcadores de inmunomodulación en las MSCs) cuando se cocultivaron bajo las mismas condiciones SIRS, y en presencia de los macrófagos. Este resultado podría indicar que en condiciones inflamatorias existe una comunicación macrófago-MSCs a través de un factor soluble que induce la activación de las MSCs. La secreción de ciertas citocinas (ej. IFN γ , IL-6, IL-10) podrían estar induciendo dicha activación ^{262,263}. Espagnolle et al., describieron que la interacción de macrófagos crecidos en condiciones inflamatorias y cultivados directamente con MSCs (en contacto célula-célula) induce la expresión de IDO en las MSCs ²⁶⁴. Esta interacción entre las dos poblaciones celulares puede resultar en una interesante sinergia hacia una respuesta que revierta la condición inflamatoria del SIRS a nivel local y favorezca la recuperación de la homeostasis a nivel sistémico ^{136,263}.

Sin embargo, este trabajo no está exento de limitaciones que han condicionado este trabajo. Uno de ellos y quizás el más importante es el tamaño muestral de cada uno de los grupos es un factor limitante para detectar potenciales relaciones entre las variables y la evolución clínica (ej. mortalidad). También, se debe considerar la gran heterogeneidad entre los orígenes del SIRS en los pacientes de ambos grupos (tiempo dependiente, patógenos, tejidos afectados, etc.).

En resumen, en este trabajo se observa que la respuesta SIRS es dependiente del tipo de afectación sufrida, siendo alta en los pacientes politrauma, pero superior en aquellos derivados de otro origen (infecciones). La respuesta inflamatoria es aguda presentando el pico máximo dentro de las primeras 24 horas con una coexistencia de citocinas pro- y antiinflamatorias (tormenta de citocinas). Esta liberación masiva de citocinas, quimiocinas y otros factores se relaciona con un peor pronóstico y una mielopoyesis de emergencia, que desencadena un aumento de poblaciones de neutrófilos, una movilización de los monocitos y un descenso acusado de poblaciones del sistema inmune adaptativo. Por otro lado, se ha visto que observa que los pacientes politrauma tienen una movilización de los monocitos y un incremento en poblaciones reguladoras de la inflamación como las MDSCs y las MSCs. Siguiendo esta cinética, la concentración de VEs se ve aumentada de manera significativa y cuya concentración en microRNAs es dependiente del origen del SIRS. El estudio de múltiples citocinas y poblaciones leucocitarias en sangre periférica ha permitido identificar nuevos marcadores con alto valor pronóstico que pueden ser empleados para conocer la evolución clínica de los pacientes críticos. Por otro lado, en este trabajo se han recreado las condiciones SIRS *in vitro* y se ha observado que la exposición a estas condiciones inflamatorias induce una respuesta antiinflamatoria por parte de los macrófagos. Por último, se ha observado que el potencial inmunorregulador y antiinflamatorio de las MSCs se ve incrementado por la interacción sinérgica con los macrófagos, mostrándose como una potencial estrategia terapéutica para los pacientes que desarrollan el SIRS.

7. CONCLUSIONS

1. Regarding to the multiparametric and comparative analysis of the SIRS response derived from different insults:

1.1. Both polytrauma and non-polytrauma SIRS presented a similar inflammatory response pattern but being more severe in those patients with infection origin. Both groups presented a higher inflammatory response after the SIRS onset and recovered partially normal values after 72 hours.

1.2. Under SIRS conditions there is a massive mobilization of neutrophils, and a continued decrease in dendritic and lymphoid populations. Interestingly, in polytrauma patients there is an increase in monocytes, MDSCs and MSCs during the first hours.

1.3. SIRS reaction is characterized by a huge hypercytokinemia with an increase not only on pro- and anti-inflammatory cytokines, but also by the release of potent cell chemoattractants and growth factors during the first 24 hours after the SIRS onset.

2. Regarding the identification of potential markers for determining the prognosis of SIRS patients:

2.1. High concentration values of IL-6, IL-8 and TNF α , and low monocytes counts at SIRS onset are useful for reporting possible infections in polytrauma patients.

2.2. The plasma concentration of IL-8 and MIF, and the number of MDSC are related to high SOFA values at 72 hours, indicative of a worse patient evolution.

2.3. Regarding the relationship of these parameters with APACHE II, we have observed that IL-8 levels and the MDSCs count are good indicators of risk of death.

3. Regarding the characterization and quantification of the extracellular vesicles (EVs) content in plasma and their microRNAs pattern:

3.1. During SIRS there is an increase of plasma EVs concentration being higher in non-polytrauma group.

3.2. The microRNA content of EVs is directly determined by the SIRS origin and differentiated from healthy controls, especially comparing to polytrauma group.

4. Regarding the effects of SIRS conditions on macrophage differentiation and the impact of the MSCs therapy:

4.1. Exposition to SIRS plasma of healthy monocytes induces their differentiation to macrophages with an anti-inflammatory phenotype (M2), especially in non-polytrauma SIRS conditions.

4.2. MSCs exhibited an interesting synergic activity with the macrophage population promoting the immunoregulatory and anti-inflammatory phenotypes in order to compensate the SIRS conditions.

4.3. MSCs possess unique features such as immunomodulatory and anti-inflammatory capacities, making them a highly promising therapy for SIRS, enabling innovative and effective therapy approaches in the future.

7. CONCLUSIONES

1. Respecto al análisis multiparamétrico y comparativo de la respuesta SIRS derivada de diferentes insultos:

1.1. Tanto el SIRS politrauma como el no politrauma presentaron un patrón de respuesta inflamatoria similar, pero siendo más severo en aquellos pacientes con origen infeccioso. Ambos grupos presentaron una mayor respuesta inflamatoria tras el inicio del SIRS y recuperaron valores parcialmente normales a las 72 horas.

1.2. En condiciones SIRS se produce una movilización masiva de neutrófilos y una disminución continuada de las poblaciones dendríticas y linfoides. Curiosamente, en pacientes politrauma se produce un aumento de monocitos, MDSCs y MSCs durante las primeras horas.

1.3. La reacción SIRS se caracteriza por una hipercitocinemia con un aumento no sólo de citocinas pro y antiinflamatorias, sino también por la liberación de potentes quimioatrayentes celulares y factores de crecimiento durante las primeras 24 horas tras el inicio del SIRS.

2. En cuanto a la identificación de potenciales marcadores para determinar el pronóstico de los pacientes con SIRS:

2.1. Valores elevados de IL-6, IL-8 y TNF α , y el recuento bajo de monocitos al inicio del SIRS son útiles para indicar posibles infecciones en pacientes politrauma.

2.2. La concentración plasmática de IL-8 y MIF, y el número de MDSC se relacionan con elevados valores de SOFA a las 72 horas, indicativos de una peor evolución del paciente.

2.3. En cuanto a la relación de estos parámetros con el APACHE II, hemos observado que los niveles de IL-8 y el recuento de MDSCs son buenos indicadores de riesgo de muerte.

3. En cuanto a la caracterización y cuantificación del contenido de vesículas extracelulares (VEs) en plasma y su perfil de microRNAs:

3.1. Durante el SIRS se produce un aumento de la concentración de VEs en plasma siendo mayor en el grupo no politraumatizado.

3.2. El contenido de microRNAs de las VEs está directamente determinado por el origen del SIRS.

4. En cuanto a los efectos de las condiciones del SIRS sobre la diferenciación de los macrófagos y el impacto de la terapia con MSCs:

4.1. La exposición al plasma del SIRS de monocitos sanos induce su diferenciación a macrófagos con fenotipo antiinflamatorio (M2), especialmente en condiciones de SIRS no politrauma.

4.2. Las MSC mostraron una interesante actividad sinérgica con la población de macrófagos promoviendo los fenotipos inmunorregulador y antiinflamatorio para compensar las condiciones de SIRS.

4.3. Las MSCs poseen características únicas como su capacidad inmunomoduladora y antiinflamatoria, lo que las convierte en una terapia muy prometedora para el SIRS que permitirá enfoques terapéuticos innovadores y eficaces en el futuro.

8. ABSTRACT

Dynamic Analysis of the Inflammatory and Immune Profile of Patients with Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS)

Background:

Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS) consists of an exacerbated and uncontrolled reaction of the immune system to a critical event, such as polytrauma or an infectious process (sepsis). Patients who develop this syndrome have a high probability of going into shock and multiorgan failure, severely compromising the patient's life. Due to the complexity, heterogeneity and acuity of the inflammatory response, there is a great lack of knowledge about the pathophysiology and the main regulatory factors of this response. Further studies focusing on its pathophysiology are essential. Enhanced comprehension of the regulatory factors and their significance in the physiopathology of SIRS will facilitate the discovery of novel prognostic markers and the identification of promising therapeutic targets.

Despite notable advancements in supporting and treating ICU patients, there is still an unmet medical need in effectively managing individuals with SIRS. Mesenchymal stromal/stem cells (MSCs) are emerging as a potential therapy for severe ICU patients due to their potent immunomodulatory, anti-inflammatory, regenerative and systemic homeostasis-regulating properties. MSCs have demonstrated clinical benefits in several inflammatory-based diseases, but their role in SIRS needs to be further explored.

Objectives:

The aim of this project is to characterize and compare multiparametrically the SIRS response derived from polytrauma and non-polytrauma (infections) origins in order to identify new biomarkers and evaluate a potential therapeutic approach.

The specific objectives proposed are: 1) to analyse the distribution of more than 20 circulant immune subpopulations. 2) To study the concentration of inflammatory cytokines, chemokines and growth factors at different times since the SIRS onset. 3) Relate clinical data and patient evolution with the results of the multiparametric analysis in order to identify potential biomarkers 4) To count and characterize the plasma

extracellular vesicles and to study their microRNAs content. 5) Study the effects of SIRS inflammatory conditions on the maturation and differentiation of healthy macrophages, and 6) evaluate the therapeutic potential of MSCs in this context.

Samples and Methods:

At different times since the SIRS onset (0, 24 and 72 hours) peripheral blood samples were taken from 25 polytrauma (Injury Severity Score > 16) and from 25 non-polytrauma patients (e.g., infections). As control samples from healthy donors were also studied. Clinical data and evolution parameters were recorded for biostatistical and relationship analysis. Scores for prognostic and organ damage such as APACHE II or SOFA were calculated.

Through centrifugation steps cells and plasma were isolated for different analysis. Blood (0 and 72h) was treated for erythrocyte lysis, then cells were stained and fixed for flow cytometry analysis. A combination of different conjugated antibodies was used for the identification and quantification of circulant myeloid and lymphoid cell subsets and others such as progenitor and mesenchymal cells.

Plasma concentrations and kinetics of multiple alarmins, both pro- and anti-inflammatory cytokines, chemokines and growth factors at 0, 24 and 72h were studied by Luminex technology under a customised panel for this inflammatory condition.

For plasma extracellular vesicles (EVs) isolation ultracentrifugation protocol was followed. After plasma filtering and centrifugation, the precipitated EVs were characterized by transmission electronic microscopy (for shape determination), Western Blot (CD63 protein expression) and Nanoparticle tracking analysis (for size and concentration determination). For microRNAs pattern expression from EVs a microarray of up to 377 sequences was used. The bioinformatic analysis of the microRNAs content was performed under R statistical software and information of the regulatory role of more relevant microRNAs was obtained from specific databases.

Monocytes from buffy coats were isolated with anti-CD14 magnetic beads and then cultured with GM-CSF and supplemented (50%) with plasma from 0 or 72 hours from SIRS patients, or healthy donors' plasma. After 5 days, cells were photographed and

detached for the immunophenotyping, mRNA expression, cytokine production and phagocytosis analysis.

Furthermore, monocytes were cultured in the previous conditions and cocultured overnight with MSCs in a transwell inserts. Following this culture morphology of macrophages and their immunophenotype were analysed. Besides that, the immunoregulatory profile of MSCs was studied.

Clinical data and ICU parameters were related with laboratory results in order to identify strong connections among variables and the patient evolution. Statistical analysis for comparison among group were performed under U-Mann-Whitney test. For the study of kinetics or changes over time Wilcoxon test was performed. For identifying optimal threshold values (cut-off values) of different variables ROC curves were used. Visual and ROC based subgrouping was performed in order to identify specific patterns inside pathologic groups. Correlation test (Spearman or Pearson) was used to identify relationships among multiple variables. Kaplan-Meier curve was employed to estimate the survival function according to selected variables. Multidimensional scaling models were employed for clustering the samples based on a specific set of variables (dendrogram, PCA).

Results:

SIRS patients presented a different clinical evolution depending on the insult. Polytrauma patients showed higher ICU and hospital stay, but similar to non-polytrauma group in number of deceases. Polytrauma patients presented higher values of lactate, LDH and ALT, whereas non-polytrauma had higher values of bilirubin, creatinine and fibrinogen after the SIRS onset. Referring to outcome prognostic scores APACHE II and SOFA were similar in both studied groups. Furthermore, polytrauma patients required more ICU-stay days and showed worse values of quality of life after discharging from the hospital.

SIRS reaction was characterized by an increase in total leukocytes due to the massive release of neutrophils in the first hours of SIRS. This was determined by an increase in both mature and immature (low expression of CD16) neutrophils subsets. However,

there was a reduction in eosinophils and basophils. Monocytes remained stable although polytrauma samples showed an increase during first hours. While intermediate monocytes increased comparing to healthy values, non-classical monocytes were reduced. Respecting to the myeloid derived suppressor cell population increased in polytrauma patients at 0 hours and in non-polytrauma patients after 72h.

Other populations of interest and lesser described such as the hematopoietic stem cells and the MSCs, showed a partially increase during first hour in polytrauma patients. Whereas, in non-polytrauma patients this augment is showed after 72 hours.

The analysis of the expression of certain markers indicates that during SIRS most leukocytes increase in CD62L (cell mobilization) protein levels. Furthermore, antigen presenting cells such as monocytes and dendritic cells decreased in the expression of HLA-DR. This protein is crucial for the presentation of antigens and the activation of adaptative immune cells. All these results suggest that the SIRS is characterized by a rapid mobilization of neutrophils and other cells from the bone marrow, followed by an uncontrolled migration to different tissues. Furthermore, specific alterations in the hematopoietic niche can explain the lack of replacement in leukocytes populations such as T or NK cells.

This cell mobilization is related with the acute increase of cytokines, chemokines and growth factors. The peak of the SIRS reaction is achieved during the first 24 hours. After 72 hours most of the cytokine levels were similar to those from healthy plasmas. Interestingly, both pro- and anti-inflammatory signals coexisted. This result indicates that SIRS response is mediated by an altered and systemic signalization. In general terms, non-polytrauma groups presented higher concentrations of these molecules. Interestingly, G-CSF and VEGF increased after the SIRS onset, while FasL (involved in apoptosis) decreased in both groups. Apparently, the SIRS response is characterized by an acute and not controlled release of cytokines, process known as hypercytokinemia.

Following this pattern of inflammation, the concentration of VEs increased dramatically during SIRS. The isolated particles presented a size of 180 nm and spherical shape and expressed the classical CD63 marker for EVs. These vesicles as carriers of cell molecules, showed a conservative microRNA profile among the groups, especially in polytrauma and healthy groups. Non-polytrauma patients presented a huge heterogeneity in

microRNA content. These results indicate that EVs concentration increase during SIRS and the microRNA profile is related to the clinical condition of the patient.

After characterizing the SIRS reaction, we tried to reproduce the SIRS conditions in vitro. Plasma from SIRS patients, specially from non-polytrauma patients induced the maturation and differentiation of healthy monocytes to M2-type (anti-inflammatory) macrophages. Under these conditions macrophages showed an increase in CD163 and a decrease of CD64 proteins in the membrane. Only with non-polytrauma plasma macrophages secreted high values of IL-6 and showed less phagocytic activity. This macrophage phenotype presents an important immunomodulatory potential and can be involved in the inflammation resolution. So, under these critical conditions, macrophages will try to compensate the inflammatory state.

Following this idea, our next aim was to know if healthy MSCs could promote the M2-type differentiation in SIRS conditions. After coculture both types of cells in SIRS conditions MSCs promoted the M2 phenotype. Interestingly, MSCs showed an immunomodulatory profile in SIRS conditions just only when macrophages were in the culture. These results indicate that MSCs therapy might favour the regulation of the inflammatory conditions through the synergistic interaction with the macrophage population

Conclusions:

1. The SIRS reaction is characterized by an acute inflammatory response. However, the type of the insult determines the severity being the SIRS response higher in those patients with infection.
2. Under SIRS conditions there is a massive mobilization of neutrophils, and a continued decrease in dendritic and lymphoid populations. Interestingly, in polytrauma patients there is an increase in monocytes, MDSCs and MSCs during the first hours.
3. SIRS reaction is characterized by a huge hypercytokinemia with an increase not only on pro- and anti-inflammatory cytokines, but also by the release of potent cell chemoattractants and growth factors during the first 24 hours after the SIRS onset.

4. Cytokines such as IL-6, IL-8 and MIF, and the numbers of monocytes and MDSCs are useful for determining the prognosis of SIRS patients.

5. During SIRS there is an increase of plasma extracellular vesicles (EVs) concentration, and the microRNA-EVs pattern is directly determined by the SIRS origin.

6. MSCs exhibited a promising synergic activity with the macrophage population promoting the immunoregulatory and anti-inflammatory phenotypes during SIRS.

8. RESUMEN

Análisis Dinámico del Perfil Inflamatorio e Inmune de Pacientes con Síndrome de Respuesta Inflamatoria Sistémica (SIRS)

Introducción:

El Síndrome de Respuesta Inflamatoria Sistémica (SIRS) consiste en una reacción exacerbada e incontrolada del sistema inmunológico ante un evento crítico, como el politraumatismo o un proceso infeccioso (sepsis). Los pacientes que desarrollan este síndrome tienen una alta probabilidad de entrar en shock y experimentar una falla multiorgánica, comprometiendo gravemente la vida del paciente. Debido a la complejidad, heterogeneidad y agudeza de la respuesta inflamatoria, existe una gran falta de conocimiento sobre la fisiopatología y los principales factores reguladores de esta respuesta. Se necesitan estudios adicionales centrados en su fisiopatología. Una comprensión mejorada de los factores reguladores y su importancia en la fisiopatología del SIRS facilitará el descubrimiento de nuevos marcadores pronósticos y la identificación de objetivos terapéuticos prometedores.

A pesar de los avances notables en el soporte y tratamiento de pacientes en la UCI, todavía existe una necesidad médica no satisfecha en la gestión efectiva de individuos con SIRS. Las células madre mesenquimales (MSC) están emergiendo como una terapia potencial para pacientes graves en la UCI debido a sus potentes propiedades inmunomoduladoras, antiinflamatorias, regenerativas y de regulación de la homeostasis sistémica. Las MSC han demostrado beneficios clínicos en varias enfermedades basadas en la inflamación, pero su papel en el SIRS necesita ser explorado más a fondo.

Objetivos:

El objetivo de este proyecto es caracterizar y comparar multiparamétricamente la respuesta del SIRS derivada de traumas múltiples y no traumáticos (infecciones) con el fin de identificar nuevos biomarcadores y evaluar un enfoque terapéutico potencial.

Los objetivos específicos propuestos son: 1) analizar la distribución de más de 20 subpoblaciones inmunitarias circulantes. 2) Estudiar la concentración de citocinas inflamatorias, quimiocinas y factores de crecimiento en diferentes momentos desde el

inicio del SIRS. 3) Relacionar los datos clínicos y la evolución del paciente con los resultados del análisis multiparamétrico para identificar posibles biomarcadores. 4) Contar y caracterizar las vesículas extracelulares en el plasma y estudiar su contenido de microRNAs. 5) Estudiar los efectos de las condiciones inflamatorias del SIRS en la maduración y diferenciación de los macrófagos sanos, y 6) evaluar el potencial terapéutico de las MSC en este contexto.

Muestras y Métodos:

En diferentes momentos desde el inicio del SIRS (0, 24 y 72 horas), se tomaron muestras de sangre periférica de 25 pacientes politraumatizados (Puntuación de Gravedad de Lesiones > 16) y de 25 pacientes no politraumatizados (por ejemplo, infecciones). También se estudiaron muestras de control de donantes sanos. Se registraron datos clínicos y parámetros de evolución para análisis bioestadísticos y de relación. Se calcularon puntuaciones para el pronóstico y daño en órganos como APACHE II o SOFA.

A través de pasos de centrifugación, se aislaron células y plasma para diferentes análisis. La sangre (0 y 72 horas) se trató para la lisis de eritrocitos, luego se tiñeron y fijaron las células para el análisis de citometría de flujo. Se utilizó una combinación de anticuerpos conjugados diferentes para la identificación y cuantificación de subconjuntos de células mieloides y linfoides circulantes, así como otros como células progenitoras y mesenquimales.

Las concentraciones plasmáticas y la cinética de múltiples alarminas, tanto citocinas proinflamatorias como antiinflamatorias, quimiocinas y factores de crecimiento en 0, 24 y 72 horas se estudiaron mediante tecnología Luminex en un panel personalizado para esta condición inflamatoria.

Para el aislamiento de vesículas extracelulares (VEs), se siguió un protocolo de ultracentrifugación. Después de filtrar y centrifugar el plasma, se caracterizaron las VEs precipitadas mediante microscopía electrónica de transmisión (para la determinación de la forma), Western Blot (expresión de la proteína CD63) y análisis de seguimiento de nanopartículas (para la determinación del tamaño y la concentración). Para el perfil de expresión de microRNAs a partir de las VEs, se utilizó un microarray de hasta 377

secuencias. El análisis bioinformático del contenido de microRNAs se realizó bajo el software estadístico R y se obtuvo información sobre el papel regulatorio de los microRNAs más relevantes de bases de datos específicas.

Los monocitos de los sobrenadantes se aislaron con cuentas magnéticas anti-CD14 y luego se cultivaron con GM-CSF y se suplementaron (50%) con plasma de 0 o 72 horas de pacientes con SIRS o con plasma de donantes sanos. Después de 5 días, se fotografiaron y desprendieron para el análisis de inmunofenotipado, expresión de ARNm, producción de citocinas y actividad fagocítica.

Además, los monocitos se cultivaron en las condiciones previas y se cocultivaron durante la noche con MSC en insertos transwell. Después de este cultivo, se analizó la morfología de los macrófagos y su inmunofenotipo. Además, se estudió el perfil inmunorregulador de las MSC.

Los datos clínicos y los parámetros de la UCI se relacionaron con los resultados de laboratorio para identificar conexiones sólidas entre variables y la evolución del paciente. Se realizaron análisis estadísticos para comparaciones entre grupos mediante la prueba de U-Mann-Whitney. Para el estudio de la cinética o cambios con el tiempo, se realizó la prueba de Wilcoxon. Para identificar valores de corte óptimos (valores de corte) de diferentes variables, se utilizaron curvas ROC. Se realizó una agrupación visual y basada en ROC para identificar patrones específicos dentro de los grupos patológicos. Se utilizó la prueba de correlación (Spearman o Pearson) para identificar relaciones entre múltiples variables. Se empleó la curva de Kaplan-Meier para estimar la función de supervivencia según variables seleccionadas. Se utilizaron modelos de escalamiento multidimensional para agrupar las muestras en función de un conjunto específico de variables (dendrograma, PCA).

Resultados:

Los pacientes con SIRS presentaron una evolución clínica diferente según el tipo de insulto. Los pacientes politraumatizados mostraron una estancia más prolongada en la UCI y en el hospital, pero un número similar de fallecimientos en comparación con el grupo no politraumatizado. Los pacientes politraumatizados presentaron valores más

altos de lactato, LDH y ALT, mientras que los no politraumatizados tenían valores más altos de bilirrubina, creatinina y fibrinógeno después del inicio del SIRS. En cuanto a las puntuaciones de pronóstico y daño en órganos como APACHE II y SOFA, fueron similares en ambos grupos estudiados. Además, los pacientes politraumatizados necesitaron más días de estancia en la UCI y mostraron peores valores de calidad de vida después de recibir el alta hospitalaria.

La reacción del SIRS se caracterizó por un aumento en el recuento total de leucocitos debido a la liberación masiva de neutrófilos en las primeras horas del SIRS. Esto se determinó por un aumento en los subconjuntos de neutrófilos maduros e inmaduros (expresión baja de CD16). Sin embargo, hubo una reducción en los eosinófilos y basófilos. Los monocitos se mantuvieron estables, aunque las muestras de politraumatizados mostraron un aumento durante las primeras horas. Mientras que los monocitos intermedios aumentaron en comparación con los valores saludables, los monocitos no clásicos se redujeron. Respecto a la población de células supresoras mieloides derivadas (MDSC), aumentaron en los pacientes politraumatizados a las 0 horas y en los pacientes no politraumatizados después de 72 horas.

Otras poblaciones de interés y menos descritas, como las células madre hematopoyéticas y las MSC, mostraron un aumento parcial durante la primera hora en los pacientes politraumatizados. Mientras en los pacientes no politraumatizados, este aumento se mostró después de 72 horas.

El análisis de la expresión de ciertos marcadores indica que, durante el SIRS, la mayoría de los leucocitos aumentan los niveles de proteína CD62L (movilización celular). Además, las células presentadoras de antígenos, como los monocitos y las células dendríticas, disminuyeron en la expresión de HLA-DR. Esta proteína es crucial para la presentación de antígenos y la activación de células inmunitarias adaptativas. Todos estos resultados sugieren que el SIRS se caracteriza por una movilización rápida de neutrófilos y otras células de la médula ósea, seguida de una migración no controlada a diferentes tejidos. Además, las alteraciones específicas en el nicho hematopoyético pueden explicar la falta de reemplazo en poblaciones de leucocitos como las células T o NK.

Esta movilización celular está relacionada con el aumento agudo de citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento. El pico de la reacción del SIRS se alcanza durante las primeras 24 horas. Después de 72 horas, la mayoría de los niveles de citocinas eran similares a los de los plasmas saludables. Curiosamente, tanto las señales proinflamatorias como las antiinflamatorias coexistieron. Este resultado indica que la respuesta del SIRS está mediada por una señalización alterada y sistémica. En términos generales, los grupos no politraumatizados presentaron concentraciones más altas de estas moléculas. Además, G-CSF y VEGF aumentaron después del inicio del SIRS, mientras que FasL (involucrado en la apoptosis) disminuyó en ambos grupos. Aparentemente, la respuesta del SIRS se caracteriza por una liberación aguda y no controlada de citocinas, un proceso conocido como hipercitocinemia.

Siguiendo este patrón de inflamación, la concentración de VEs aumentó drásticamente durante el SIRS. Las partículas aisladas presentaban un tamaño de 180 nm y forma esférica y expresaban la marca CD63 clásica para VEs. Estas vesículas, como portadoras de moléculas celulares, mostraron un perfil de microRNA conservado entre los grupos, especialmente en los grupos de politraumatizados y sanos. Los pacientes no politraumatizados presentaron una gran heterogeneidad en el contenido de microRNAs. Estos resultados indican que la concentración de VEs aumenta durante el SIRS y que el perfil de microRNAs está relacionado con la condición clínica del paciente.

Después de caracterizar la reacción del SIRS, intentamos reproducir las condiciones del SIRS in vitro. El plasma de pacientes con SIRS, especialmente de pacientes no politraumatizados, indujo la maduración y diferenciación de monocitos sanos en macrófagos de tipo M2 (antiinflamatorios). Bajo estas condiciones, los macrófagos mostraron un aumento en las proteínas CD163 y una disminución de CD64 en la membrana. Solo con el plasma de pacientes no politraumatizados, los macrófagos secretaron valores elevados de IL-6 y mostraron menos actividad fagocítica. Este fenotipo de macrófagos presenta un importante potencial inmunomodulador y puede estar involucrado en la resolución de la inflamación. Por lo tanto, en estas condiciones críticas, los macrófagos intentarán compensar el estado inflamatorio.

Siguiendo esta idea, nuestro siguiente objetivo fue saber si las MSC sanas podrían promover la diferenciación de tipo M2 en condiciones de SIRS. Después del cocultivo de

ambos tipos de células en condiciones de SIRS, las MSC promovieron el fenotipo M2. Curiosamente, las MSC mostraron un perfil inmunomodulador en condiciones de SIRS solo cuando los macrófagos estaban en el cultivo. Estos resultados indican que la terapia con MSC podría favorecer la regulación de las condiciones inflamatorias a través de la interacción sinérgica con la población de macrófagos.

Conclusiones:

1. La reacción del SIRS se caracteriza por una respuesta inflamatoria aguda. Sin embargo, el tipo de insulto determina la gravedad, siendo la respuesta del SIRS más intensa en aquellos pacientes con infección.
2. En condiciones de SIRS, hay una movilización masiva de neutrófilos y una disminución continua en las poblaciones dendríticas y linfoides. Curiosamente, en los pacientes politraumatizados hay un aumento en los monocitos, MDSC y MSC durante las primeras horas.
3. La reacción del SIRS se caracteriza por una hipercitocinemia masiva con un aumento no solo de citocinas proinflamatorias sino también por la liberación de potentes quimiotácticos celulares y factores de crecimiento durante las primeras 24 horas después del inicio del SIRS.
4. Citocinas como IL-6, IL-8 y MIF, y el número de monocitos y MDSC son útiles para determinar el pronóstico de los pacientes con SIRS.
5. Durante el SIRS, hay un aumento en la concentración de vesículas extracelulares plasmáticas (VEs), y el patrón de microRNA-VEs se determina directamente por el origen del SIRS.
6. Las MSC mostraron una actividad sinérgica prometedora con la población de macrófagos al promover los fenotipos inmunorreguladores y antiinflamatorios durante el SIRS.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Lenz A, Franklin GA, Cheadle WG. Systemic inflammation after trauma. Published online 2007:1336-1345.
2. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, et al. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Chest*. 1992;101(6):1644-1655.
3. Mora Alvarado M. Síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS); aproximación al diagnóstico y tratamiento oportuno. *Rev Medica Costa Rica Y Centroam*. 2014;71(612):355-661.
4. Barton MH, Peroni JF. *The Systemic Inflammatory Response*. Fourth Edi. Elsevier Inc.; 2012.
5. Schoenberg MH, Weiss M, Radermacher P. Outcome of patients with sepsis and septic shock after ICU treatment. *Langenbeck's Arch Surg*. 1998;383(1):44-48.
6. Churpek MM, Zdravetz FJ, Winslow C, Howell MD, Edelson DP. Incidence and prognostic value of the systemic inflammatory response syndrome and organ dysfunctions in ward patients. *Am J Respir Crit Care Med*. 2015;192(8):958-964.
7. Chakraborty RK, Burns B. Systemic Inflammatory Response Syndrome. *StatPearls*. Published online October 16, 2019.
8. Brun-Buisson C. The epidemiology of the systemic inflammatory response. *Intensive Care Med Suppl*. 2000;26(1):64-74.
9. Horeczko T, Green JP, Panacek EA. Epidemiology of the Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS) in the Emergency Department. *West J Emerg Med*. 2014;15(3):329-336.
10. Fransvea P, Costa G, Lepre L, et al. Metabolic Syndrome (MetS), Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS), and Frailty: Is There any Room for Good Outcome in the Elderly Undergoing Emergency Surgery? *Front Surg*. 2022;9(870082):1-9.
11. Zonneveld LEEC, Van Wijk RJ, Olgers TJ, Bouma HR, Ter Maaten JC. Prognostic value of serial score measurements of the national early warning score, the quick sequential organ failure assessment and the systemic inflammatory response syndrome to predict clinical outcome in early sepsis. *Eur J Emerg Med*. 2022;29(5):348-356.
12. Taniguchi LU, Pires EMC, Vieira JM, De Azevedo LCP. Systemic inflammatory response syndrome criteria and the prediction of hospital mortality in critically ill patients: a retrospective cohort study. *Rev Bras Ter Intensiva*. 2017;29(3):317.
13. M S Rangel-Frausto, D Pittet, M Costigan, T Hwang, C S Davis RPW. The natural history of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS). A prospective study. *JAMA - Journal of the American Medical Association*.
14. Kaukonen KM, Bailey M, Pilcher D, Cooper DJ, Bellomo R. Systemic inflammatory response syndrome criteria in defining severe sepsis. *N Engl J Med*. 2015;372(17):1629-1638.
15. Vincent J Louis, Jones G, David S, Olariu E, Cadwell KK. Frequency and mortality of septic shock in Europe and North America: a systematic review and meta-analysis. *Crit Care*. 2019;23(196):1-11.
16. Singer M, Deutschman CS, Seymour C, et al. The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (sepsis-3). *JAMA - J Am Med Assoc*. 2016;315(8):801-810.
17. Iskander KN, Osuchowski MF, Stearns-Kurosawa DJ, et al. Sepsis: Multiple abnormalities,

- heterogeneous responses, and evolving understanding. *Physiol Rev.* 2013;93(3):1247-1288.
18. Kwan A, Hubank M, Rashid A, Klein N, Peters MJ. Transcriptional Instability during Evolving Sepsis May Limit Biomarker Based Risk Stratification. *PLoS One.* 2013;8(3):1-8.
 19. Butcher NE, Enninghorst N, Sisak K, Balogh ZJ. The definition of polytrauma : Variable interrater versus intrarater agreement V A prospective international study among trauma surgeons. 2013;74(3):884-889.
 20. Lever A, Mackenzie I. Sepsis: Definition, epidemiology, and diagnosis. *Br Med J.* 2007;335(7625):879-883.
 21. Ward NS, Casserly B, Ayala A. The Compensatory Anti-inflammatory Response Syndrome (CARS) in Critically Ill Patients. *Clin Chest Med.* 2008;29(4):617-625.
 22. Huet O, Jaye P. Septic shock : desperately seeking treatment. 2014;39:31-39.
 23. Gentile LF, Cuenca AG, Efron PA, et al. Persistent inflammation and immunosuppression: A common syndrome and new horizon for surgical intensive care. *J Trauma Acute Care Surg.* 2012;72(6):1491-1501.
 24. Drosatos K, Lymperopoulos A, Kennel PJ, Pollak N, Schulze C, Ira G. Pathophysiology of Sepsis-Related Cardiac Dysfunction: Driven by Inflammation, Energy Mismanagement, or Both? *Curr Hear Fail.* 2015;12(2):130-140.
 25. Alejandro BC, Ronald PM, Glenn HP. Management of the septic shock patient. *Rev Medica Clin Las Condes.* 2011;22(3):293-301.
 26. Greer JR. Pathophysiology of cardiovascular dysfunction in sepsis. *BJA Educ.* 2015;15(6):316-321.
 27. Dolmatova E V., Wang K, Mandavilli R, Griendling KK. The effects of sepsis on endothelium and clinical implications. *Cardiovasc Res.* 2021;117(1):60-73.
 28. Iba T, Levy JH, Raj A, Warkentin TE. Advance in the management of sepsis-induced coagulopathy and disseminated intravascular coagulation. *J Clin Med.* 2019;8(5).
 29. Peerapornratana S, Manrique-caballero CL, Gómez H. Acute kidney injury from sepsis: current concepts, epidemiology, pathophysiology, prevention and treatment. *Kidney Int.* 2019;96(5):1083-1099.
 30. Antoniadou CG, Berry PA, Wendon JA, Vergani D. The importance of immune dysfunction in determining outcome in acute liver failure. *J Hepatol.* 2008;49(5):845-861.
 31. Haussner F, Chakraborty S, Halbgebauer R, Huber-Lang M. Challenge to the intestinal mucosa during sepsis. *Front Immunol.* 2019;10(891):1-16.
 32. Sun GD, Zhang Y, Mo SS, Zhao MY. Multiple organ dysfunction syndrome caused by sepsis: Risk factor analysis. *Int J Gen Med.* 2021;14:7159-7164.
 33. Garcia-Alvarez M, Marik P, Bellomo R. Sepsis-associated hyperlactatemia. *Crit Care.* 2014;18(5):1-11.
 34. Miglietta F, Faneschi ML, Lobreglio G, et al. Procalcitonin, C-reactive protein and serum lactate dehydrogenase in the diagnosis of bacterial sepsis, SIRS and systemic candidiasis. *Infez Med.* 2015;23(3):230-237.
 35. Chesi G, Vazzana N, Giumelli C. Biomarkers for sepsis: Past, present and future. *Ital J Med.*

- 2016;10(4):301-307.
36. Dekker A, Britt E, Krijnen P, Schipper IB. Predictive value of cytokines for developing complications after polytrauma. *2016;5(3):187-201.*
 37. Guisasola MC, Alonso B, Bravo B, Vaquero J, Chana F. An overview of cytokines and heat shock response in polytraumatized patients. *Cell Stress Chaperones.* 2018;23(4):483-489.
 38. Duggal NA, Snelson C, Shaheen U, Pearce V, Lord JM. Innate and adaptive immune dysregulation in critically ill ICU patients. *Sci Rep.* 2018;8(1):1-11.
 39. Pierrakos C, Velissaris D, Bisdorff M, Marshall JC, Vincent JL. Biomarkers of sepsis: Time for a reappraisal. *Crit Care.* 2020;24(1):1-15.
 40. Faix JD. Biomarkers of sepsis. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 2013;50(1):23-36.
 41. Knaus W, Draper E, Wagner D, Zimmerman J. APACHE II: a severity of disease classification system. *Intensive Care Med.* 1985;13(10):818-828.
 42. Lambden S, Laterre PF, Levy MM, Francois B. The SOFA score - Development, utility and challenges of accurate assessment in clinical trials. *Crit Care.* 2019;23(1):1-9.
 43. Okasha A, Rofaeel A, El-Medany S, Shaker S. Prognostic validity and reliability of the SOFA score in multiple trauma. *Alexandria J Anesth Intensive Care.* 2004;7:3-9.
 44. Trancă SD, Petrișor CL, Hagău N. Biomarkers in polytrauma induced systemic inflammatory response syndrome and sepsis - a narrative review. *Rom J Anaesth intensive care.* 2014;21(2):118-122.
 45. Raith EP, Udy AA, Bailey M, et al. Prognostic accuracy of the SOFA score, SIRS criteria, and qSOFA score for in-hospital mortality among adults with suspected infection admitted to the intensive care unit. *JAMA - J Am Med Assoc.* 2017;317(3):290-300.
 46. Paffrath T, Lefering R, Flohe S. How to define severely injured patients?— An Injury Severity Score (ISS) based approach alone is not sufficient. Published online 2014:64-69.
 47. Kaukonen KM, Bailey M, Suzuki S, Pilcher D, Bellomo R. Mortality related to severe sepsis and septic shock among critically ill patients in Australia and New Zealand, 2000-2012. *Jama.* 2014;311(13):1308-1316.
 48. Rello J, Valenzuela-Sánchez F, Ruiz-Rodríguez M, Moyano S. Sepsis: A Review of Advances in Management. *Adv Ther.* 2017;34(11):2393-2411.
 49. Marik PE, Pastores SM, Annane D, et al. Recommendations for the diagnosis and management of corticosteroid insufficiency in critically ill adult patients: Consensus statements from an international task force by the American College of Critical Care Medicine. *Crit Care Med.* 2008;36(6):1937-1949.
 50. Abdallah MS. The Best Use of Systemic Corticosteroids in the Intensive Care Units, Review. *J Steroids Horm Sci.* 2015;06(01):1-6.
 51. Rai V, Mathews G, Agrawal D. Translational and Clinical Significance of DAMPs, PAMPs, and PRRs in Trauma-induced Inflammation. *Arch Clin Biomed Res.* 2022;06(05):673-685.
 52. Midwood KS, Piccinini AM. DAMPening inflammation by modulating TLR signalling. *Mediators Inflamm.* 2010;(671295):1-21.
 53. Wallach D, Kang TB, Dillon CP, Green DR. Programmed necrosis in inflammation: Toward identification of the effector molecules. *Science (80-).* 2016;352(6281).

54. Gi M, Im W, Hong S. Dendritic cells as danger-recognizing biosensors. *Sensors*. 2009;9(9):6730-6751.
55. Zhang Y, Ning B, tao. Signaling pathways and intervention therapies in sepsis. *Signal Transduct Target Ther*. 2021;6(1).
56. Raeven P, Zipperle J, Drechsler S. Extracellular vesicles as markers and mediators in sepsis. *Theranostics*. 2018;8(12):3348-3365.
57. Margraf A, Ley K, Zarbock A. Neutrophil Recruitment: From Model Systems to Tissue-Specific Patterns. *Trends Immunol*. 2019;40(7):613-634.
58. Maghazachi A. Role of Chemokines in the Biology of Natural Killer Cells. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2010;341:37-57.
59. Schwartz AB, Campos OA, Criado-Hidalgo E, et al. Elucidating the Biomechanics of Leukocyte Transendothelial Migration by Quantitative Imaging. *Front Cell Dev Biol*. 2021;9(635263):1-15.
60. Ince C, Mayeux PR, Nguyen T, et al. The endothelium in sepsis. *Shock*. 2016;45(3):259-270.
61. Joffre J, Hellman J, Ince C, Ait-Oufella H. Endothelial responses in sepsis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2020;202(3):361-370.
62. Souto FO, Alves-Filho JC, Turato WM, Auxiliadora-Martins M, Basile-Filho A, Cunha FQ. Essential role of CCR2 in neutrophil tissue infiltration and multiple organ dysfunction in sepsis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011;183(2):234-242.
63. Van Linthout S, Miteva K, Tschöpe C. Crosstalk between fibroblasts and inflammatory cells. *Cardiovasc Res*. 2014;102(2):258-269.
64. Mai J, Virtue A, Shen J, Wang H, Yang XF. An evolving new paradigm: Endothelial cells - Conditional innate immune cells. *J Hematol Oncol*. 2013;6(1):1-13.
65. Chousterman BG, Arnaud M. Is there a role for hematopoietic growth factors during sepsis? *Front Immunol*. 2018;9(1015):1-11.
66. Wheeler DS. Death to sepsis: Targeting apoptosis pathways in sepsis. *Crit Care*. 2009;13(6):13-15.
67. David BA, Kubes P. Exploring the complex role of chemokines and chemoattractants in vivo on leukocyte dynamics. *Immunol Rev*. 2019;289(1):9-30.
68. Wibke Schulte, Jürgen Bernhagen and RB. Cytokines in Sepsis: Potent Immunoregulators and Potential Therapeutic Targets—An Updated View. *Mediators Inflamm*. 2013;2013(165974).
69. Chaudhry H, Zhou J, Zhong Y, et al. Role of cytokines as a double-edged sword in sepsis. *In Vivo (Brooklyn)*. 2013;27(6):669-684.
70. Ciriello V, Gudipati S, Stavrou PZ, Kanakaris NK, Bellamy MC, Giannoudis P V. Biomarkers predicting sepsis in polytrauma patients: Current evidence. *Injury*. 2013;44(12):1680-1692.
71. Schulte W, Bernhagen J, Bucala R. Cytokines in sepsis: Potent immunoregulators and potential therapeutic targets - An updated view. *Mediators Inflamm*. 2013;2013.
72. Pierrakos C, Vincent JL. Sepsis biomarkers: A review. *Crit Care*. 2010;14(1):1-18.

73. Brady J, Horie S, Laffey JG. Role of the adaptive immune response in sepsis. *Intensive Care Med Exp.* 2020;8(Suppl 1):1-19.
74. Ai Z, Udalova IA. Transcriptional regulation of neutrophil differentiation and function during inflammation. *J Leukoc Biol.* 2020;107(3):419-430.
75. Mortaz E, Alipoor SD, Adcock IM, Mumby S, Koenderman L. Update on neutrophil function in severe inflammation. *Front Immunol.* 2018;9:2171.
76. Hidalgo A, Chilvers ER, Summers C, Koenderman L. The Neutrophil Life Cycle. *Trends Immunol.* 2019;40(7):584-597.
77. Grieshaber-Bouyer R, Nigrovic PA. Neutrophil heterogeneity as therapeutic opportunity in immune-mediated disease. *Front Immunol.* 2019;10(346):1-13.
78. Silvestre-Roig C, Fridlender ZG, Glogauer M, Scapini P. Neutrophil Diversity in Health and Disease. *Trends Immunol.* 2019;40(7):565-583.
79. Al Duhailib Z, Farooqi M, Piticaru J, Alhazzani W, Nair P. The role of eosinophils in sepsis and acute respiratory distress syndrome: a scoping review. *Can J Anesth.* 2021;68(5):715-726.
80. Shah H, Eisenbarth S, Tormey CA, Siddon AJ. Behind the scenes with basophils: an emerging therapeutic target. *Immunother Adv.* 2021;1(1):1-15.
81. Bernward P, Flieger D, Ziegler-Heitbrock L. Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood. *Blood.* 1989;74(7):2527-2534.
82. Kapellos TS, Bonaguro L, Gemünd I, et al. Human monocyte subsets and phenotypes in major chronic inflammatory diseases. *Front Immunol.* 2019;10(2035):1-13.
83. Wong KL, Tai JJ yi, Wong W cheong, et al. Gene expression profiling reveals the defining features of the classical , intermediate , and nonclassical human monocyte subsets. 2019;118(5):16-32.
84. Ziegler-heitbrock L, Thomas P, Hofer J. Toward a refined definition of monocyte subsets. 2013;4(23):1-5.
85. Ruiz-alcaraz AJ, Carmona-martínez V, Tristán-manzano M. Characterization of human peritoneal monocyte / macrophage subsets in homeostasis : Phenotype , activities and cytokines expression. 2018;8(12794):1-14.
86. Reinhardt-Heller K, Hirschberg I, Vogl T, Handgretinger R, Holzer U. Characterization of monocyte subtypes regarding their phenotype and development in the context of graft-versus-host disease. *Transpl Immunol.* 2018;50(April):48-54.
87. Yang J, Zhang L, Yu C, Yang X feng, Wang H. Monocyte and macrophage differentiation : circulation inflammatory monocyte as biomarker for inflammatory diseases. Published online 2014:1-9.
88. Boyette LB, MacEdo C, Hadi K, et al. Phenotype, function, and differentiation potential of human monocyte subsets. *PLoS One.* 2017;12:1-20.
89. Italiani P, Boraschi D. From monocytes to M1 / M2 macrophages : phenotypical vs functional differentiation. 2014;5(514):1-22.
90. Ka MB, Dumas A, Textoris J, Mege J louis. Phenotypic diversity and emerging new tools to study macrophage activation in bacterial infectious diseases. *Front Immunol.* 2014;5:1-7.

91. Bouras M, Asehnoune K, Roquilly A. Contribution of dendritic cell responses to sepsis-induced immunosuppression and to susceptibility to secondary pneumonia. *Front Immunol.* 2018;9:1-9.
92. de Roquetaillade C, Dupuis C, Faivre V, Lukaszewicz AC, Brumpt C, Payen D. Monitoring of circulating monocyte HLA-DR expression in a large cohort of intensive care patients: relation with secondary infections. *Ann Intensive Care.* 2022;12(1).
93. Collin M, MCGovern N, Haniffa M. Human dendritic cell subsets. *Immunology.* 2013;140(1):22-30.
94. Villani A, Satija R, Reynolds G, et al. Single-cell RNA-seq reveals new types of human blood dendritic cells, monocytes and progenitors. *Science (80-).* 2017;356(6335).
95. Collin M, Bigley V. Human dendritic cell subsets: an update. *Immunology.* 2018;154(1):3-20.
96. Rhodes JW, Tong O, Harman AN, Turville SG. Human dendritic cell subsets, ontogeny, and impact on HIV infection. *Front Immunol.* 2019;10:1-24.
97. Yin X, Yu H, Jin X, et al. Human Blood CD1c + Dendritic Cells Encompass CD5 high and CD5 low Subsets That Differ Significantly in Phenotype, Gene Expression, and Functions. *J Immunol.* 2017;198(4):1553-1564.
98. Cuenca AG, Delano MJ, Kelly-Scumpia KM, et al. A paradoxical role for myeloid-derived suppressor cells in sepsis and trauma. *Mol Med.* 2011;17(3-4):281-292.
99. Gimeno R, Barquinero J. Myeloid-derived suppressor cells (MDSC): Another player in the orchestra. *Inmunología.* 2011;30(2):45-53.
100. Schwacha MG. $\gamma\delta$ T-cells: Potential regulators of the post-burn inflammatory response. *Burns.* 2009;35(3):318-326.
101. Agerholm R, Bekiaris V. Evolved to protect, designed to destroy: IL-17-producing $\gamma\delta$ T cells in infection, inflammation, and cancer. *Eur J Immunol.* 2021;51(9):2164-2177.
102. Andreu-Ballester JC, Tormo-Calandín C, Garcia-Ballesteros C, et al. Association of $\gamma\delta$ T cells with disease severity and mortality in septic patients. *Clin Vaccine Immunol.* 2013;20(5):738-746.
103. Zambello R, Barià G, Manni S, Piazza F, Semenzato G. NK cells and CD38: Implication for (Immuno)Therapy in Plasma Cell Dyscrasias. *Cells.* 2020;786(9):1-12.
104. Poli A, Michel T, Thérésine M, Andrès E, Hentges F, Zimmer J. CD56bright natural killer (NK) cells: An important NK cell subset. *Immunology.* 2009;126(4):458-465.
105. Ma C, Liu H, Yang S, Li H, Liao X, Kang Y. The emerging roles and therapeutic potential of B cells in sepsis. *Front Pharmacol.* 2022;13:1-19.
106. Eidenschink L, Dizerega G, Rodgers K, Bartlett M, Wells DA, Loken MR. Basal levels of CD34 positive cells in peripheral blood differ between individuals and are stable for 18 months. *Clin Cytom.* 2012;82 B(1):18-25.
107. Patry C, Doniga T, Lenz F, et al. Increased mobilization of mesenchymal stem cells in patients with acute respiratory distress syndrome undergoing extracorporeal membrane oxygenation. *PLoS One.* 2020;15(1):e0227460.
108. Ghazanfari T, Ghaffarpour S, Kariminia A, et al. Circulating mesenchymal stem cells in sulfur mustard-exposed patients with long-term pulmonary complications. *Toxicol Lett.*

- 2019;312:188-194.
109. Iso Y, Yamaya S, Sato T, et al. Distinct Mobilization of Circulating CD271pos Mesenchymal Progenitors from Hematopoietic Progenitors During Aging and After Myocardial Infarction. *Stem Cells Transl Med.* 2012;1:462-468.
 110. Mansilla E, Marín GH, Drago H, et al. Bloodstream Cells Phenotypically Identical to Human Mesenchymal Bone Marrow Stem Cells Circulate in Large Amounts Under the Influence of Acute Large Skin Damage: New Evidence for Their Use in Regenerative Medicine. *Transplant Proc.* 2006;38(3):967-969.
 111. Vogel M, Christow H, Manz I, et al. Distinct dynamics of stem and progenitor cells in blood of polytraumatized patients. 2019;51(4):430-438.
 112. Tondreau T, Meuleman N, Delforge A, et al. Mesenchymal Stem Cells Derived from CD133-Positive Cells in Mobilized Peripheral Blood and Cord Blood: Proliferation, Oct4 Expression, and Plasticity. *Stem Cells.* 2005;23(8):1105-1112.
 113. Hoogduijn MJ, Versteegen MMA, Engela AU, et al. No Evidence for Circulating Mesenchymal Stem Cells in Patients with Organ Injury. 2014;23(19).
 114. Rudhart RWNE, Gebhard EBF. Mesenchymal stem cells in peripheral blood of severely injured patients. *Eur J Trauma Emerg Surg.* 2017;0(0):0.
 115. Marketou ME, Parthenakis FI, Kalyva A, et al. Increased Mobilization of Mesenchymal Stem Cells in Patients With Essential Hypertension: The Effect of Left Ventricular Hypertrophy. *J Clin Hypertens.* 2014;16(12):883-888.
 116. Weber B, Henrich D, Hildebrand F, Marzi I, Leppik L. the Roles of Extracellular Vesicles in Sepsis and Systemic Inflammatory Response Syndrome. *Shock.* 2023;59(2):161-172.
 117. Akers JC, Gonda D, Kim R, Carter BS, Chen CC. Biogenesis of extracellular vesicles (EV): Exosomes, microvesicles, retrovirus-like vesicles, and apoptotic bodies. *J Neurooncol.* 2013;113(1):1-11.
 118. Iba T, Ogura H. Role of extracellular vesicles in the development of sepsis-induced coagulopathy. *J Intensive Care.* 2018;6(1):1-12.
 119. Qiu P, Zhou J, Zhang J, Dong Y, Liu Y. Exosome: The Regulator of the Immune System in Sepsis. *Front Pharmacol.* 2021;12(671164):1-20.
 120. Preciado S, Muntión S, Sánchez-Guijo F. Improving hematopoietic engraftment: Potential role of mesenchymal stromal cell-derived extracellular vesicles. *Stem Cells.* 2021;39(1):26-32.
 121. Mir B, Goettsch C. Extracellular Vesicles as Delivery Vehicles of Specific Cellular Cargo. *Cells.* 2020;9(7).
 122. Mathew M, Zade M, Mezghani N, Patel R, Wang Y, Momen-Heravi F. Extracellular vesicles as biomarkers in cancer immunotherapy. *Cancers (Basel).* 2020;12(10):1-21.
 123. Guedes VA, Devoto C, Leete J, et al. Extracellular Vesicle Proteins and MicroRNAs as Biomarkers for Traumatic Brain Injury. *Front Neurol.* 2020;11(663).
 124. Bartel DP. MicroRNAs: Target Recognition and Regulatory Functions. *Cell.* 2009;136(2):215-233.
 125. Lee P, Lim, Nelson C. Lau, Philip Garrett-Engele, et al. Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature.*

2005;433(1991):769-773.

126. Kawamoto E, Masui-Ito A, Eguchi A, et al. Integrin and Pd-1 Ligand Expression on Circulating Extracellular Vesicles in Systemic Inflammatory Response Syndrome and Sepsis. *Shock*. 2019;52(1):13-22.
127. Shukla P, Rao GM, Pandey G, et al. Therapeutic interventions in sepsis: Current and anticipated pharmacological agents. *Br J Pharmacol*. 2014;171(22):5011-5031.
128. Vicent MJ, Cascales L, Carbajo RJ, Cortés N, Messeguer A, Pérez Payá E. Nanoconjugates as intracorporeal neutralizers of bacterial endotoxins. *J Control Release*. 2010;142(2):277-285.
129. Kim TH, Ku SK, Bae JS. Anti-inflammatory activities of isorhamnetin-3-O-galactoside against HMGB1-induced inflammatory responses in both HUVECs and CLP-induced septic mice. *J Cell Biochem*. 2013;114(2):336-345.
130. Steingrub J, Nathanson BH, Lagu T, Rothberg MB, Lindenauer PK. Effect Of Neuromuscular Blockers On Mortality In Patients With Severe Sepsis. Published online 2011:A2494-A2494.
131. Marques A, Torre C, Pinto R, Sepodes B, Rocha J. Treatment Advances in Sepsis and Septic Shock: Modulating Pro- and Anti-Inflammatory Mechanisms. *J Clin Med*. 2023;12(8).
132. Tohyama S, Onodera S, Tohyama H, et al. A novel DNA vaccine-targeting macrophage migration inhibitory factor improves the survival of mice with sepsis. *Gene Ther*. 2008;15(23):1513-1522.
133. Marshall JC. Why have clinical trials in sepsis failed? *Trends Mol Med*. 2014;20(4):195-203.
134. Vignon P, Laterre PF, Daix T, François B. New Agents in Development for Sepsis: Any Reason for Hope? *Drugs*. 2020;80(17):1751-1761.
135. Martí-Chillón G, Muntión S, Preciado S, et al. Therapeutic potential of mesenchymal stromal/stem cells in critical-care patients with systemic inflammatory response syndrome. *Clin Transl Med*. 2023;13(1).
136. Lu D, Xu Y, Liu Q, Zhang Q. Mesenchymal Stem Cell-Macrophage Crosstalk and Maintenance of Inflammatory Microenvironment Homeostasis. *Front Cell Dev Biol*. 2021;9(June).
137. Dabrowska S, Andrzejewska A, Janowski M, Lukomska B. Immunomodulatory and Regenerative Effects of Mesenchymal Stem Cells and Extracellular Vesicles: Therapeutic Outlook for Inflammatory and Degenerative Diseases. *Front Immunol*. 2021;11(February).
138. Lotfi R, Eisenbacher J, Solgi G, et al. Human mesenchymal stem cells respond to native but not oxidized damage associated molecular pattern molecules from necrotic (tumor) material. *Eur J Immunology*. 2011;41:2021-2028.
139. Haider HK, Jiang S, Idris NM, Ashraf M. IGF-1-overexpressing mesenchymal stem cells accelerate bone marrow stem cell mobilization via paracrine activation of SDF-1 α /CXCR4 signaling to promote myocardial repair. *Circ Res*. 2008;103(11):1300-1308.
140. Koning JJ, Kooij G, de Vries HE, Nolte MA, Mebius RE. Mesenchymal stem cells are mobilized from the bone marrow during inflammation. *Front Immunol*. 2013;4(MAR):1-11.

141. Martin J, Helm K, Ruegg P, Varella-Garcia M, Burnham E, Majka S. Adult lung side population cells have mesenchymal stem cell potential. *Cytotherapy*. 2008;10(2):140-151.
142. Ren G, Zhang L, Zhao X, et al. Article Mesenchymal Stem Cell-Mediated Immunosuppression Occurs via Concerted Action of Chemokines and Nitric Oxide. 2008;7(2):141-150.
143. Kyurkchiev D, Bochev I, Ivanova-Todorova E, et al. Secretion of immunoregulatory cytokines by mesenchymal stem cells. *World J Stem Cells*. 2014;6(5):552-570.
144. Müller L, Tunger A, Wobus M, et al. Immunomodulatory Properties of Mesenchymal Stromal Cells: An Update. *Front Cell Dev Biol*. 2021;9(637725):1-9.
145. Shi Y, Su J, Roberts AI, Shou P, Rabson AB and RG. How mesenchymal stem cells interact with tissue immune responses. *Trends Immunol*. 2012;33(3):136-143.
146. Song N, Scholtemeijer M SK. Mesenchymal Stem Cell Immunomodulation: Mechanisms and Therapeutic potential. *Trends Pharmacol Sci*. 2020;41(9):653-664.
147. Németh K, Leelahavanichkul A, Yuen PST, et al. Bone marrow stromal cells attenuate sepsis via prostaglandin E 2-dependent reprogramming of host macrophages to increase their interleukin-10 production. *Nat Med*. 2009;15(1):42-49.
148. Tasso R, Ulivi V, Reverberi D, Lo Sicco C, Descalzi F, Cancedda R. In vivo implanted bone marrow-derived mesenchymal stem cells trigger a cascade of cellular events leading to the formation of an ectopic bone regenerative niche. *Stem Cells Dev*. 2013;22(24):3178-3191.
149. Braza F, Dirou S, Forest V, et al. Mesenchymal Stem Cells Induce Suppressive Macrophages Through Phagocytosis in a Mouse Model of Asthma. *Stem Cells*. 2016;34(7):1836-1845.
150. Weiss ARR, Dahlke MH. Immunomodulation by Mesenchymal Stem Cells (MSCs): Mechanisms of action of living, apoptotic, and dead MSCs. *Front Immunol*. 2019;10(1191):1-10.
151. Chiossone L, Conte R, Spaggiari GM, et al. Mesenchymal Stromal Cells Induce Peculiar Alternatively Activated Macrophages Capable of Dampening Both Innate and Adaptive Immune Responses. *Stem Cells*. 2016;34:1909-1921.
152. Watt SM, Gullo F, Garde M Van Der. The angiogenic properties of mesenchymal stem / stromal cells and their therapeutic potential. *Br Med Bull*. 2013;108:25-53.
153. Yang Y, Chen QH, Liu AR, Xu XP, Han J Bin, Qiu HB. Synergism of MSC-secreted HGF and VEGF in stabilising endothelial barrier function upon lipopolysaccharide stimulation via the Rac1 pathway. *Stem Cell Res Ther*. 2015;6(1):1-14.
154. Rockel JS, Rabani R, Viswanathan S. Anti-fibrotic mechanisms of exogenously-expanded mesenchymal stromal cells for fibrotic diseases. *Semin Cell Dev Biol*. 2020;101:87-103.
155. Rocheteau P, Chatre L, Briand D, et al. Sepsis induces long-term metabolic and mitochondrial muscle stem cell dysfunction amenable by mesenchymal stem cell therapy. *Nat Commun*. 2015;6(10145):1-12.
156. Brooke G, Cook M, Blair C, et al. Therapeutic applications of mesenchymal stromal cells. *Semin Cell Dev Biol*. 2007;18(6):846-858.

157. Laroye C, Gibot S, Reppel L, Bensoussan D. Concise Review: Mesenchymal Stromal/Stem Cells: A New Treatment for Sepsis and Septic Shock? *Stem Cells*. 2017;35(12):2331-2339.
158. Kalina T, Flores-Montero J, Van Der Velden VHJ, et al. EuroFlow standardization of flow cytometer instrument settings and immunophenotyping protocols. *Leukemia*. 2012;26(9):1986-2010.
159. Van der Pan K, de Bruin-Versteeg S, Damasceno D, et al. Development of a standardized and validated flow cytometry approach for monitoring of innate myeloid immune cells in human blood. *Front Immunol*. 2022;13:1-26.
160. Van Dongen JJM, Lhermitte L, Böttcher S, et al. EuroFlow antibody panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes. *Leukemia*. 2012;26(9):1908-1975.
161. Théry C, Clayton A, Amigorena S, Raposo G. Isolation and Characterization of Exosomes from Cell Culture Supernatants. *Curr Protoc Cell Biol*. 2006;3.22:22-29.
162. Vlachos IS, Zagganas K, Paraskevopoulou MD, et al. DIANA-miRPath v3.0: Deciphering microRNA function with experimental support. *Nucleic Acids Res*. 2015;43:1-25.
163. Kozomara A, Birgaoanu M, Griffiths-Jones S. MiRBase: From microRNA sequences to function. *Nucleic Acids Res*. 2019;47(D):155-162.
164. Nedeva C, Menassa J, Puthalakath H. Sepsis: Inflammation is a necessary evil. *Front Cell Dev Biol*. 2019;7(JUN):1-12.
165. Rubio I, Osuchowski MF, Shankar-Hari M, et al. Current gaps in sepsis immunology: new opportunities for translational research. *Lancet Infect Dis*. 2019;19(12):e422-e436.
166. Visser T, Pillay J, Pickkers P, Leenen LPH, Koenderman L. Homology in systemic neutrophil response induced by human experimental endotoxemia and by trauma. *Shock*. 2012;37(2):145-151.
167. van den Bossche WBL, Rykov K, Teodosio C, et al. Flow cytometric assessment of leukocyte kinetics for the monitoring of tissue damage. *Clin Immunol*. 2018;197:224-230.
168. Gołąbek-dropiewska K, Pawłowska J, Witkowski J, et al. Analysis of selected pro- and anti-inflammatory cytokines in patients with multiple injuries in the early period after trauma. 2018;43(1):42-49.
169. Relja B, Land WG. Damage-associated molecular patterns in trauma. *Eur J Trauma Emerg Surg*. 2020;46(4):751-775.
170. Dong X, Wang C. Early alterations of circulating immune cell counts in severe trauma patients are related to later occurrence of nosocomial infection , sepsis and mortality. :1-27.
171. Hoser GA, Skirecki T, Złotorowicz M, Zielińska-Borkowska U, Kawiak J. Absolute counts of peripheral blood leukocyte subpopulations in intraabdominal sepsis and pneumonia-derived sepsis: A pilot study. *Folia Histochem Cytobiol*. 2012;50(3):420-426.
172. Pillay J, Ramakers BP, Kamp VM, et al. Functional heterogeneity and differential priming of circulating neutrophils in human experimental endotoxemia. *J Leukoc Biol*. 2010;88(1):211-220.
173. Elghetany MT. Surface antigen changes during normal neutrophilic development: A critical review. *Blood Cells, Mol Dis*. 2002;28(2):260-274.

174. Hübl W, Andert S, Thum G, Ortner S, Bayer PM. Value of neutrophil CD16 expression for detection of left shift and acute-phase response. *Am J Clin Pathol*. 1997;107(2):187-196.
175. Leliefeld PHC, Pillay J, Vrisekoop N, et al. Differential antibacterial control by neutrophil subsets. *Blood Adv*. 2018;2(11):1344-1354.
176. Mortaz E, Zadian SS, Shahir M, et al. Does Neutrophil Phenotype Predict the Survival of Trauma Patients? *Front Immunol*. 2019;10(September):1-14.
177. Leliefeld PHC, Wessels CM, Leenen LPH, Koenderman L, Pillay J. The role of neutrophils in immune dysfunction during severe inflammation. *Crit Care*. 2016;20(1):1-9.
178. Shen X, Cao K, Zhao Y, Du J. Targeting Neutrophils in Sepsis: From Mechanism to Translation. *Front Pharmacol*. 2021;12(April):1-11.
179. Kovtun A, Messerer DAC, Scharffetter-Kochanek K, Huber-Lang M, Ignatius A. Neutrophils in tissue trauma of the skin, bone, and lung: Two sides of the same coin. *J Immunol Res*. 2018;2018.
180. Pillay J, Kamp VM, Van Hoffen E, et al. A subset of neutrophils in human systemic inflammation inhibits T cell responses through Mac-1. *J Clin Invest*. 2012;122(1):327-336.
181. Spijkerman R, Hesselink L, Bongers S, et al. Point-of-Care Analysis of Neutrophil Phenotypes: A First Step Toward Immuno-Based Precision Medicine in the Trauma ICU. *Crit Care Explor*. 2020;2(7):e0158.
182. Iba T, Hashiguchi N, Nagaoka I, Tabe Y, Murai M. Neutrophil cell death in response to infection and its relation to coagulation. *J Intensive Care*. 2013;1(1):1-10.
183. Semerad CL, Liu F, Gregory AD, Stumpf K, Link DC. G-CSF is an essential regulator of neutrophil trafficking from the bone marrow to the blood. *Immunity*. 2002;17(4):413-423.
184. Austermann J, Roth J, Barczyk-Kahlert K. The Good and the Bad: Monocytes' and Macrophages' Diverse Functions in Inflammation. *Cells*. 2022;11(12).
185. Wildgruber M, Aschenbrenner T, Wendorff H, et al. monocyte subset increases in severe peripheral artery disease in humans. *Nat Publ Gr*. 2016;(November):1-8.
186. Krychtiuk KA, Lenz M, Koller L, et al. Monocyte subset distribution is associated with mortality in critically ill patients. *Thromb Haemost*. 2016;116(5):949-957.
187. West SD, Goldberg D, Ziegler A, Krencicki M, Clos TW Du, Mold C. Transforming Growth Factor- b , Macrophage Colony- Stimulating Factor and C-Reactive Protein Levels Correlate with CD14 high CD16 + Monocyte Induction and Activation in Trauma Patients. 2012;7(12).
188. Gainaru G, Papadopoulos A, Tsangaris I, Lada M, Giamarellos-Bourboulis EJ, Pistiki A. Increases in inflammatory and CD14dim/CD16pos/CD45pos patrolling monocytes in sepsis: Correlation with final outcome. *Crit Care*. 2018;22(1):1-9.
189. Li Z, Wu X, Wu X, et al. Admission circulating monocytes level is an independent predictor of outcome in traumatic brain injury. *Brain Inj*. 2018;00(00):1-8.
190. Merah-Mourah F, Cohen SO, Charron D, Mooney N, Haziot A. Identification of Novel Human Monocyte Subsets and Evidence for Phenotypic Groups Defined by Interindividual Variations of Expression of Adhesion Molecules. *Sci Rep*. 2020;10(1):1-16.
191. Shin JS, Greer AM. The role of FcεRI expressed in dendritic cells and monocytes. *Cell Mol*

Life Sci. 2015;72(12):2349-2360.

192. Hofer TP, van de Loosdrecht AA, Stahl-Hennig C, Cassatella MA, Ziegler-Heitbrock L. 6-Sulfo LacNAc (Slan) as a Marker for Non-classical Monocytes. *Front Immunol.* 2019;10(September):10-19.
193. Canton J, Neculai D, Grinstein S. Scavenger receptors in homeostasis and immunity. *Nat Rev Immunol.* 2013;13(9):621-634.
194. Ivetic A, Green HLH, Hart SJ. L-selectin: A major regulator of leukocyte adhesion, migration and signaling. *Front Immunol.* 2019;10(MAY):1-22.
195. Vester H, Dargatz P, Wagner SH, Biberthaler P, Griensven M Van. HLA - DR expression on monocytes is decreased in polytraumatized patients. *Eur J Med Res.* Published online 2015:1-9.
196. West SD, Mold C, Ph D. Monocyte Deactivation Correlates With Injury Severity Score , But Not With Heme Oxygenase-1 Levels in Trauma Patients. *J Surg Res.* 2012;172(1):5-10.
197. Conway Morris A, Anderson N, Brittan M, et al. Combined dysfunctions of immune cells predict nosocomial infection in critically ill patients. *Br J Anaesth.* 2013;111(5):778-787.
198. Cheron A, Floccard B, Allaouchiche B, et al. Lack of recovery in monocyte human leukocyte antigen-DR expression is independently associated with the development of sepsis after major trauma. *Crit Care.* 2010;14(6):R208.
199. Almansa R, Martín S, Martín-Fernandez M, et al. Combined quantification of procalcitonin and HLA-DR improves sepsis detection in surgical patients. *Sci Rep.* 2018;8(1):1-9.
200. Tschoeke SK, Ertel W. Immunoparalysis after multiple trauma. *Injury.* 2007;38(12):1346-1357.
201. Wang G, Li X, Zhang L, Abdalla AE, Teng T, Li Y. Crosstalk between dendritic cells and immune modulatory agents against sepsis. *Genes (Basel).* 2020;11(3).
202. Wong CHY, Heit B, Kubes P. Molecular regulators of leucocyte chemotaxis during inflammation. *Cardiovasc Res.* 2010;86(2):183-191.
203. Park I, Kim M, Choe K, et al. Neutrophils disturb pulmonary microcirculation in sepsis-induced acute lung injury. *Eur Respir J.* 2019;53(3).
204. Tang AL, Peng Y, Shen MJ, et al. Prognostic role of elevated VEGF in sepsis: A systematic review and meta-analysis. *Front Physiol.* 2022;13(July):1-8.
205. Schuetz P, Jones AE, Aird WC, Shapiro NI. Endothelial cell activation in emergency department patients with sepsis-related and non-sepsis-related hypotension. *Shock.* 2011;36(2):104-108.
206. Girardot T, Rimmelé T, Venet F, Monneret G. Apoptosis-induced lymphopenia in sepsis and other severe injuries. *Apoptosis.* 2017;22(2):295-305.
207. Karki R, Sharma BR, Tuladhar S, et al. Synergism of TNF- α and IFN- γ Triggers Inflammatory Cell Death, Tissue Damage, and Mortality in SARS-CoV-2 Infection and Cytokine Shock Syndromes. *Cell.* 2021;184(1):149-168.e17.
208. Oberholzer A, Steckholzer U, Kurimoto M, Trentz O, Ertel W. Oberholzer A , Steckholzer U , Kurimoto M , et al. Interleukin-18 plasma levels are increased in patients with sepsis

- compared to severely injured patients. *Shock*. 2001;16(6):411-414.
209. Guo R, Wang H, Cui N. Autophagy Regulation on Pyroptosis: Mechanism and Medical Implication in Sepsis. *Mediators Inflamm*. 2021;2021.
 210. Paunel-Görgülü A, Flohé S, Scholz M, Windolf J, Lögters T. Increased serum soluble Fas after major trauma is associated with delayed neutrophil apoptosis and development of sepsis. *Crit Care*. 2011;15(1):1-10.
 211. Pelka K, Nardo D De. Chapter 1 Emerging Concepts in Innate Immunity. 2018;1714.
 212. Heffernan DS, Monaghan SF, Thakkar RK, Machan JT, Cioffi WG, Ayala A. Failure to normalize lymphopenia following trauma is associated with increased mortality, independent of the leukocytosis pattern. *Crit Care*. 2012;16(1):R12.
 213. Hohlstein P, Gussen H, Bartneck M, et al. Prognostic relevance of altered lymphocyte subpopulations in critical illness and sepsis. *J Clin Med*. 2019;8(3).
 214. Volpin G, Cohen M, Assaf M, et al. Cytokine Levels (IL-4 , IL-6 , IL-8 and TGF β) as Potential Biomarkers of Systemic Inflammatory Response in Trauma Patients. Published online 2014:1303-1309.
 215. Lvovschi V, Arnaud L, Parizot C, et al. Cytokine profiles in sepsis have limited relevance for stratifying patients in the emergency department: A prospective observational study. *PLoS One*. 2011;6(12).
 216. Rincon JC, Efron PA, Moldawer LL. Immunopathology of chronic critical illness in sepsis survivors: Role of abnormal myelopoiesis. *J Leukoc Biol*. 2022;112(6):1525-1534.
 217. Livingston DH, Anjaria D, Wu J, Hauser CJ. Bone Marrow Failure Following Severe Injury in Humans. 2003;238(5):748-753.
 218. Kristin M Cook, Ziad C Sifri, Gregg M Baranski, Alicia M Mohr and DHL. The Role of Plasma G-CSF and Bone Marrow Dysfunction after Severe Trauma. *J Am Coll Surg*. 2013;216:57-64.
 219. Jain A, Khadwal A, Sachdeva MUS, et al. Variables affecting the presence of mesenchymal stromal cells in peripheral blood and their relationship with apheresis products. *Br J Haematol*. 2020;189(4):772-776.
 220. Ritz U, Spies V, Mehling I, Gruszka D, Rommens PM, Hofmann A. Mobilization of CD34+ progenitor cells in patients with severe trauma. *PLoS One*. 2014;9(5).
 221. Alm JJ, Koivu HMA, Heino TJ, Hentunen TA, Laitinen S, Aro HT. Circulating Plastic Adherent Mesenchymal Stem Cells in Aged Hip Fracture Patients * , **. 2010;(DECEMBER):6-8.
 222. Kapor S, Santibanez JF. Myeloid-derived suppressor cells and mesenchymal stem/stromal cells in myeloid malignancies. *J Clin Med*. 2021;10(13).
 223. Manson J, Cole E, De'Ath HD, et al. Early changes within the lymphocyte population are associated with the development of multiple organ dysfunction syndrome in trauma patients. *Crit Care*. 2016;20:176.
 224. Osuchowski MF, Welch K, Siddiqui J, Remick DG. Circulating Cytokine/Inhibitor Profiles Reshape the Understanding of the SIRS/CARS Continuum in Sepsis and Predict Mortality. *J Immunol*. 2006;177(3):1967-1974.
 225. Boomer JS, Shuherk-Shaffer J, Hotchkiss RS, Green JM. A prospective analysis of

- lymphocyte phenotype and function over the course of acute sepsis. *Crit Care*. 2012;16(3).
226. Boomer JS, To K, Chang KC, et al. Immunosuppression in patients who die of sepsis and multiple organ failure. *Jama*. 2011;306(23):2594-2605.
 227. Kim M, Kim M, Jeong H, et al. Hyporesponsiveness of natural killer cells and impaired inflammatory responses in critically ill patients. *BMC Immunol*. 2017;18(1):1-7.
 228. Paraschos MD, Patrani M, Pistiki A, et al. Defective cytokine production early after multiple traumas: Modulation in severe sepsis. *Cytokine*. 2015;76(2):222-226.
 229. Warny M, Helby J, Nordestgaard BG, Birgens H, Bojesen SE. Lymphopenia and risk of infection and infection-related death in 98,344 individuals from a prospective Danish population-based study. *PLoS Med*. 2018;15(11):1-22.
 230. Corry J, Kettenburg G, Upadhyay AA, et al. Infiltration of inflammatory macrophages and neutrophils and widespread pyroptosis in lung drive influenza lethality in nonhuman primates. *PLoS Pathog*. 2022;18(3):1-21.
 231. Stassi C, Mondello C, Baldino G, Spagnolo EV. Post-mortem investigations for the diagnosis of sepsis: A review of literature. *Diagnostics*. 2020;10(10).
 232. Kuravi SJ, Yates CM, Foster M, et al. Changes in the pattern of plasma extracellular vesicles after severe trauma. *PLoS One*. 2017;12(8):1-17.
 233. Im Y, Yoo H, Lee JY, Park J, Suh GY, Jeon K. Association of plasma exosomes with severity of organ failure and mortality in patients with sepsis. *J Cell Mol Med*. 2020;24(16):9439-9445.
 234. Real JM, Ferreira LRP, Esteves GH, et al. Exosomes from patients with septic shock convey miRNAs related to inflammation and cell cycle regulation: New signaling pathways in sepsis? *Crit Care*. 2018;22(1):1-11.
 235. O'Dea KP, Porter JR, Tirlapur N, et al. Circulating microvesicles are elevated acutely following major burns injury and associated with clinical severity. *PLoS One*. 2016;11(12):1-17.
 236. Weber B, Franz N, Marzi I, Henrich D, Leppik L. Extracellular vesicles as mediators and markers of acute organ injury: current concepts. *Eur J Trauma Emerg Surg*. 2022;48(3):1525-1544.
 237. Murao A, Brenner M, Aziz M, Wang P. Exosomes in Sepsis. *Front Immunol*. 2020;11(September):1-9.
 238. Šibíková M, Živný J, Janota J. Cell membrane-derived microvesicles in systemic inflammatory response. *Folia Biol (Czech Republic)*. 2018;64(4):113-124.
 239. Tacke F, Roderburg C, Benz F, et al. Levels of circulating mir-133a are elevated in sepsis and predict mortality in critically ill patients. *Crit Care Med*. 2014;42(5):1096-1104.
 240. Parlato M, Cavaillon JM. *Host Response Biomarkers in the Diagnosis of Sepsis: A General Overview*. Vol 1237.; 2014.
 241. Guisasola MC, Chana F. An overview of cytokines and heat shock response in polytraumatized patients. Published online 2018:483-489.
 242. Kim H, Hur M, Moon HW, Yun YM, Di Somma S. Multi-marker approach using procalcitonin, presepsin, galectin-3, and soluble suppression of tumorigenicity 2 for the

- prediction of mortality in sepsis. *Ann Intensive Care*. 2017;7(1):1-9.
243. Jaffer U, Wade RG, Gourlay T. 2010 Jaffer Cytok in SIRS Review. 2010;2(1).
244. Cruz-Topete D, Cidlowski JA. One hormone, two actions: Anti- And pro-inflammatory effects of glucocorticoids. *Neuroimmunomodulation*. 2014;22:20-32.
245. Djillali Annane 1, Eric Bellissant, Pierre-Edouard Bollaert, Josef Briegel, Marco Confalonieri, Raffaele De Gaudio, Didier Keh, Yizhak Kupfer, Michael Oppert GUM. Corticosteroids in the Treatment of Severe Sepsis and Septic Shock in Adults: A Systematic Review. *J Emerg Med*. 2009;37(4):459.
246. Rochweg B, Oczkowski SJ, Siemieniuk RAC, et al. Corticosteroids in Sepsis: An Updated Systematic Review and Meta-Analysis. *Crit Care Med*. 2018;46(9):1411-1420.
247. Vandewalle J, Libert C. Glucocorticoids in Sepsis: To Be or Not to Be. *Front Immunol*. 2020;11(July):1-14.
248. Aziz M, Wang P. Glucocorticoid resistance and hyperlactatemia: A tag team to worsen sepsis. *Cell Metab*. 2021;33(9):1717-1718.
249. Katarina Le Blanc, Francesco Frassoni, Lynne Ball, Franco Locatelli, Helene Roelofs, Ian Lewis, Edoardo Lanino, Berit Sundberg, Maria Ester Bernardo, Mats Remberger, Giorgio Dini, R Maarten Egeler, Andrea Bacigalupo, Willem Fibbe OR. Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease : a phase II study. *Lancet*. 2008;371:1579-1586.
250. Duijvestein M, Vos ACW, Roelofs H, et al. Autologous bone marrow-derived mesenchymal stromal cell treatment for refractory luminal Crohn ' s disease : results of a phase I study. *Inflamm bowel Dis*. Published online 2010.
251. L GJ and S. Mesenchymal stromal cells: clinical challenges and therapeutic opportunities. *Cell Stem Cell*. 2018;22(6):824-833.
252. López R, Martí-Chillón GJ, Blanco JF, et al. MSCs from polytrauma patients: preliminary comparative study with MSCs from elective-surgery patients. *Stem Cell Res Ther*. 2021;12(1):1-11.
253. Gore A V., Bible LE, Livingston DH, Mohr AM, Sifri ZC. Mesenchymal stem cells reverse bone marrow dysfunction following injury and stress. *J Trauma Acute Care Surg*. 2015;79(4):602-608.
254. Blanc K Le, Davies LC. Mesenchymal stromal cells and the innate immune response. *Immunol Lett*. Published online 2015:1-7.
255. Yan Z, Zhuansun Y, Chen R, Li J, Ran P. Immunomodulation of mesenchymal stromal cells on regulatory T cells and its possible mechanism. *Exp Cell Res*. 2014;324(1):65-74.
256. Radzyukevich Y V., Kosyakova NI, Prokhorenko IR. Participation of Monocyte Subpopulations in Progression of Experimental Endotoxemia (EE) and Systemic Inflammation. *J Immunol Res*. 2021;2021(phase III).
257. Wynn PJM and TA. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat Rev Immunol*. 2012;11(11):723-737.
258. Susek KH, Karvouni M, Alici E, Lundqvist A. The role of CXC chemokine receptors 1–4 on immune cells in the tumor microenvironment. *Front Immunol*. 2018;9(September):1-9.
259. Chen X, Liu Y, Gao Y, Shou S, Chai Y. The roles of macrophage polarization in the host

- immune response to sepsis. *Int Immunopharmacol*. 2021;96(May):107791.
260. Eggenhofer E, Hoogduijn MJ. Mesenchymal stem cell-educated macrophages. 2012;1(1):1.
 261. Xiaochuan Chen, Bo Yang, Jun Tian, Hong Hong, Yu Du, Kun Li, Xin Li, Nan Wang, Xiaoqi Yu XW. Dental Follicle Stem Cells Ameliorate Lipopolysaccharide-Induced Inflammation by Secreting TGF- β 3 and TSP-1 to Elicit Macrophage M2 Polarization. *Cell Physiol Biochem*. 2018;51:2290-2308.
 262. Liu H, Liang Z, Wang F, et al. Exosomes from mesenchymal stromal cells reduce murine colonic inflammation via a macrophage-dependent mechanism. *JCI Insight*. 2019;4(24).
 263. Galipeau J. Macrophages at the nexus of mesenchymal stromal cell potency: The emerging role of chemokine cooperativity. *Stem Cells*. 2021;39(9):1145-1154.
 264. Espagnol N, Adélie B, Emmanuelle A, Luc S, Varin A. CD54-Mediated Interaction with Pro-inflammatory Macrophages Increases the Immunosuppressive Function of Human Mesenchymal Stromal Cells. *Stem Cell Reports*. 2017;8:961-976.
 265. Wallace M, Shelkey M. Katz Index of Independence in Activities of Daily Living Katz Index of Independence in Activities of Daily Living (ADL). *MaineHealth*. 2007;(2).
 266. Herdman M, Badia X, Berra S. El EuroQol-5D: una alternativa sencilla para la medición de la calidad de vida relacionada con la salud en atención primaria. *Atención Primaria*. 2001;28(6):425-429.

10. ANEXOS

Figuras Suplementarias

Figura Suplementaria 1. Modelo de la hoja de información al paciente y del consentimiento informado empleado para la obtención de muestras.



HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE

Se le ofrece la posibilidad de participar en el proyecto de investigación titulado "Evaluación dinámica de las células mesenquimales, las vesículas extracelulares y el sistema inmune en pacientes críticos de cuidados intensivos: de la fisiopatología al potencial tratamiento", que está siendo realizado por el Dr. Fermín Sánchez-Guljo Martín como investigador principal del mismo, del Servicio de Hematología y Hemoterapia del Hospital Universitario Salamanca, y que ha sido ya evaluado y aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Universitario de Salamanca. Este proyecto está subvencionado por el Instituto de Salud Carlos III del Ministerio de Ciencia e Innovación.

Resumen

Entre las áreas de mayor potencial aplicación del empleo de células como tratamiento de enfermedades (la terapia celular) están las enfermedades en cuyo origen hay problemas del sistema inmunitario o trastornos inflamatorios. Para estas enfermedades, actualmente la mayoría de los tratamientos son poco específicos y tienen notables efectos secundarios. Por ello, una alternativa novedosa que está estudiando en la actualidad es el empleo de un tipo de células que está presente en la médula ósea (que está dentro de huesos como la pelvis o el esternón), que se llaman células mesenquimales, y que abreviaremos como MSC. Estas células mejoran la reparación de los tejidos dañados y reducen la inflamación. Pero antes de poder emplearlas en cualquier enfermedad, es importante conocer en detalle las alteraciones que se producen en la misma, y cómo se encuentran estas células y el sistema inmunitario. Este es el objetivo fundamental de este proyecto de investigación, que se centra en una de las complicaciones médicas más graves, donde la inflamación masiva está presente, y que es el centro del presente proyecto. En muchos pacientes que ingresan en la unidad de cuidados intensivos se produce lo que se llama "síndrome de respuesta inflamatoria sistémica-SIRS", que está causado por un incremento masivo de la inflamación, y que tiene notable gravedad. En este proyecto se pretende evaluar la situación del sistema inmune y los marcadores de inflamación, la presencia de células mesenquimales en la sangre y otros parámetros en pacientes que ingresan en la Unidad de Cuidados Intensivos con esta complicación que hemos llamado SIRS anteriormente. Ello nos va a permitir conocer en detalle este proceso, de una forma dinámica, y nos permitirán evaluar posteriormente (en un estudio posterior) la utilidad de la terapia con células mesenquimales en estos pacientes.

¿Cuál es el objetivo de este estudio?

Como se ha indicado, en el presente estudio se pretende analizar la situación de las células del sistema inmune y el valor pronóstico de diversas proteínas y vesículas presentes en la sangre en pacientes que ingresan en cuidados intensivos con un cuadro de SIRS de diverso origen (por ejemplo, después de un traumatismo múltiple por accidente de tráfico o tras una intervención quirúrgica, entre otros). También se estudiará en el laboratorio cómo las células mesenquimales pueden reducir la inflamación en esta situación, pues el objetivo último es valorar si tienen un potencial favorable para ser evaluadas en el futuro en el tratamiento de esta grave complicación.

¿Por qué se le ha pedido que participe?

Se le pide su participación en este estudio porque usted ha ingresado en la Unidad de Cuidados Intensivos con un cuadro inflamatorio generalizado (SIRS), que es el objeto de estudio de este proyecto.



los derechos que le asisten. Al firmar este documento, usted acepta que se utilicen las muestras para los fines de este estudio de investigación.

Las muestras de sangre y médula ósea se procesarán para la obtención de las células y de los factores inflamatorios anteriormente comentados en la en la unidad de Terapia Celular del Hospital Clínico de Salamanca. Se le codificará cada muestra donde se referirán todos los datos recogidos a lo largo del estudio al cual solo tendrá acceso el personal investigador y autorizado. En el caso de que parte del contenido de las muestras se analice por terceros, la comunicación de resultados se realizará sólo a través del número asignado a las muestras, asegurando siempre el anonimato. Las muestras se almacenarán en un congelador para analizarlo antes de tres años desde la firma del presente documento. Tras dicho periodo, si las muestras no han sido analizadas se procederá a su destrucción.

¿En qué consiste su participación? ¿Qué tipo de pruebas o procedimientos se le realizarán?

Para realizar este estudio se requiere la extracción de muestras de sangre en tres momentos (aproximadamente 20 mililitros en cada momento): tras su ingreso en Cuidados Intensivos, a las 24 horas y 72 horas tras el mismo. Si es posible se extraerá una sola muestra de médula ósea (aproximadamente 5 mililitros) mediante punción y aspiración en la parte posterior del hueso de la pelvis o en el esternón con una aguja de pequeño grosor, empleando anestesia local generalmente. En el procedimiento de extracción de médula ósea, el dolor o molestias son mínimas en la mayoría de los pacientes. Las complicaciones asociadas al procedimiento tienen una baja incidencia, siendo posibles: hemorragia/hematoma en la zona de la punción, que en casos raros puede producir compresión y/o irritación nerviosa, infección de la herida, rotura de la aguja de punción y reacción alérgica a la anestesia.

Su participación es completamente voluntaria y ello obviamente no afectará a su tratamiento y nos permitirá conocer mejor el problema médico que padece. Dispondrá de todo el tiempo que necesite para leer, cuestionar todo lo que precise y reflexionar sobre su participación en el proyecto. En el caso de querer participar podrá elegir entre la donación de sangre o de médula ósea, o ambas, manteniendo en todos los casos las mismas garantías descritas.

Si usted lo desea podrá ser informado de los resultados finales de la investigación.

¿Cuáles son los riesgos generales de participar en este estudio?

No se prevé ningún riesgo adicional a los ya mencionados.

Confidencialidad

Todos sus datos, así como toda la información médica relacionada con su enfermedad serán tratados con absoluta confidencialidad por parte del personal encargado de la investigación, de acuerdo con la Ley de Protección de Datos de Carácter Personal (Ley Orgánica 3/2018, BOE 294 del 05/12/2018; Ver Artículos 1 y 2, Objeto y ámbito de aplicación). Asimismo, si los resultados del estudio fueran susceptibles de publicación en revistas científicas, en ningún momento se proporcionarán datos personales de los pacientes que han colaborado en esta investigación (Artículo 97 - Disposición adicional decimoséptima de la citada ley (Tratamientos de datos de salud).

Tal y como contempla la Ley de Protección de Datos de Carácter Personal, podrá ejercer su derecho a acceder, rectificar o cancelar sus datos contactando con el investigador principal de este estudio (Artículos 13, 14 y 15 respectivamente, de la citada ley).

¿Qué datos se van a recoger?

Los datos que precisamos serán edad, sexo y los datos de la enfermedad que presenta usted y motivó su ingreso en Cuidados Intensivos.

Procesado y almacenamiento de las muestras biológicas

Su participación en este estudio conlleva la obtención y utilización de muestras biológicas con fines de investigación, para lo que se observará la Ley 14/2007 de investigación biomédica y el Real Decreto 1716/2011, normativas que garantizan el respeto a

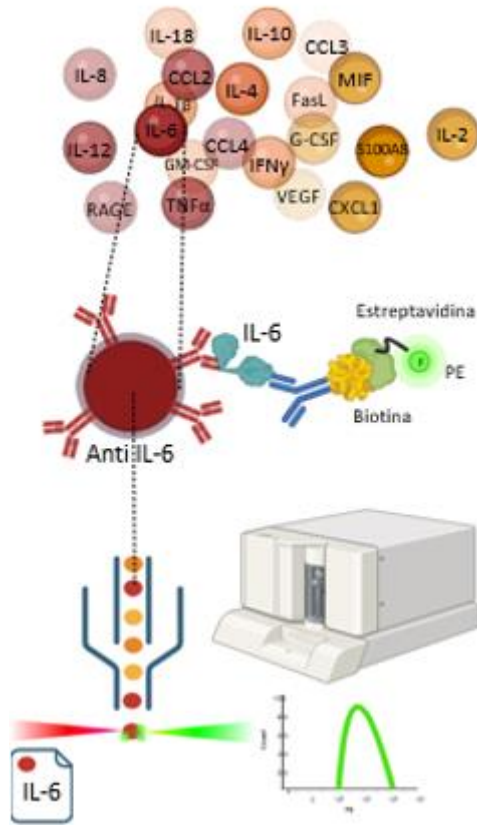


Figura Suplementaria 2. Esquema representativo del protocolo seguido para la cuantificación de citocinas plasmáticas mediante la tecnología de Luminex.

Orígenes del SIRS grupo No Politraumatizados

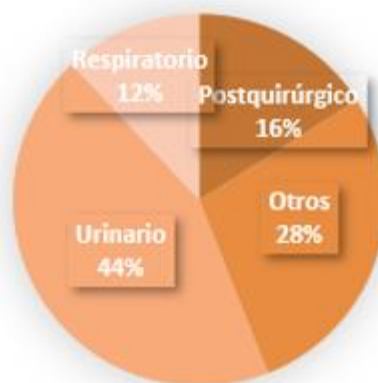


Figura Suplementaria 3. Diagrama de sectores sobre la patología origen del SIRS en los pacientes no politrauma. El porcentaje de pacientes incluidos en "Otros" orígenes del grupo de SIRS no politraumatizados corresponden a pacientes con SIRS de etiología variada como ictus o pancreatitis.

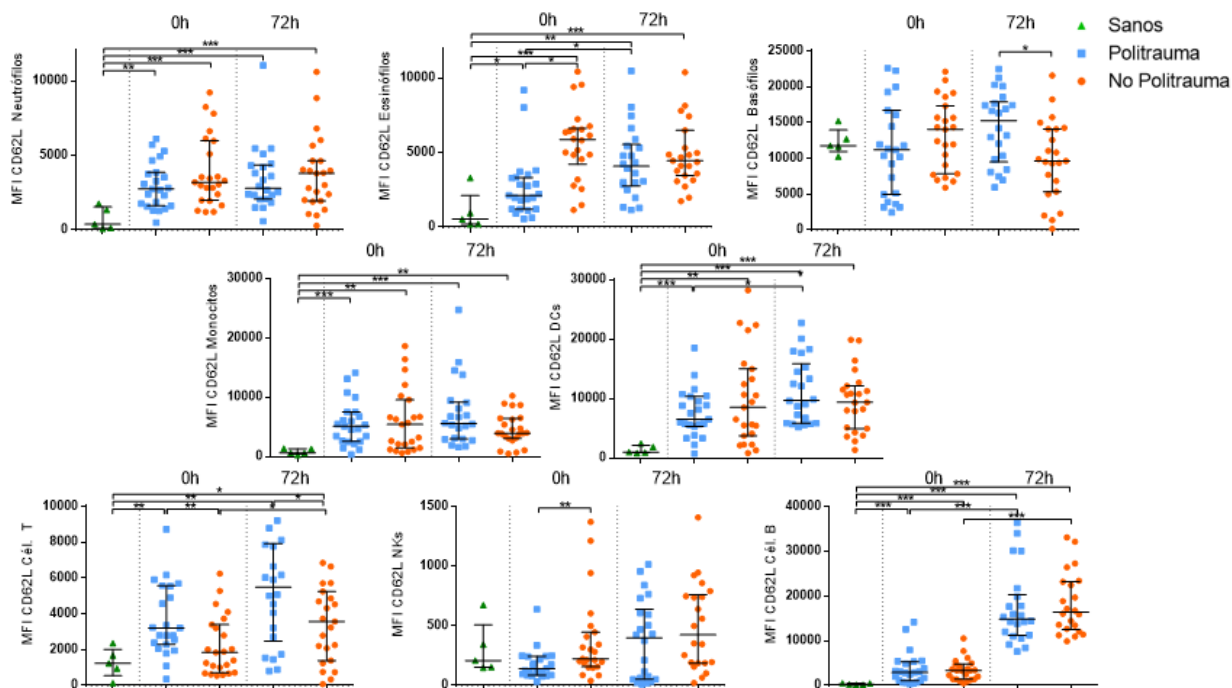


Figura Suplementaria 4. Expresión (MFI) del marcador CD62L en poblaciones leucocitarias de interés. p-valor: '*' $\leq 0,05$; '**' $\leq 0,01$; '**'' $\leq 0,001$.

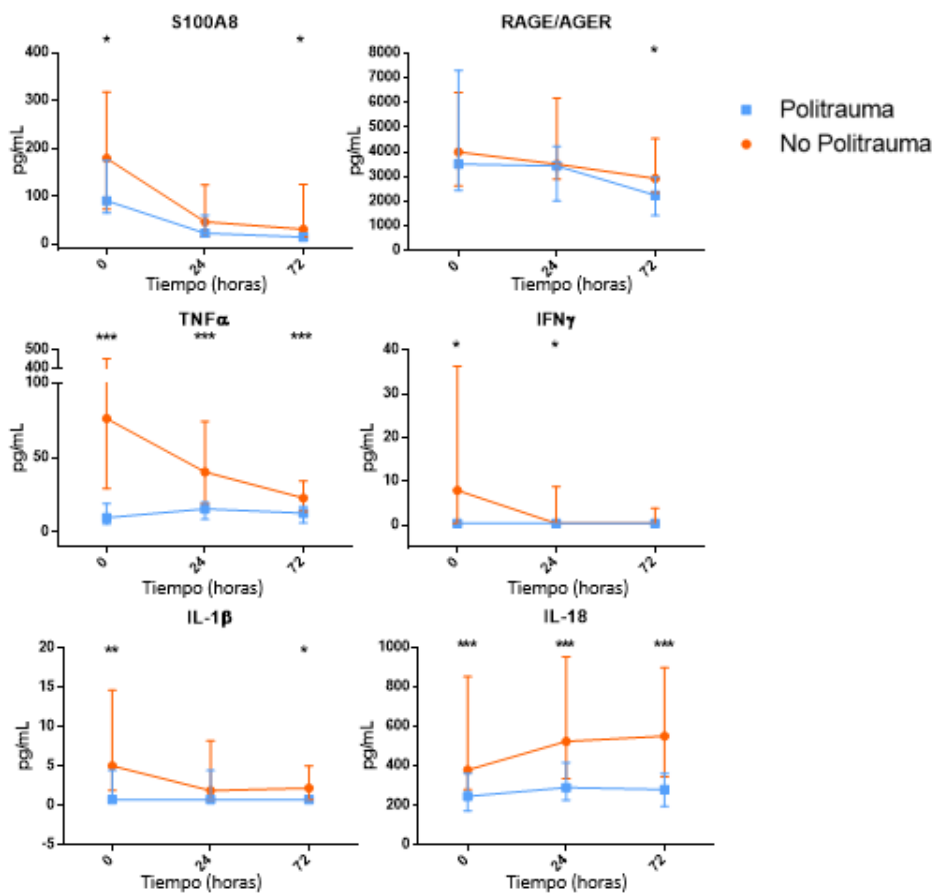


Figura Suplementaria 5. Evolución de la concentración en plasma de proteínas de fase aguda e inflamatorias desde el inicio del SIRS. p-valor: '*' $\leq 0,05$; '**' $\leq 0,01$; '**'' $\leq 0,001$.

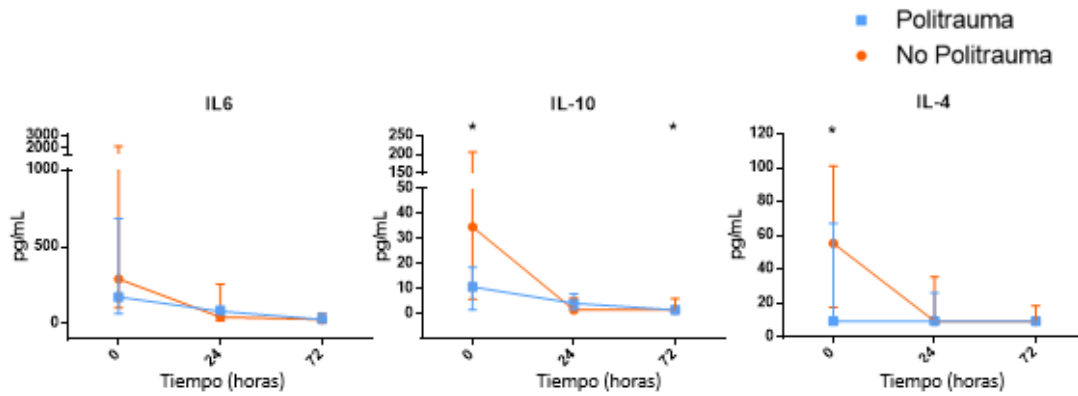


Figura Suplementaria 6. Evolución de la concentración en plasma de proteínas involucradas en el control de la inflamación desde el inicio del SIRS. p-valor: '*' $\leq 0,05$; '**' $\leq 0,01$; '**'' $\leq 0,001$.

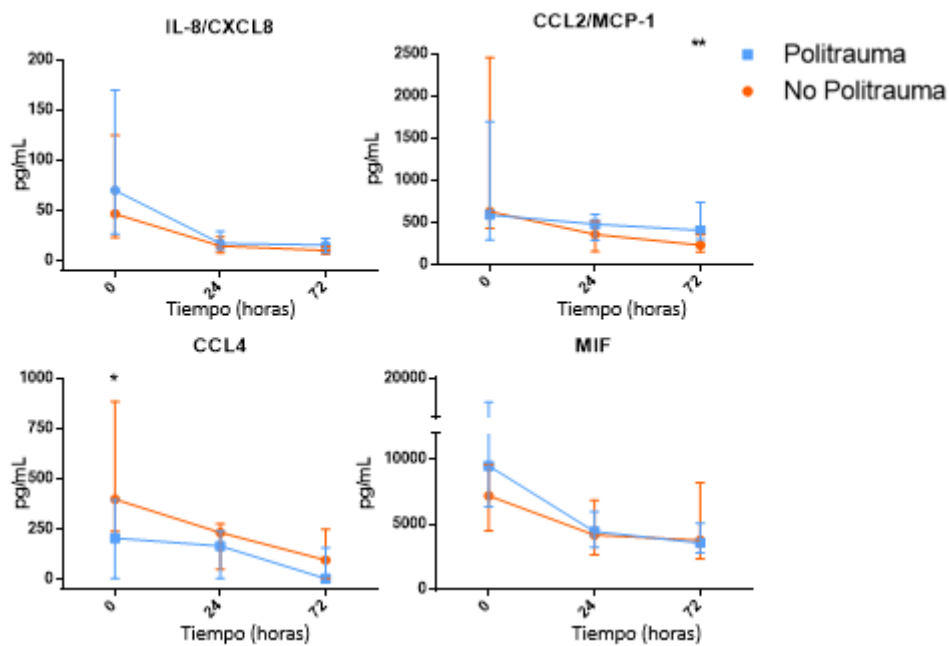


Figura Suplementaria 7. Evolución de la concentración en plasma de quimiocinas desde el inicio del SIRS. p-valor: '*' $\leq 0,05$; '**' $\leq 0,01$; '**'' $\leq 0,001$.

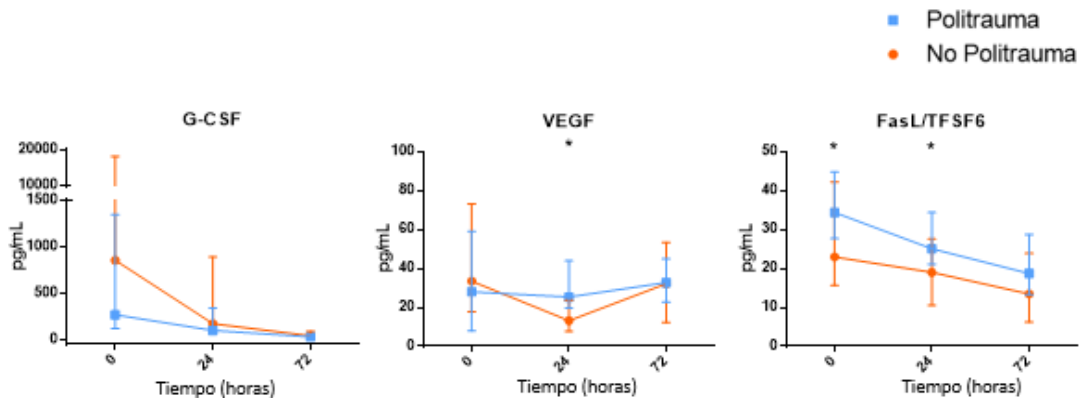


Figura Suplementaria 8. Evolución de la concentración en plasma de factores de crecimiento y de regulación de la actividad celular desde el inicio del SIRS. p-valor: '*' $\leq 0,05$; '**' $\leq 0,01$; '**'' $\leq 0,001$.

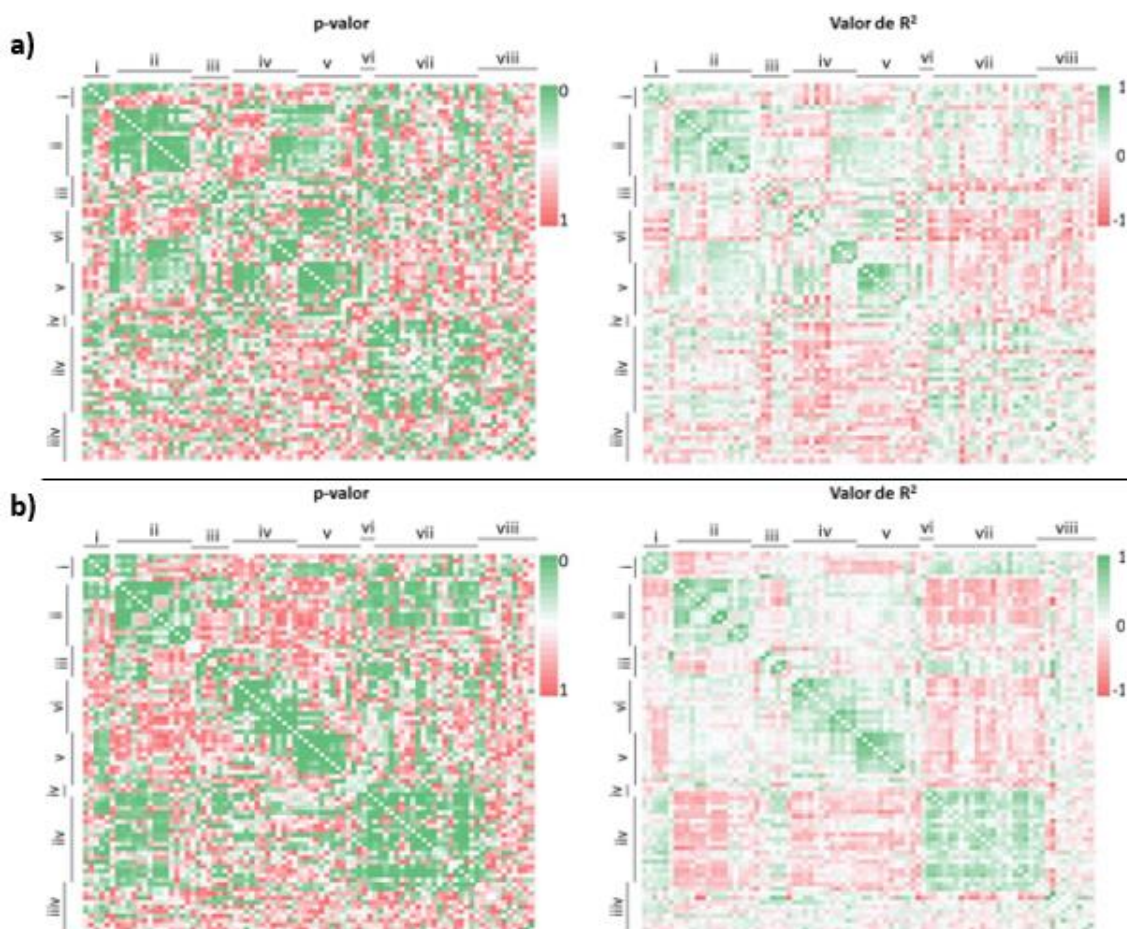


Figura Suplementaria 9. Mapas de calor del análisis de correlación de las variables de estudio a las 0 horas de los pacientes SIRS de a) politrauma y b) no politrauma. Los gráficos de la izquierda representan el grado de significación de la correlación, indicándose en verde más oscuro aquellas correlaciones que son significativas ($p\text{-valor} \leq 0,05$). Los gráficos de la derecha representan la relación que existe entre dos variables, cuanto más cercano a 1 mayor es la relación positiva (verde), y cuanto más próximo a -1 mayor es la relación negativa (rojo). Las variables se agrupan siendo: i) Escalas de riesgo y días de hospitalización, ii) recuento de poblaciones linfocitarias, iii) eosinófilos, neutrófilos y basófilos, iv) poblaciones monocíticas, v) poblaciones de células dendríticas, vi) MDSCs y células progenitoras hematopoyéticas, vii) citocinas y viii) marcadores clínicos (lactato, creatinina, glucosa, etc.).

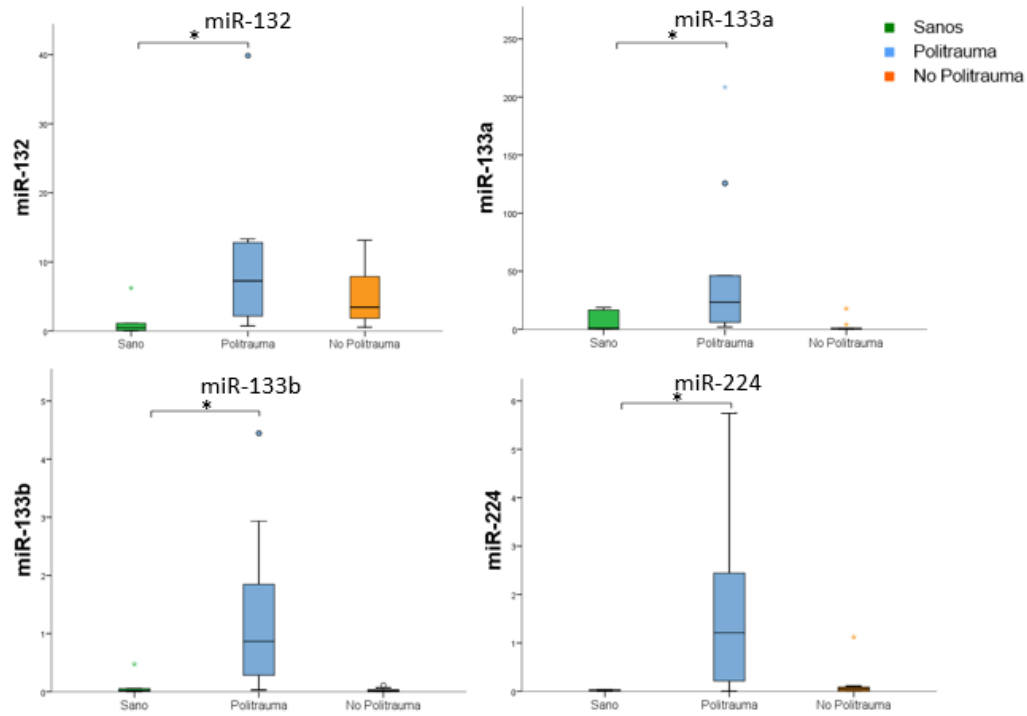


Figura Suplementaria 10. Listado de microRNAs sobreexpresados en el grupo politrauma con respecto al grupo control. El listado de miRNAs mostrados fueron los que se presentaron significativamente diferentes (p -valor $\leq 0,05$) con un ajuste del análisis del FC de $[\leq 0,01$ y ≥ 10].

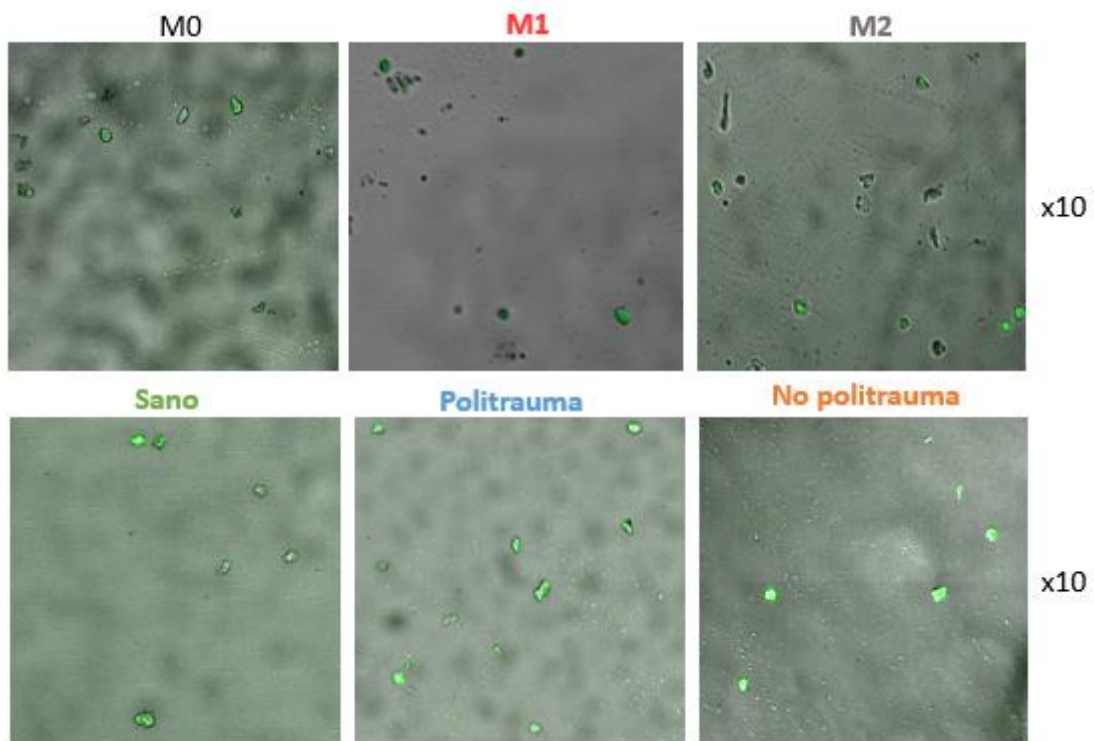


Figura Suplementaria 11. Imágenes de la fagocitosis de partículas pHRedo por macrófagos cultivados en condiciones SIRS.

Tablas Suplementarias

Tabla Suplementaria 1. Criterios SIRS considerados para la inclusión de pacientes en el estudio. Los pacientes deben presentar al menos dos de los siguientes criterios tras un politraumatismo o infección para ser considerados como SIRS.

Temperatura corporal	>38°C (hipertermia) o <36°C (hipotermia)
Frecuencia cardíaca	>90 latidos por minuto (taquicardia)
Frecuencia respiratoria	>20 respiraciones por minuto (taquipnea) o PaCO ₂ <32 mmHg
Recuento de leucocitos	>12000 cél/μl (leucocitosis), <4000 cél/μl (leucopenia), o >10% de formas inmaduras (neutrófilos inmaduros)

Tabla Suplementaria 2. Regiones corporales y sistema de puntuación seguido para el cálculo del Injury Severity Score.

Zonas afectadas	Valor	Valor ²	Severidad y puntuación
Cabeza y cuello			Ninguna (0)
Facial			Leve (1)
Torácica			Moderada (2)
Abdomen/pelvis			Severa/Grave no vital (3)
Extremidades			Severa vital (4)
Externas, quemaduras			Crítica (5)
Total			Insuperable/Máxima (6)

El *Injury Severity Score* (ISS) es un sistema de puntuación con valor pronóstico que en función de los tejidos afectados y la severidad del daño indica la gravedad de un traumatismo o agresión. Se calcula a partir del cuadrado del valor asignado a las tres zonas corporales más afectadas (con mayor puntuación). Se considera politraumatismo cuando el valor de ISS es >16 y tiene afectación de dos o más zonas. Si alguna de las zonas afectadas tiene una puntuación de 6, se considera la máxima posible (75).

Tabla Suplementaria 3. Variables y sistema de puntuación considerados para el cálculo de APACHE II.

Variables	Puntuación								
	+4	+3	+2	+1	0	+1	+2	+3	+4
Temperatura (°C)	≥ 41	39-40,9	-	38,5-38,9	36-38,4	34-35,9	32-33,9	30-31,9	≤ 29,9
Presión Arterial Media (mmHg)	≥ 160	130-159	110-129	-	70-119	-	50-69	-	≤ 49
Frecuencia cardiaca	≥ 180	140-179	110-139	-	70-109	-	55-69	40-54	≤ 39
Frec. respiratoria	≥ 50	35-49	-	25-34	12-24	10-11	6-9	-	≤ 5
Oxigenación									
a) FiO ₂ > 0,5	≥ 500	350-499	200-349	-	< 200	-	-	-	-
b) FiO ₂ < 0,5	-	-	-	-	> 70	61-70	-	55-60	< 55
pH arterial	≥ 7,7	7,6-7,69	-	7,5-7,59	7,33-7,49	-	7,25-7,32	7,15-7,24	< 7,15
Sodio (mmol/L)	≥ 180	160-179	155-159	150-154	130-149	-	120-129	111-119	≤ 110
Potasio (mmol/L)	≥ 7	6-6,9	-	5,5-5,9	3,5-5,4	3-3,4	2,5-2,9	-	< 2,5
Creatinina (mg/dL)	≥ 3,5	2-3,4	1,5-1,9	-	0,6-1,4	-	< 0,6	-	-
Hematocrito (%)	≥ 60	-	50-59,9	46-49,9	30-45,9	-	20-29,9	-	< 20
Leucocitos (x1000)/mL	≥ 40	-	20-39,9	15-19,9	3-14,9	-	1-2,9	-	< 1
Escala de Coma de Glasgow (GCS)									

Tabla adaptada de ⁴¹. El APACHE II (*Acute Physiology And Chronic Health Evaluation II*) es un sistema de puntuación con función pronóstica que se calcula tras la lesión o agresión, y que se calcula sumando el valor de todas las variables. Un aumento de puntuación se relaciona con un mayor riesgo de mortalidad hospitalaria. Se añade al cálculo 6 puntos si el paciente tiene ≥ 75 años, 5 puntos si tiene 65-74 años, 3 puntos al rango 55-64 años, 2 puntos si tiene entre 45-54 años, y 0 puntos si tiene ≤ 44 años. También se considera si el paciente sufre alguna enfermedad crónica (insuficiencia orgánica), viene de una cirugía previa o requiere de una operación de urgencia. En el caso de sufrir fallo renal se multiplica por dos el valor de asociado a la variable creatinina. La puntuación referente al daño cerebral se calcula restando a 15 el valor del GCS del paciente en el ingreso. Abreviaturas: FiO₂, fracción inspirada de oxígeno.

Tabla Suplementaria 4. Criterios considerados para el cálculo del score SOFA.

Aparato Respiratorio		Sistema Nervioso		Sistema Cardiovascular	
PaO ₂ /FiO ₂ y soporte respir.	Valor	Glasgow Coma Score	Valor	Presión arterial media y uso vasopresores	Valor
> 400	0	15	0	PAM > 70 mmHg	0
< 400	1	13-14	1	PAM < 70 mmHg	1
< 300	2	10-12	2	Dosis dobutamina, o	2
< 200 + soporte	3	6-9	3	Noradrenalina ≤ 0,1µg/kg/min	3
< 100 + soporte	4	<6	4	Noradrenalina ≥ 0,1µg/kg/min	4

Hepático		Coagulación		Renal	
Bilirrubina (mg/dl)	Valor	Plaquetas (x1000) /ml	Valor	Creatinina mg/dl y orina (ml)	Valor
< 1,2	0	> 150	0	< 1,2	0
1,2-1,9	1	< 150	1	1,2-1,9	1
2-5,9	2	< 100	2	2-3,4	2
6-11,9	3	< 50	3	3,5-4,9 o < 500 ml de orina/día	3
> 12	4	< 20	4	> 5 o < 200 ml de orina/día	4

Tabla modificada de ⁴². El SOFA (*Sequential Organ Failure Assessment*) es un sistema de puntuación de pronóstico para la evaluación de fallo multiorgánico tras un episodio patológico. El SOFA se calcula sumando el valor de cada una de las 6 variables analizadas, y se considera fallo multiorgánico cuando el valor es ≥ 2 . Abreviaturas: PaO₂, presión parcial de oxígeno; FiO₂, fracción inspirada de oxígeno.

Tabla Suplementaria 5. Índice de Katz para la medición del grado de independencia en actividades cotidianas.

Katz Index of Independence in Activities of Daily Living

Activities Points (1 or 0)	Independence (1 Point)	Dependence (0 Points)
	NO supervision, direction or personal assistance.	WITH supervision, direction, personal assistance or total care.
BATHING Points: _____	(1 POINT) Bathes self completely or needs help in bathing only a single part of the body such as the back, genital area or disabled extremity.	(0 POINTS) Need help with bathing more than one part of the body, getting in or out of the tub or shower. Requires total bathing
DRESSING Points: _____	(1 POINT) Get clothes from closets and drawers and puts on clothes and outer garments complete with fasteners. May have help tying shoes.	(0 POINTS) Needs help with dressing self or needs to be completely dressed.
TOILETING Points: _____	(1 POINT) Goes to toilet, gets on and off, arranges clothes, cleans genital area without help.	(0 POINTS) Needs help transferring to the toilet, cleaning self or uses bedpan or commode.
TRANSFERRING Points: _____	(1 POINT) Moves in and out of bed or chair unassisted. Mechanical transfer aids are acceptable	(0 POINTS) Needs help in moving from bed to chair or requires a complete transfer.
CONTINENCE Points: _____	(1 POINT) Exercises complete self control over urination and defecation.	(0 POINTS) Is partially or totally incontinent of bowel or bladder
FEEDING Points: _____	(1 POINT) Gets food from plate into mouth without help. Preparation of food may be done by another person.	(0 POINTS) Needs partial or total help with feeding or requires parenteral feeding.

TOTAL POINTS: _____ **SCORING:** 6 = High (*patient independent*) 0 = Low (*patient very dependent*)

Nota: El índice de Katz mide la independencia funcional en actividades diarias como es: el lavado personal, vestirse, alimentarse, ir al baño, movilidad y continencia. Consiste en un sistema de puntuación donde se asigna 1 punto si es independiente o 0 puntos si es dependiente en cada una de las actividades del cuestionario. Un valor normal de independencia total refiere a la puntuación de 6. Tabla obtenida de la referencia ²⁶⁵.

Tabla Suplementaria 6. Cuestionario de salud EUROQOL-5D seguido para medir la calidad de vida de los pacientes tras el alta hospitalaria.

CUESTIONARIO DE SALUD EUROQOL-5D

Marque con una cruz la respuesta de cada apartado que mejor describa su estado de salud en el día de HOY.

Movilidad

- No tengo problemas para caminar
- Tengo algunos problemas para caminar
- Tengo que estar en la cama

Cuidado personal

- No tengo problemas con el cuidado personal
- Tengo algunos problemas para lavarme o vestirme
- Soy incapaz de lavarme o vestirme

Actividades cotidianas (p. ej., trabajar, estudiar, hacer las tareas domésticas, actividades familiares o actividades durante el tiempo libre)

- No tengo problemas para realizar mis actividades cotidianas
- Tengo algunos problemas para realizar mis actividades cotidianas
- Soy incapaz de realizar mis actividades cotidianas

Dolor/malestar

- No tengo dolor ni malestar
- Tengo moderado dolor o malestar
- Tengo mucho dolor o malestar

Ansiedad/depresión

- No estoy ansioso ni deprimido
- Estoy moderadamente ansioso o deprimido
- Estoy muy ansioso o deprimido

Nota: El cuestionario EUROQOL-5D (EQ-5D) es una herramienta de medición de la calidad de vida. Consiste en cinco dimensiones (movilidad, autocuidado, actividades habituales, dolor/malestar, ansiedad/depresión) con tres niveles de severidad cada una. Los pacientes seleccionan su estado de salud actual, y se traduce mediante algoritmos específicos en un índice de indicador de calidad de vida, siendo el valor 1 una calidad normal, y un valor menor de 1 una peor calidad. Tabla obtenida de la referencia ²⁶⁶.

Tabla Suplementaria 7. Información detallada sobre la patología y las complicaciones de cada uno de los pacientes con SIRS incluidos en el estudio.

A. Politrauma (PT) SIRS			
Paciente	Patología Origen	Antecedentes	Complicaciones
1	PT con TCE, accidente de tráfico, ISS: 27, APACHE II: 23	Alcoholismo	Recaída con bacteriemia pasadas unas semanas. Agente infeccioso: <i>Aspergillus niger</i>
2	PT con perforación estomacal, accidente de tráfico, ISS: 22, APACHE II: 23	Peritonitis	Desarrollo distrés respiratorio, coagulopatía, infección posterior: <i>Candida Glabrata</i>
3	PT con TCE, precipitación, ISS: 45, APACHE II: 38	Hipertensión, diabetes	Insuficiencia renal, recaída cuadro séptico. Agente infeccioso: <i>Serratia marcescens, Candida tropicalis y Candida albicans</i>
4	PT, precipitación, ISS: 27, APACHE II: 11	Hipertensión	Coagulopatía e infección posterior. Agente infeccioso: <i>Staphylococcus epidermidis</i>
5	PT, accidente tráfico, ISS: 22, APACHE II: 13	Hipertensión, hipercolesterolemia	
6	PT, accidente, ISS: 16, APACHE II:18	Tabaquismo	Shock hemorrágico, insuficiencia respiratoria, coagulopatía
7	PT con TCE, atropello, ISS: 18, APACHE II: 32		Shock hemorrágico, coagulopatía
8	PT, precipitación, ISS: 51, APACHE II: 18		Neumotórax, shock hipovolémico, coagulopatía, cirugía
9	PT, accidente de tráfico, ISS: 22, APACHE II: 10		Cirugía, insuficiencia respiratoria, coagulopatía. Posteriormente infección: <i>Staphylococcus aureus</i>
10	PT con TCE, accidente, ISS: 17, APACHE II: 12	Obesidad	Deterioro respiratorio
11	PT, accidente de tráfico, ISS: 22, APCHEII: 19		Cirugía, deterioro respiratorio
12	PT con TCE, accidente de tráfico, ISS: 17, APACHE II: 38	Alcoholismo, tabaquismo, cirugía aparato digestivo	Deterioro respiratorio, infección posterior aspirado bronquial. Agente infeccioso: <i>Enterobacter cloacae</i>
13	PT con TCE, accidente de tráfico, ISS: 34, APACHE II: 26		Coagulopatía
14	PT, accidente de tráfico, ISS: 27, APACHE II: 11	Hipertensión	Shock hemorrágico, insuficiencia respiratoria, coagulopatía
15	PT, accidente de tráfico, ISS: 17, APACHE II: 23		Cirugía,

16	PT con TCE, accidente de tráfico, ISS: 22, APACHE II: 32	Apendicectomía, amigdalectomía	
17	PT con TCE, ISS: 22, APACHE II: 18	Diabetes, hipertensión	Cirugía. Posterior infección: <i>Candida albicans</i>
18	PT con TCE, ISS: 26, APACHE II: 16	Tabaquismo	
19	PT con TCE, precipitado, ISS: 29, APACHE II: 24	Hipertensión, dislipemia, diabetes, enfermedad renal	
20	PT, accidente de tráfico, ISS: 32, APACHE II: 17	Diabetes, intervención hombro	Cirugía, coagulopatía, daño hepático
21	PT con TCE, accidente de tráfico, ISS: 22, APACHE II: 16		Shock hemorrágico
22	PT con TCE, accidente de tráfico, ISS: 42, APACHE II: 34	Hipercolesterolemia	
23	PT con TCE, precipitado, ISS: 34, APACHE II: 14		Desarrolla distrés respiratorio. Posterior infección. Agente infeccioso: <i>Staphylococcus aureus</i>
24	PT sin TCE, precipitado, ISS: 27, APACHE II: 14		Posterior infección: <i>Pseudomona auroginosa</i> y <i>staphylococcus aureus</i>
25	PT sin TCE, accidente de tráfico, ISS: 27, APACHE II: 23		Shock hemorrágico, coagulopatía

B No Politrauma SIRS

Paciente	Patología Origen	Antecedentes	Complicaciones
26	Shock séptico postquirúrgico, APACHE II: 18	Glaucoma, dislipemia, hipertensión, cirugía próstata	Infección abdominal. Agente infeccioso: <i>Escherichia coli</i> y <i>Klebsiella pneumoniae</i>
27	Shock séptico postquirúrgico, APACHE II: 12	Obesidad, dislipemia, hipertensión, fractura pie, sigmoidectomía laparoscópica	
28	Shock séptico de origen urinario, APACHE II: 19	Apendicectomía, tabaquismo, migrañas, ictus	
29	Shock séptico postquirúrgico, APACHE II: 21	Obesidad, EPOC, hipertensión, dislipemia, diabetes	Coagulopatía, insuficiencia respiratoria y renal, daño hepático
30	Ictus y shock séptico, APACHE II: 29		Coagulopatía, insuficiencia respiratoria y renal, daño hepático. Agente infeccioso: <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Klebsiella aerogenes</i>
31	Shock séptico de origen urinario, APACHE II: 13	Dislipemia, obesidad	Agente infeccioso: <i>Enterobacter cloacae</i>

32	Sepsis postquirúrgica, APACHE II: 13	Nefrectomía radical	Coagulopatía, deterioro renal, hemorragia. Agente infeccioso: <i>Clostridium difficile</i>
33	Shock séptico de origen biliar, APACHE II: 39	Cardiopatía isquémica, alcoholismo, diabetes	Insuficiencia renal, coagulopatía, infarto cerebral, empeoramiento respiratorio. Agente infeccioso: <i>Clostridium difficile</i>
34	Shock séptico de origen respiratorio (neumonía), APACHE II: 16	Hipertensión, adenocarcinoma tratado, ingreso en UCI 5 años atrás por sepsis	Bacteriemia, insuficiencia renal, coagulopatía. Agente infeccioso: <i>E. coli</i>
35	Pancreatitis aguda, APACHE II: 22	Dislipemia	Fracaso renal, daño hepático. Agente infeccioso: <i>Escherichia coli</i>
36	Shock séptico de origen respiratorio, APACHE II: 18	Tabaquismo, alcoholismo, hipertensión, asma, fractura pie	Coagulopatía
37	Ictus, APACHE II: 36	Dislipemia, EPOC, Hiperuricemia	Insuficiencia renal
38	Shock séptico de origen urinario, APACHE II: 24	Diabetes, hipertensión, dislipemia, asma, adenocarcinoma endometrio, colecistectomía	Bacteriemia, insuficiencia renal. Agente infeccioso: <i>Escherichia coli</i>
39	Shock séptico de origen urinario, APACHE II: 25	Hipertensión, dislipemia	Insuficiencia renal, coagulopatía. Agente infeccioso: <i>Enterobacter coclae</i>
40	Shock séptico de origen abdominal, APACHE II: 23	Enfermedad renal, hipertensión, hipotiroidismo	Nefrostomía, insuficiencia renal
41	Shock séptico de origen cardíaco, APACHE II: 26	Hipertensión, diabetes, cardiopatía isquémica, enfermedad renal	Cirugía, insuficiencia renal,
42	Shock séptico de origen urinario, APACHE II: 20	Dislipemia, hipertensión	Nefrostomía, coagulopatía
43	Shock séptico origen urinario, APACHE II: 26	Hipertensión, adenoma paratiroideo, enfermedad renal, ingreso anterior UCI por COVID-19	Coagulopatía, insuficiencia renal
44	Shock séptico de origen urinario, APACHE II: 24	Insuficiencia renal	Nefrostomía, coagulopatía. Agente infeccioso: <i>Klebsiella oxytoca</i> , <i>K. pneumoniae</i> y <i>Enterococcus faecalis</i>
45	Shock séptico de origen urinario, APACHE II: 17		Agente infeccioso: <i>Escherichia coli</i>
46	Shock séptico de origen desconocido, APACHE II: 7		Coagulopatía

47	Shock séptico de origen respiratorio (neumonía), APACHE II: 32		Insuficiencia renal, coagulopatía, empiema pleural, daño hepático. Agente infeccioso: <i>Rhizopus sp</i> y <i>Fusobacterium necrophorum</i>
48	Shock séptico de origen urinario, APACHE II: 26	Hipotiroidismo, operado de adenocarcinoma de colon	Agente infeccioso: <i>Enterococcus avium</i>
49	Shock séptico de origen urinario, APACHE II: 29	EPOC leve, fibrilación auricular, cistoprostatectomía	Insuficiencia renal, Agente infeccioso: <i>Providencia rettgeri, alcaligenes, candida parapsilosis, eikinella corrodens</i>
50	Shock séptico de origen urinario (pielonefritis aguda), APACHE II: 16		

Nota: APACHE II: *Acute Physiology and Chronic Health Evaluation score II*, ISS: *Injury Severity Score*, EPOC: Enfermedad pulmonar obstructiva crónica, UCI: Unidad de Cuidados Intensivos.

Tabla Suplementaria 8. Perfil inmunofenotípico seguido para la identificación de las poblaciones leucocitarias circulantes.

Poblaciones	Marcadores de membrana					
Cél. T	SSCA low	FSCA low	CD45+	CD3+		
CD4	CD4+	CD8-	TCRγδ-			
CD8	CD4-	CD8+	TCRγδ-			
TCRγδ+	CD4-	CD8-	TCRγδ+			
TCRγδ-	CD4-	CD8-	TCRγδ-			
Cél. B	SSCA low	FSCA low	CD45+	CD3-	CD19+	HLA-DR+
Lambda	Igλ+					
Kappa	Igκ+					
Cél. Plasmática	CD38+	CD20-				
Cél. NK	SSCA low	FSCA low	CD45+	CD3-	CD19-	CD16+
CD56high	CD56high					
CD56dim	CD56dim					
CD56low	CD56low					
Eosinófilos	SSCA high	FSCA high	CD45+	CD16-		
Basófilos	SSCA low	FSCA low	CD45 dim	FcεRI high	CD62L high	
Neutrófilos	SSCA high	FSCA high	CD45+	HLADR-	CD14-	
Maduros	CD16 high					
Inmaduros CD16-/CD62L+	CD16-	CD62L+	CD33+			
Inmaduros CD16-/CD62L-	CD16-	CD62L-	CD33+			
Monocitos	SSCA dim	FSCA dim	CD45+	HLADR+	CD33+	
Clásicos (cMo)	CD14+	CD16-	CD192+			
cMo FcεRI+/CD62L-	FcεRI+	CD62L-				
cMo FcεRI +/CD62L+	FcεRI+	CD62L+				
cMo FcεRI -/CD62L-	FcεRI-	CD62L-				
cMo FcεRI -/CD62L+	FcεRI-	CD62L+				
Intermedios (iMo)	CD14+	CD16+				
No Clásicos (ncMo)	CD14-	CD16+				
ncMo Slan+/CD36-	SLAN+	CD36-				
ncMo Slan+/CD36+	SLAN+	CD36+				
ncMo Slan-/CD36-	SLAN-	CD36-				
ncMo Slan-/CD36+	SLAN-	CD36+				
MDSCs	SSCA dim	FSCA dim	CD45+	CD192-		
Células dendríticas (DCs)	SSCA dim	FSCA dim	CD45+	HLADR high	CD16-	CD14-/dim
DCs mieloides (mDCs)	CD1c dim/+	CD33 high	CD141+			
mDCs CD14dim	CD14dim	CD5-				
mDCs CD5-/CD14-	CD14-	CD5-				
mDCs CD5+	CD14-	CD5+				
mDCs CD141+	CD141 high					
Plasmocitoides DCs (pDCs)	CD303+	CD33-	CD141-			
DCs Axl+	CD303+	CD33+	CD141+			
Progenitores Hematopoyéticos	SSCA low	FSCA low	CD45 dim	HLADR+	CD34+	

Para los registros de tamaño y morfología SSCA y FSCA la clasificación es en orden ascendente: “low”, “dim” y “high”. La expresión de los marcadores se indica siguiendo el patrón en orden ascendente: (expresión nula) “-”, (intermedia) “dim”, (positiva) “+” y “high” (alta expresión).