

FACULTAD DE MEDICINA HUMANA

UNIDAD DE POSGRADO

**EXPRESIÓN FENOTÍPICA Y GÉNICA DE MARCADORES FUNCIONALES
EN SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS Y MONOCITOS DE SANGRE
PERIFÉRICA EN PACIENTES CON O SIN DIABETES MELLITUS
TRATADOS CON HEMODIÁLISIS
CENTRO NEFROLÓGICO PRIVADO 2020**

TESIS

PARA OPTAR

**EL GRADO ACADÉMICO DE MAESTRA EN INMUNOLOGÍA CON MENCIÓN
EN INFECTOLOGÍA Y ENFERMEDADES AUTOINMUNES**

PRESENTADA POR

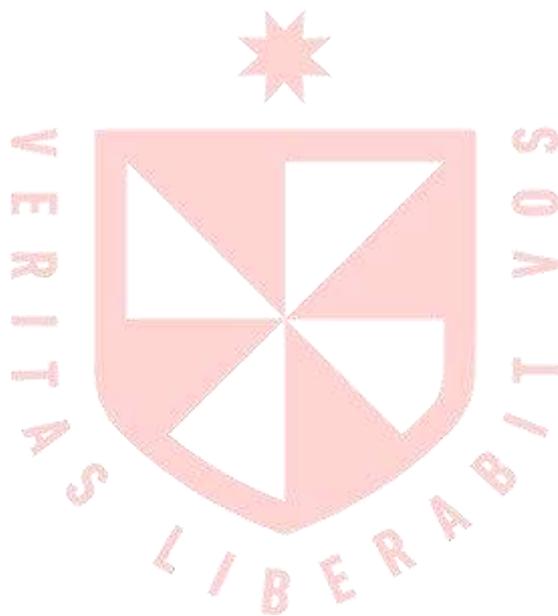
MARIA GRACIA CASTAÑEDA TORRICO

ASESOR

JOEL DE LEÓN DELGADO

LIMA - PERÚ

2024



Reconocimiento - No comercial - Sin obra derivada
CC BY-NC-ND

El autor sólo permite que se pueda descargar esta obra y compartirla con otras personas, siempre que se reconozca su autoría, pero no se puede cambiar de ninguna manera ni se puede utilizar comercialmente.

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>



**FACULTAD DE MEDICINA HUMANA
UNIDAD DE POSGRADO**

**EXPRESIÓN FENOTÍPICA Y GÉNICA DE MARCADORES
FUNCIONALES EN SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS Y
MONOCITOS DE SANGRE PERIFÉRICA EN PACIENTES CON
O SIN DIABETES MELLITUS TRATADOS CON HEMODIÁLISIS
CENTRO NEFROLÓGICO PRIVADO 2020**

TESIS

PARA OPTAR

**EL GRADO ACADÉMICO DE MAESTRA EN INMUNOLOGÍA CON
MENCIÓN EN INFECTOLOGÍA Y ENFERMEDADES AUTOINMUNES**

**PRESENTADA POR
MARIA GRACIA CASTAÑEDA TORRICO**

**ASESOR
DR. JOEL DE LEÓN DELGADO**

LIMA, PERÚ

2024

JURADO

Presidente: Arturo Pareja Cruz, doctor en Medicina y maestro en Salud Pública y Gestión en Sistema de Salud.

Miembro: Claudio Nicolas Villegas Llerena, doctor en Filosofía y maestro en Ciencias con mención en Medicina Molecular.

Miembro: Pool Marcos Carbajal, maestro en Biología Molecular.

A Dios, por brindarme paciencia, sabiduría y fuerza de voluntad; a mi padre, que siempre me impulsó a seguir con mis estudios de posgrado; a mi madre, que es mi ejemplo de superación, constancia y perseverancia y a mi esposo, Kyle Nutt, por apoyarme en mis metas y hacer mis días llenos de color.

AGRADECIMIENTOS

A Joel De León Delgado, bioquímico y especialista en inmunología, por todo su apoyo, paciencia y dedicación en cada asesoría brindada durante este proyecto.

A Víctor Arrunátegui Correa, biólogo especialista en inmunología, por inculcarme su pasión por la ciencia e investigación; gracias por guiarme de la mano con paciencia y cariño hasta sus últimos días.

A César Liendo Liendo, nefrólogo y director del centro Nefrológico Cenesa S.A, por permitirme desarrollar este trabajo y brindarme todas las facilidades y conocimientos disponibles.

A Jhon Pando Mayta, tecnólogo médico y jefe del Instituto de Investigación y Aplicación Celular S.A.C (INIAC), por su apoyo y colaboración para el desarrollo de los experimentos.

ÍNDICE

	Págs.
Portada	i
Jurado	ii
Dedicatoria	iii
Agradecimientos	iv
Índice	v
Resumen	vi
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	8
III. METODOLOGÍA	33
IV. RESULTADOS	47
V. DISCUSIÓN	57
VI. CONCLUSIONES	68
VII. RECOMENDACIONES	69
FUENTES DE INFORMACIÓN	70
ANEXOS	81

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue caracterizar la expresión fenotípica y génica de marcadores funcionales en las subpoblaciones de linfocitos y monocitos de sangre periférica en pacientes con o sin DM2 tratados con hemodiálisis (HD) en un centro nefrológico privado, 2020. Este estudio observacional, comparativo, descriptivo y transversal distribuyó a los pacientes en dos grupos: pacientes con DM2 (G1=9) y controles sin DM2 (G2=9) con una media de edad de $66,6 \pm 9,1$ años. Los resultados del conteo de linfocitos de los G1 fueron superiores en comparación con los G2; sin embargo, esta diferencia no resultó estadísticamente significativa. La distribución de subpoblaciones monocitarias en G1 presentó disminución de monocitos clásicos (MC) y elevación de monocitos no clásicos (MNC). La expresión génica de los marcadores inflamatorios IL-6 y IL-10 se incrementó en estos pacientes. El análisis bivariado determinó que la cantidad de MNC se correlacionó directamente con los linfocitos totales y los linfocitos B ($p=0,011$ y $p=0,017$). El análisis estadístico entre los parámetros hematológicos y las subpoblaciones evidenció una relación directa entre los MC y los neutrófilos ($p \leq 0,007$). Los MNC se correlacionaron positivamente con los linfocitos TCD4⁺ ($p \leq 0,016$) y eosinófilos ($p \leq 0,025$). Se concluyó que la expresión fenotípica y génica de marcadores funcionales en las subpoblaciones leucocitarias tiene una tendencia al alza en los pacientes diabéticos. Las subpoblaciones monocitarias de pacientes con DM2 presentan correlaciones significativas con otros grupos celulares que participan en la regulación del proceso inflamatorio de esta patología.

Palabras clave: Enfermedad renal crónica, diabetes *mellitus* tipo 2, subpoblaciones leucocitarias

ABSTRACT

The aim of this study was to characterize the phenotypic and gene expression of functional markers in different subpopulations of peripheral blood lymphocytes and monocytes in DM2 patients and healthy controls treated with hemodialysis (HD) in a private nephrology center, 2020. This observational, comparative, descriptive and cross-sectional study distributed the patients into two groups: patients with DM2 (G1=9) and healthy controls (G2=9) with a mean age of 66.6 ± 9.1 years. The lymphocyte count results of G1 were higher compared to G2, however; This difference was not statistically significant. The distribution of monocyte subpopulations in G1 showed a decrease in classical monocytes (CM) and an increase in non-classical monocytes (NCM). The gene expression of the inflammatory markers IL-6 and IL-10 was increased in these patients. Bivariate analysis determined that the amount of MNC was directly correlated with total lymphocytes and B lymphocytes ($p=0.011$ and $p=0.017$). The statistical analysis between hematological parameters and subpopulations showed a direct relationship between CM and neutrophils ($p \leq 0.007$). MNC were positively correlated with TCD4+ lymphocytes ($p \leq 0.016$) and eosinophils ($p \leq 0.025$). In conclusion, the expression of phenotypic and gene markers in leukocyte subpopulations has an upward trend in diabetic patients. The monocyte subpopulations of patients with DM2 present significant correlations with other cell groups that participate in the regulation of the inflammatory process of this pathology.

Keywords: Chronic kidney disease, type 2 diabetes *mellitus*, leukocyte subpopulations

NOMBRE DEL TRABAJO

**EXPRESIÓN FENOTÍPICA Y GÉNICA DE
MARCADORES FUNCIONALES EN SUBP
OBLACIONES DE LINFOCITOS Y MONOCI
TOS**

AUTOR

MARIA GRACIA CASTAÑEDA TORRICO

RECUENTO DE PALABRAS

26023 Words

RECUENTO DE CARACTERES

144399 Characters

RECUENTO DE PÁGINAS

107 Pages

TAMAÑO DEL ARCHIVO

1.7MB

FECHA DE ENTREGA

May 29, 2024 4:44 PM GMT-5

FECHA DEL INFORME

May 29, 2024 4:47 PM GMT-5

● **9% de similitud general**

El total combinado de todas las coincidencias, incluidas las fuentes superpuestas, para cada base de datos.

- 9% Base de datos de Internet
- Base de datos de Crossref
- 2% Base de datos de publicaciones
- Base de datos de contenido publicado de Crossref

● **Excluir del Reporte de Similitud**

- Base de datos de trabajos entregados
- Material citado
- Coincidencia baja (menos de 10 palabras)
- Material bibliográfico
- Material citado

I. INTRODUCCIÓN

1. Descripción de la situación problemática

La enfermedad renal crónica (ERC) es un problema de salud pública a nivel mundial. Es una patología caracterizada por la presencia de daño renal irreversible, así como la alteración y degeneración paulatina del conglomerado glomerular. Dentro del espectro de causas más frecuentes de ERC predominan la diabetes *mellitus* (DM) y la hipertensión arterial (HA), las cuales tienen alta incidencia y prevalencia en países en vía de desarrollo y bajos recursos como el nuestro ⁽¹⁻⁴⁾. La DM es una enfermedad con múltiples procesos fisiopatogénicos involucrados, que incluyen la destrucción autoinmunitaria de las células β del páncreas y alteraciones que conducen a la resistencia a la acción de la insulina ^(1, 5-8).

A nivel global, diversas entidades como la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la organización internacional sin ánimo de lucro World Kidney Day informan que la prevalencia de ERC es del 10 %, siendo la DM causante del 30,7 % de estos casos. Se estima que el índice de mortalidad de esta afección se posicionará en el quinto puesto de causas de muertes en el año 2040 ^(9, 10).

La diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2) representa entre el 85 % y el 90 % de los casos reportados a nivel internacional. Se diagnostica principalmente en adultos que se vuelven resistentes a la insulina o que la producen con déficit, por cual se relaciona con factores como obesidad, la inactividad física, y las dietas con alto contenido calórico de bajo valor nutricional ^(8, 9, 11-13).

En el Perú, según lo reportado por el Centro Nacional de Epidemiología, Prevención y Control de Enfermedades (CDC-Perú) del Ministerio de Salud (Minsa) en 2021, la DM es la sexta causa de muerte y la ERC es la décima con prevalencias de 3,4% y 3,3 %, respectivamente ⁽¹⁴⁾.

El Instituto Nacional de Estadística e Informática (INEI) informa que el 4,9 % de la población tiene diagnóstico de DM, y el 96,5 % de estos pacientes sufren de DM2⁽¹⁴⁾. Según la categoría sexo, tiende a ver un ligero incremento en la población femenina con 5,4 % en comparación con el 4,5 % de la población masculina que padecen esta enfermedad. Por región natural, el mayor porcentaje de personas

diagnosticadas se ubican en Lima Metropolitana (5,8 %) y el menor en la Sierra (3,3 %) (12, 15).

La nefropatía diabética (ND) es una de las complicaciones más graves que se presenta en el 40 % de los pacientes DM2, y con el transcurso de los años desencadenan en una ERC terminal (ERC-t) en la que se requiere de tratamiento de remplazo renal como diálisis peritoneal, hemodiálisis (HD) o trasplante renal (12, 16, 17). Los pacientes diabéticos presentan una desregularización persistente y crónica que desencadena el desequilibrio de las vías típicas del metabolismo de la glucosa, lo que conlleva a mayor inflamación, estrés celular y la pérdida progresiva de la función renal (18, 19).

El desarrollo de la ND está fuertemente asociado con variaciones en las subpoblaciones leucocitarias como son los linfocitos, monocitos y sus subpoblaciones respectivas (20, 21). Estudios previos han demostrado que la proporción de linfocitos T colaboradores (CD4) sufre alteraciones en relación al grupo control (22, 23). También, se visualizan tendencia a mayor expansión de monocitos, liberación de citocinas y radicales libres que acentúan el estrés oxidativo y la disfunción endotelial en el medio urémico de estos pacientes (20, 21). Estas células de manera adicional se ven afectados en su conteo celular, su capacidad fagocítica y en la presentación de antígenos, lo que afecta la función de los linfocitos T (LT) y los linfocitos B (LB) (24, 25).

Las células citolíticas naturales (NK) y las NK de estirpe T (NKT), también contribuyen a la inflamación del tejido adiposo y a la resistencia a la insulina. Estas células regulan la comunicación entre el sistema inmune innato y adaptativo, estimulan las funciones de las células dendríticas, la activación de neutrófilos, macrófagos así con de LB y LT, y la diferenciación de los TCD4 vírgenes hacia células efectoras (Th, del inglés *T helper*) (24, 26).

Los monocitos periféricos humanos actúan como células presentadoras de antígeno (CPA) para activar las células T durante condiciones inflamatorias, y para secretar citocinas que dan forma a la diferenciación de células T (26, 27). Los monocitos constituyen una población celular heterogénea que puede subdividirse según el patrón de expresión de superficie CD14 (correceptor de lipopolisacárido (LPS)) y CD16 (receptor de Fc γ III de baja afinidad). Se clasifican en monocitos

clásicos (MC) (CD14⁺⁺ CD16⁻), monocitos intermedios (MI) (CD14⁺CD16⁺) y monocitos no clásicos (MNC) (CD14⁺ CD16⁺⁺)⁽²⁸⁻³¹⁾.

Los monocitos MC y MI presentan mayor capacidad pro-inflamatoria, los MNC están presentes en el endotelio de los vasos sanguíneos y está presumiblemente involucrado en la vigilancia innata del tejido local y la reparación del tejido^(32, 33).

El deterioro gradual de la función renal está relacionado también con el aumento de la concentración de citocinas plasmáticas a medida que progresa la inflamación sistémica y local en la ND⁽³⁴⁾. Varios estudios afirman que los monocitos activados modulan la segregación de citocinas pro-inflamatorias, (interleucina 1 (IL-1), interleucina 6 (IL-6), interferón gamma (INF- γ), interleucina 1 beta (IL-1 β), factor de necrosis tisular alfa (TNF- α) y citocinas antiinflamatorias como la interleucina 10 (IL-10))^(16, 35).

La ERC acelera la inmunosenescencia, tanto en el compartimiento de linfocitos T como de monocitos⁽¹⁹⁾. Estos cambios se relacionan positivamente con la inflamación, morbilidad cardiovascular por la exposición crónica de toxinas urémicas y citocinas proinflamatorias. El envejecimiento prematuro del sistema inmune, que se evidencia en la ERC, se manifiesta con un nivel alto de linfocitos T citotóxicos (TCD8⁺), así como de MI y MNC,⁽³⁶⁻³⁹⁾ lo cual incrementa la tasa de pérdida de la función renal,⁽⁴⁰⁾ principalmente en pacientes diabéticos⁽⁴¹⁾.

Diversos estudios han sugerido el papel de los monocitos relacionados a la progresión de la ERC^(19, 42). Los MC se asocian con la respuesta inflamatoria inicial y la capacidad de diferenciarse en macrófagos, lo cual contribuye con la cronicidad de la enfermedad. Los MNC, por otro lado, se han considerado antiinflamatorios y se manifiestan en la primera línea de defensa contra patógenos⁽⁴³⁾. En pacientes en HD se ha planteado que las subpoblaciones de MI y MNC tienden a presentar signos de maduración alterada por la HD o la uremia⁽⁴⁴⁾. Sin embargo, el papel de los monocitos en las enfermedades crónicas como la ERC aún no se encuentra totalmente claro⁽⁴³⁾.

La respuesta inmune y la inflamación influyen en la patogenia de la ERC, tanto en la iniciación como en la progresión de la enfermedad, más aún si es de etiología diabética⁽⁴⁵⁾. La abundancia de subpoblaciones circulantes de MI y MNC se ha relacionado con DM2, con respecto a factores de riesgo cardio-metabólicos y la

obesidad que son principales desencadenantes de ND. Sin embargo, la relevancia del aumento de las diferentes subpoblaciones de monocitos y los linfocitos T de sangre periférica, la expresión génica de marcadores inflamatorios y la correlación entre estas células en pacientes con DM2 es un tema que requiere más evidencias ⁽⁴⁶⁾. El principal aporte de esta investigación es caracterizar la expresión de marcadores funcionales en poblaciones leucocitarias de pacientes con DM tratados con HD.

2. Problema de investigación

¿Cuál es la expresión fenotípica y génica de marcadores funcionales en las subpoblaciones de linfocitos y monocitos de sangre periférica en pacientes con o sin DM2 tratados con hemodiálisis en un centro privado nefrológico?

3. Objetivos

3.1 Objetivo general

Caracterizar la expresión fenotípica y génica de marcadores funcionales en las subpoblaciones leucocitarias de sangre periférica en pacientes con o sin DM2 tratados con HD en un centro nefrológico privado, 2020.

3.2 Objetivos específicos

Determinar, por citometría de flujo, la expresión de los marcadores de diferenciación de LT, LB, NK y NKT, a partir de la sangre periférica de pacientes con o sin DM2 sometidos a HD.

Determinar, por citometría de flujo, la frecuencia de las subpoblaciones de monocitos (MC, MI y MNC), en pacientes con o sin DM2 sometidos a HD.

Identificar, mediante reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real cuantitativo (qPCR), la expresión génica de citocinas producidas por los leucocitos de pacientes con o sin DM2 sometidos a HD.

Evaluar la relación entre la frecuencia de las subpoblaciones leucocitarias y los parámetros hematológicos.

4. Justificación de la investigación

4.1 Importancia

La diabetes podría considerarse una epidemia global silenciosa que afecta ya al 6 % de la población mundial, lo que hace que, actualmente 420 millones de personas padezcan diabetes tipo 1 o 2.

La ND es una de las principales consecuencias de la DM2 y un factor desencadenante de la ERC colocando a los pacientes en un cuadro altamente vulnerable dándoles solo la opción de tratamiento con diálisis o el trasplante de riñón lo que genera repercusiones definitivas en la calidad de vida y un pronóstico nada alentador que tiene un efecto negativo en la economía con mayores repercusiones en los sistemas de salud en los países de ingresos bajos y limitados como el nuestro.

La identificación las subpoblaciones de linfocitos y monocitos presentes en la sangre periférica de pacientes con DM2 sometidos a HD nos permite entender los procesos inflamatorios y el rol fisiopatológico de estas células inmunes durante el desarrollo de la ND ⁽⁴⁷⁾. Las alteraciones producidas en la inmunidad celular y humoral como consecuencia de la DM2 en pacientes ERC se ven agudizadas durante el proceso de HD. Tal es el caso de la producción de citocinas pro y anti inflamatorias por los monocitos, el reclutamiento de macrófagos, la resistencia a la insulina y la desregularización de la respuesta inmune de los linfocitos T, B y NK ⁽⁴⁸⁾.

Estudios preliminares han sugerido que los pacientes diabéticos tienen mayor número de monocitos y menor cantidad de linfocitos que los pacientes no diabéticos sometidos a HD, considerándolo como un posible marcador de inflamación en estos pacientes ⁽⁴⁷⁾. De manera adicional, las posibles asociaciones entre las subpoblaciones leucocitarias y otros grupos celulares contribuyen a crear un contexto inflamatorio que influye en el curso de la enfermedad y en la eficacia de las terapias.

Este trabajo evidencia la importancia de determinar marcadores funcionales en las subpoblaciones leucocitarias en pacientes con ND sometidos a HD, así como la

correlación entre estos, para discriminar los cambios inmunológicos generados por la enfermedad y su potencial valor pronóstico y predictivo. Lo anterior constituye el principal aporte científico de esta investigación.

4.2 Viabilidad

El presente estudio de investigación contó con los recursos humanos, materiales y económicos necesario para su ejecución. El acceso a los registros clínicos y a las muestras biológicas de los pacientes en el centro nefrológico privado (CENESA S.A.) fue autorizado por el director médico.

Los consentimientos informados fueron entregados previamente a cada paciente y se les explico de manera detallada cada uno de los procesos laboratoristas que se realizarían con sus muestras sanguíneas.

Las etapas experimentales cuentan con la colaboración del Instituto de Investigación y Aplicación Celular (INIAC), donde se realizaron todos los análisis y adquisiciones fenotípicas con sus equipos de citometría de flujo mientras que los análisis moleculares fueron realizados con los equipos de RT-PCR del laboratorio de Biología molecular y genética de la empresa Suiza Lab. S.A.C.

La adquisición de los insumos, consumibles y reactivos fue financiada por la organización INNOVACARE con el fin de poder contribuir con la investigación en nuestro país.

5. Limitaciones

En este estudio solo se incluyeron pacientes en terapia de HD del centro nefrológico privado CENESA. Sin embargo, esta limitación se explica por la heterogeneidad del indicador de eficiencia del procedimiento de sesión de HD intermitente (K_Tv), el cual varía de acuerdo al procedimiento de cada centro nefrológico. Por lo tanto, extender el estudio a otras instituciones podría generar un sesgo de comparación al momento de analizar los resultados.

II. MARCO TEÓRICO

1. Antecedentes

Villena A, en 2022, desarrolló un estudio transversal con 195 pacientes con DM2 para determinar los factores relacionados a ND. Los resultados demostraron una asociación significativa de esta patología con factores como: tiempo de enfermedad, edad, retinopatía, tratamientos con insulina, con anticonvulsivos (gabapentina) y estatina (atorvastatina), concentración de ácido úrico e índice neutrófilo/linfocito. Para ello, se logró dilucidar los factores sociodemográficos y clínicos que servirían para diagnosticar la ND en las primeras etapas ⁽¹⁶⁾.

Campoverde M et al., en 2021, desarrollaron una investigación documental de la caracterización hematológica en pacientes con DM2. Su principal resultado fue extraer valores referenciales de los perfiles sanguíneos de esta patología. Esto les permitió concluir que, las alteraciones hematológicas son inherentes en DM2 y que diferentes valores pueden verse elevados (insulina, glucosa, hemoglobina glicosilada (HbA1c), recuento de monocitos) o disminuidos (media de hematocrito y el porcentaje promedio de linfocitos) ⁽⁴⁹⁾.

Lorenzo V y Rodríguez D, en 2021, realizaron una revisión bibliográfica de ERC y sus posibles factores desencadenantes. Este escrito divide a los factores en tres grupos: mecanismos fisiopatológicos, condiciones no modificables y modificables. Los factores que resaltan son la edad y comorbilidades como: diabetes, HTA, hiperuricemia, enfermedad cardiovascular y obesidad. En conclusión, nos recomiendan continuar expandiéndonos con nuevas investigaciones experimentales ⁽⁴⁾.

Gutiérrez L et al., en 2021, recopilaron información científica acerca de la ND y las posibles estrategias para evitar el avance a fase terminal en pacientes diabéticos. Este artículo determinó que al existir múltiples factores de riesgo que aceleran la progresión de esta enfermedad es imposible aplicar una sola fórmula para todos los pacientes, por lo cual, es importante evaluar cada caso iniciando con su régimen

alimentario con suplementos con cetanoálogos , vitamina D y el uso de antidiabéticos ⁽⁵⁰⁾.

Méndez P et al., en 2020, realizaron una revisión bibliográfica para evaluar la desregularización inmune en pacientes diabéticos infectados con el virus SARS-CoV-2. Su objetivo fue detallar la respuesta inmunológica e inflamatoria ante la infección con el virus y las células encargadas de la inmunidad, así como las interacciones complejas que se dan en los alveolos pulmonares. Por lo tanto, los pacientes con DM son prioritarios en pandemia por tener un clínico progresivo desfavorable ⁽⁵¹⁾.

Carrero J y Gonzales M, en 2020, efectuaron una investigación bibliográfica del proceso inflamatorio de diálisis en pacientes con ERC. En vista que el decremento de las funciones renales facilita un entorno inflamatorio constante como síndrome metabólico, calcificación vascular e insulinoresistencia, sugieren la monitorización reiterada de la respuesta y marcadores inflamatorios en la clínica para evitar la muerte súbita de los pacientes. En conclusión, nos proponen continuar evaluando enfermedades adicionales, dieta saludable y tratamiento farmacológico a corto plazo ⁽⁵²⁾.

López J, en 2020, materializó una investigación bibliográfica con el fin de describir las alteraciones inmuno-hematológicas de pacientes con DM2. Los principales hallazgos son el efecto de la hiperglucemia en los glóbulos rojos, blancos y plaquetas, anemia, conteo elevado de leucocitos, hiperagregación plaquetaria y el índice de neutrófilos/linfocitos como predictor de complicaciones vasculares. En este estudio se evidenció anomalías funcionales en el sistema inmune y sus células ⁽⁵³⁾.

Arango M et al., en 2020, realizaron un estudio analítico con 154 pacientes diagnosticados con cáncer, con el fin de evaluar las subpoblaciones linfocitarias, linfocitos totales y el índice CD4/CD8 de esos pacientes. En la población de estudio la mediana de los linfocitos totales y de las subpoblaciones linfocitarias CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD19⁺ y NK fueron significativamente menores. Los linfocitos T dobles

positivos (CD4⁺/CD8⁺) se encontraron elevados significativamente. En conclusión, las células con mayor repercusión en el cáncer son las subpoblaciones T y linfocitos B, sin embargo, con el aumento de la edad se evidencia una tendencia a la disminución de linfocitos T, B y NK que se relaciona con el sistema inmunitario del paciente oncológico ⁽⁵⁴⁾.

Ramos D, en 2020, llevo a cabo un estudio observacional, descriptivo y retrospectivo para caracterizar posibles infecciones en 182 pacientes con DM2. La HTA resulto ser la comorbilidad más frecuente que puede acelerar la llegada de la ERC. En conclusión, describe las funciones disminuidas del sistema inmune innato en pacientes diabéticos, así como los efectos de la hiperglucemia y la predisposición de infecciones urinarias ante la elevación de HbA1c ⁽⁵⁵⁾.

Guerrero F, en 2020, publicó su tesis doctoral centrada en caracterizar las diversas poblaciones monocitarias que se activan durante el síndrome coronario agudo. Evaluó 34 pacientes con esta condición y concentraciones de monocitos en diferentes periodos. Los MC no presentaron diferencias en ningún periodo, mientras que los MNC y MI fueron significativos a las 6 horas y los treinta días de la angioplastia comparados con el grupo control. Por lo cual, los MI a las 6 horas pueden ser considerados para predecir fases iniciales del infarto ⁽⁵⁶⁾.

Kim H et al., en 2019, realizaron un estudio experimental con 49 personas diabéticas, pre diabéticas y con glucosa normal. Para evaluar la actividad de los linfocitos NK y los parámetros metabólicos que se alteran en estos pacientes. La actividad celular fue medida por expresión de INF- γ . Como resultados, mostraron que los pacientes diabéticos tienen menor actividad de los grupos, siendo inversamente significativa con la glucosa en ayunas, dos horas después de la carga y la HbA1c siendo esta ultima un predictor de estas células en pacientes con DM2. En conclusión, los pacientes con DM2 tienen menor actividad de los linfocitos NK y se relaciona con la glucosa ⁽⁵⁷⁾.

Brandt S et al., en 2019, realizaron un estudio experimental con 45 pacientes con DM sometidos a HD desde 4.1 \pm 4 años para determinar si la capacidad de respuesta

y segregación de citocinas de los monocitos se alteran con su preactivación. Una vez realizada la activación determinaron un aumento de MC, ningún cambio en MI y disminución de los MNC, los controles sanos responden de manera similar, exceptuando por los MI que evidencian incremento. Concluyeron que, las alteraciones de la acetilación de YB-1 y citocinas pueden correlacionarse con el exceso de mortalidad en HD ⁽⁵⁸⁾.

Marcos M et al., en 2019, publicaron un estudio transversal con 102 individuos con factores de riesgo cardiovascular para caracterizar las subpoblaciones monocitarias y sus asociaciones. Se observaron correlaciones independientes de edad y sexo entre los grupos y los monocitos clásicos e intermedios. Estas mismas células se asociaron de manera significativa con los eventos vasculares adversos y con el número de leucocitos; mientras que los MNC se relacionaron solamente con más de dos factores de eventos coronarios. Por lo tanto, la evaluación de las subpoblaciones monocitarias permitió establecer un diferente perfil inflamatorio en pacientes con enfermedades cardiovasculares ⁽⁵⁹⁾.

Calahorra L, en 2019, realizó una tesis doctoral donde se analizaron muestras sanguíneas de 217 pacientes trasplantados para comprobar alteraciones inmunológicas tanto pre como postrasplante, anormalidades en las subpoblaciones LB y factores solubles. Se obtuvo que los pacientes pre-trasplantados estaban inmunocomprometidos, la cinética de los LB reguladores los ubican por debajo de los valores de los pacientes control. Por lo que, existen alteraciones en los LB y factores asociados en el periodo pre y postrasplante que podrían ser evaluadas como factor de riesgo de infección y rechazo para diversos trasplantes de órganos ⁽⁶⁰⁾.

Pérez J et al., en 2019, realizaron una revisión narrativa de pacientes diabéticos para evaluar los factores que generan y desencadenan complicaciones cardiovasculares. Su búsqueda permitió dilucidar las vías metabólicas que utiliza la hiperglucemia para potenciar un constante ambiente inflamatorio y procoagulante que conduce y agrava los eventos coronarios. La principal recomendación de este estudio fue considerar el control glucémico como medida de prevención ⁽⁶¹⁾.

Henriquez N, en 2018, publicó un estudio observacional, cuantitativo, analítico, descriptivo y transversal con 129 pacientes con ND que realizaron terapias de sustitución como HD y sesiones de diálisis peritoneal (DP) durante todo un año. Obteniendo que el 67 % realizó HD y el 33 % realizó DP, siendo esta última la que evidenció mayores complicaciones secundarias como deshidratación e infección en el orificio de salida. Se concluyó, que ambas terapias utilizadas en el hospital demostraron una asociación relevante entre el desarrollo de complicaciones con la presencia de factores de riesgo ⁽⁶²⁾.

Naicker SD et al., en 2018, efectuaron un estudio de cohorte prospectiva con 154 pacientes con ERC (Estadio 5) y 33 adultos voluntarios sanos para evaluar las principales subpoblaciones leucocitarias y sus correlaciones. Sus principales hallazgos mostraron números elevados de monocitos totales y neutrófilos en pacientes con ERC en comparación con los controles. Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) evidenciaron elevación de los MC y MI siendo estos últimos los que presentarían relación estadística significativa ⁽⁷⁾. Solo los MI de expresión alta del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) de clase II denominado sistema del antígeno leucocitario humano (HLA) que codifican a los genes de la región DR (HLA-DR^{hi}) presentaron un incremento y asociación significativa para ambas tasas estudiadas. En conclusión, se acentúa la importancia de las subpoblaciones de monocitos en la ERC y se vincula con una mayor tasa de pérdida de la función renal ⁽⁷⁾.

Álvarez A et al., en 2018, realizaron en un estudio observacional de cohorte retrospectiva cuyo principal objetivo fue generar una primera data de diferencias hematológicas y bioquímicas entre los pacientes con y sin DM2 bajo tratamiento de HD. Los resultados obtenidos remarcan las diferencias significativas en la media del porcentaje de la relación linfocitos/monocitos. Concluyen que, la diabetes juega un rol fundamental en la inflamación, anemia, linfopenia y monocitosis en pacientes sometidos a HD, sin embargo recomiendan realizar estudios a mayor escala para corroborar la evidencia obtenida ⁽⁴⁷⁾.

Elchinova E et al., en 2018, desarrollaron un estudio cuantitativo y de cohorte prospectiva con 400 pacientes. El objetivo principal fue explorar la asociación de subconjuntos de monocitos y el pronóstico en pacientes con insuficiencia cardiaca ambulatoria (IC). Los resultados revelan disminución en MC y aumento en MI en pacientes con IC en comparación con los controles informados. Por lo tanto, los monocitos según el subtipo pueden tener funciones de daño o reparación en enfermedades cardiovasculares ⁽³³⁾.

Luo Q et al., en 2018, efectuaron una investigación cuantitativa de cohorte prospectiva en 46 pacientes y 22 controles, para explorar la sobreexpresión de CD64 en monocitos CD14⁺⁺CD16⁻ y CD14⁺⁺CD16⁺ en pacientes con artritis reumatoide activa (AR). Se evidenció que los monocitos CD16⁺ se correlacionaron positivamente con los siguientes elementos: tasa de sedimentación de eritrocitos (ESR), proteína C reactiva (CRP), factor reumatoide (RF) y los anticuerpos de proteína anti citrulinado (ACPA). Además, la expresión de CD64 en monocitos intermedios (CD14⁺CD16⁺) se asociaron con los niveles séricos de IL-6. Concluyeron que, los subconjuntos de monocitos en CD14⁺⁺CD16⁻ y CD14⁺CD16⁺⁺ se elevan y se asocian con la AR, y que los niveles de CD64 en los monocitos CD14⁺⁺CD16⁺ están relacionados con el alto nivel de secreción de las citocinas pro-inflamatorias ⁽³⁰⁾.

Nicolas J, en 2018, publicó su tesis doctoral, que fue un estudio clínico y observacional de caso y control con 21 pacientes con bajo riesgo de aterosclerosis y 42 pacientes con aterosclerosis subclínica con el fin de evaluar los posibles biomarcadores en el proceso inflamatorio de esta patología. Los resultados demostraron que la segregación de moléculas pro-inflamatorias se realiza principalmente por los MC (CD14⁺⁺/CD16⁻) que representan el 80% de los monocitos totales. Se determinó aumento de expresión PMNC y monocitos totales. Por lo tanto, proponen a los MC como nuevos indicadores de aterosclerosis subclínica para realizarle un seguimiento para prevenir eventos cardiacos en el futuro ⁽⁶³⁾.

Mazur P et al., en 2018, realizaron un estudio experimental con 38 pacientes diagnosticados con estenosis aortica (EA), con el objetivo de determinar las subpoblaciones de linfocitos y monocitos. Se observaron un aumento de los MC tras la operación y disminución de MNC después de mini esternotomía. Concluyeron que, las células T CD4⁺CD8⁺ y las células NKT CD16⁺CD56⁺CD3⁺ de los pacientes está asociado con la gravedad de la patología ⁽⁶⁴⁾.

Hickey F y Martin F, en 2018, publicó una revisión en donde examinó la modulación inmunitaria durante la evolución de la ND. Resaltando el aumento de células inmunitarias (células T, células B y macrófagos) infiltradas en los riñones, producción de citocinas pro-inflamatorias (IL-1 e IL-6), quimiocinas. Según esta revisión las células T activadas pueden inducir la progresión de la enfermedad, las células CD4⁺ y CD8⁺ presentaron incrementos en el intersticio de pacientes DM2 que se correlaciona con la proteinuria. Por lo que, sugiere desarrollar unas nuevas estrategias terapéuticas que incluyan la modulación de la respuesta del sistema inmune ⁽⁶⁵⁾.

Ong S et al., en 2018, realizaron un estudio experimental que evaluó las subpoblaciones monocitarias de pacientes ancianos para evidenciar factores que contribuyan a la senescencia como proliferación, longitud de telómeros, ROS y actividad de membrana mitocondrial. Obtuvieron que los monocitos MNC mostraron las características más resaltantes y además secretaban citocinas pro-inflamatorias asociándolos probablemente con NF-κB y producción de IL-1α. Concluyeron que, la población de monocitos MNC es senescente y puede contribuir a la inflamación ⁽⁶⁶⁾.

Akbari M et al., en 2018, realizaron una revisión bibliográfica para evaluar el rol de la IL-6 en la progresión de la DM2. La información recabada les permitió visualizar la importancia de la citocina en procesos inflamatorios e inmunes y como esta patología desregula su señalización promoviendo la insulinoresistencia y llevándola a fases terminales. El incremento de la IL-6 está estrechamente relacionado con el sistema inmune innato y adaptativo ⁽⁶⁷⁾.

Ren Z et al., en 2017, realizaron un estudio experimental con 54 niños en la fase temprana de DM1 para analizar el rol de los MI durante la presentación antigénica y producción de citocinas. Los resultados de este estudio mostraron un considerable incremento de MI en sangre periférica en comparación con sus controles respectivos. Este resultado fue correlacionado con un aumento de células T de memoria (CD4⁺CD45RO) y una exacerbada producción de citocinas pro-inflamatorias como TNF- α , IL-2, IL-6 e IFN- γ . Concluyeron que, el incremento de MI puede ser un factor predictivo en la expansión de la enfermedad ⁽⁶⁸⁾.

Machado L et al., en 2017, generaron una recopilación bibliográfica donde describen como la hiperglucemia concomitante ocasiona alteraciones en la funcionalidad de las células del sistema inmune. Por lo tanto, los procesos inflamatorios y la DM están correlacionadas a las infecciones; sin embargo, se desconoce aún todas las aristas que generan que esta patología progrese hacia una sepsis pudiendo resaltar solamente la ancianidad, función celular alterada y alcoholismo ⁽⁶⁹⁾.

Tsukamoto M et al., en 2017, llevaron a efecto un ensayo clínico con 35 pacientes con AR y catorce voluntarios sanos con el propósito de definir la asociación de los monocitos CD14^{bright}CD16⁺ con la AR. Sus principales hallazgos fueron, que la proporción de monocitos intermedios se correlacionaba positivamente con la actividad de la enfermedad AR y que la inducción de la expresión de CD16 en monocitos fue inducida por IL-10. Por lo tanto, los monocitos CD16^{bright}CD14⁺ y la citocina IL-10 están involucrados en la patogénesis de la AR ⁽⁷⁰⁾.

Fontana K et al., en 2017, diseñaron un estudio experimental con 102 diabéticos apareados con 62 pacientes sanos para determinar la correlación de las citocinas IL-6, TNF- α , IL-10 y los polimorfismos respectivos. La IL-6 mostró niveles significativos en pacientes obesos y la IL-10 puede ser influenciada por el genotipo TT y el polimorfismo de nucleótido único -819 T/C. En conclusión, los niveles plasmáticos de las citocinas IL-6, IL-10 y sus genes (genotipo y polimorfismos) están asociados con la obesidad, inflamación y progresión de la enfermedad respectivamente ⁽³⁵⁾.

Xia C et al., en 2017, publicaron una revisión acerca del papel de las células T en la DM2. Este documento detalla que el incremento de estas células en el tejido adiposo, se relacionan con la resistencia a la insulina y la diferenciación de macrófagos tipo 1 que segregan citocinas pro-inflamatorias (TNF- α , IL-6 e IL-1 β) que indirectamente reducirá la producción de IL-10. Las células CD8⁺ también son esenciales para la activación y migración del macrófago al tejido adiposo mediante cofactores involucrándose en la cascada de inflamación. Concluyen que, existe una fuerte relación de los linfocitos T con la insulina resistencia y la inflamación en la DM2 ⁽²⁴⁾.

Soehnlein O et al., en 2017, publicaron una revisión que detalla el rol de los neutrófilos en diversos procesos inflamatorios. Determinaron que la hiperlipidemia e hiperglucemia al ser factores que predisponen el desarrollo de inflamación en enfermedades crónicas restringen las funciones pro-inflamatorias de los neutrófilos. Además, estas células pueden contribuir al reclutamiento de monocitos en zonas de inflamación. Postulan la inducción de eferocitosis como posible estrategia terapéutica como disminuir la inflamación ⁽⁷¹⁾.

Gheith O et al., en 2016, realizaron una revisión bibliográfica para enfatizar que la enfermedad renal diabética (ND) es una consecuencia de la DM y la prevalencia global de esta patología. Los principales factores de riesgo encontrados fueron hiperglucemia, edad, sexo, obesidad, HTA, resistencia a la insulina, hipovitaminosis D y dislipidemia. Por lo tanto, la ND es una complicación frecuente con prevalencia en la población geriátrica mayor de 65 años y que el conocimiento adecuado de sus factores puede contribuir a reducir su incidencia ⁽⁷²⁾.

Yeap WH et al., en 2016, realizaron un estudio cuantitativo experimental con muestras de pacientes con cáncer para determinar la capacidad de las subpoblaciones de monocitos humanos para generar citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). Este estudio demostró que los subconjuntos de monocitos de sangre humana que expresan CD16 poseen la capacidad de ejercer ADCC en líneas celulares, células tumorales primarias y células infectadas

por virus. Puesto que, la ADCC inducida por monocitos CD16⁺ fue tan eficiente como la de las células NK con una correlación positiva ⁽⁷³⁾.

Wildgruber M et al., en 2016 desarrollaron un estudio cuantitativo de tipo cohorte prospectiva con 143 pacientes diagnosticados en los diferentes estadios de la enfermedad oclusiva de la arteria periférica (PAOD).⁽⁷⁴⁾ Los resultados mostraron niveles significativamente elevados de CD14⁺⁺CD16⁺ en las etapas avanzadas que se asocian con otras complicaciones que son potencialmente mortales. La expresión de mieloperoxidasa (MPO) también aumentó en los monocitos proinflamatorios clásicos en estadios avanzados de PAOD. En conclusión, la comprensión de los mecanismos celulares y moleculares de las subpoblaciones de monocitos pueden servir como posibles bio marcadores ⁽⁷⁴⁾.

Barry J et al., en 2016, diseñaron una serie de experimentos para evaluar el rol de la IL-10 en la inflamación de pacientes con DM2. Como resultado principal obtuvieron que la hiperglucemia desregula esta interleucina. La IL-10 no logra inhibir al TNF- α en hemocultivos y el incremento de la concentración de glucosa daña las proteínas de señalización de la IL-10. Por lo tanto, sugieren presentar nuevas estrategias que ayuden a controlar la hipo respuesta a la IL-10 ⁽⁷⁵⁾.

Rovira S, en 2015 presentó su tesis doctoral donde evaluó la posible influencia que podría tener la producción de radicales libres en los leucocitos, así como otros mecanismos intracelulares en el desarrollo de la DM2. Los pacientes estudiados presentaron niveles aumentados de las citocinas IL6 y TNF α y moléculas como E-selectina y VCAM-1 en el suero con respecto a la población control. Se comprobó la importancia del control glicémico de la enfermedad, a mayores niveles de HbA1c existen también mayores niveles de proteína C reactiva, TNF α y E-selectina ⁽⁷⁶⁾.

Martínez P, en 2015, en su tesis doctoral evaluó la respuesta inflamatoria de los pacientes con ERC al tratamiento de HD al comparar membranas y la activación monocitaria. Sus principales resultados fueron disminución de adhesión monocitaria a las células endoteliales, al comparar el efecto de las membranas se observa disminución de la especie reactiva de oxígeno (ROS) monocitario, de

CD14⁺CD16⁺. Por lo tanto, las membranas sintéticas propician un patrón inflamatorio con disminución de monocitos activados que puede deberse a su mejor capacidad para eliminar molecular de mayor tamaño o a su mejor biocompatibilidad ⁽³⁴⁾.

Martin N, en 2015, plasmó en una revisión bibliográfica el estado inmune y la inflamación latente a la que se ven sometidos los pacientes con ERC y hemodiálisis. Explicó la alteración de la población monocitaria por la uremia, expansión de monocitos proinflamatorios (CD16⁺) y su relación con el daño endotelial. Proponiendo dos posibles opciones para poder mejorar la eliminación de las toxinas urémicas ⁽⁷⁷⁾.

Taborda N et al., en 2014, publicaron un artículo acerca de las alteraciones fenotípicas y genotípicas de las células NK en pacientes con el virus de insuficiencia humana (VIH). Su investigación pone en manifiesto la intervención de estas células en el control del incremento de la carga viral, mediante la activación de células dendríticas y su capacidad de respuesta a péptidos de este virus. Por lo cual, nos abre camino hacia nuevas estrategias preventivas inmunológicas contra el VIH ⁽⁷⁸⁾.

Guzmán J et al., en 2012, realizaron un artículo que detalla la participación de células del sistema inmune en la DM2 y la obesidad. Su principal aporte fue evidenciar un estado inflamatorio crónico constante debido al incremento del tejido adiposo, resistencia a la insulina y la producción desregulada de citocinas pro-inflamatorias. En conclusión, los pacientes obesos reclutan y activan a los macrófagos M1, mastocitos, neutrófilos, linfocitos T, CD4, CD8 y B, generando una inflamación excesiva con las citocinas producidas por estas células que desencadenan la hiperinsulinemia y luego la DM2 ⁽²⁶⁾.

Rojas F et al., en 2007, desarrollaron un estudio descriptivo para determinar las frecuencias de las células NK y NKT en 104 muestras de voluntarios sanos. Se determinó que el conteo total de células en la población NKT fue menor, el porcentaje celular en mujeres fue 14,6 % de NK y 3,0 % de NKT y para hombres 25,3 % de NK y 3,5 % de NKT. Por lo tanto, existe evidencia que sugiere que la

respuesta inmune esta sesgada por el género y se evidencia una mayor actividad en monocitos y linfocitos en mujeres ⁽⁷⁹⁾.

2. Bases teóricas

Diabetes mellitus

Es un síndrome heterogéneo provocado por la interacción genético-ambiental, caracterizado por una hiperglucemia crónica generando como consecuencia una drástica disminución en la secreción o acción de la insulina. Este síndrome engloba a un grupo de enfermedades metabólicas que se dividen en DM1, DM2 y otros tipos específicos de diabetes *mellitus* ^(5, 80).

Clasificación

La DM1 se presenta en su mayoría en individuos jóvenes, aunque este factor no es excluyente y se caracteriza por la producción nula de insulina debido a la destrucción autoinmune específica de las células beta de los islotes de *langerhans* del páncreas mediadas por las células T ^(5, 81).

La DM2 se caracteriza por una ausencia de resistencia tisular a la acción, producción y alteración de la insulina. Se desarrolla a menudo en adultos y es muy frecuente la asociación con la obesidad. Esta enfermedad representa un 80 % al 90 % del total de pacientes diabéticos ^(1, 82).

La principal correlación entre la DM y los monocitos es la hiperglucemia que favorece la activación monolítica generando que respuestas metabólicas como adhesión, migración y transmigración de estas células inmunes que incrementan ocasionando alteraciones en la quimiotaxis y fagocitosis ⁽⁶⁹⁾.

Enfermedad renal crónica

La ERC presenta una velocidad de filtración glomerular (VFG) <60 mL/min/1,73 m², y/o la presencia de daño renal, independiente de la causa, por 3 meses o más. El diagnóstico con y sin ND de ERC se establece mediante evidencias de daño renal, que puede ser definido por: alteraciones urinarias, anormalidades

estructurales, enfermedad renal genética y/o enfermedad renal probada histológicamente (2, 3, 34, 83-85).

Nefropatía diabética

Es una enfermedad caracterizada por la alteración de las funciones del riñón siendo la principal complicación grave de DM que desencadena en un aumento en su morbilidad y mortalidad. Se reconoce una asociación de la hiperglucemia con las complicaciones microvasculares de la diabetes, según estadísticas alrededor del 40 % de los casos nuevos de ERC son generados por casos secundarios a esta patología (86-88).

En la mayoría de los pacientes, el primer signo de ND es un aumento moderado de la excreción urinaria de albúmina, es decir, 30-300 mg/g de creatinina en una muestra de orina (también llamada microalbuminuria) (89).

El control glucémico inadecuado, los altos niveles de HbA1c, la dislipidemia y la obesidad son factores de riesgo fundamentales para el desarrollo y la progresión de la ND (89).

Los mecanismos inflamatorios son un punto clave en la patogénesis de la ND. En pacientes con ND, se ha encontrado niveles elevados de IL-6 interleucina 18 (IL-18), interleucina 8 (IL-8) y TNF- α , citocina asociada con la destrucción de las células B (89, 90).

Hemodiálisis

Es una técnica de depuración extracorpórea de la sangre que reemplaza parcialmente las funciones renales de excretar agua, solutos, regular el equilibrio ácido-básico y electrolítico. Se emplea un filtro o dializador, colocando una membrana semipermeable entre los dos compartimientos: el sanguíneo y líquido de diálisis. Esta membrana permite el paso de agua y moléculas de pequeño y mediano peso molecular (hasta 50 000 *Daltons*), pero impide el paso de la albúmina (69 000 *Daltons*) o moléculas de mayor peso molecular y células (2, 91, 92).

Modulación inmunitaria de la DM2

Diversos estudios apoyan el rol protagónico del sistema inmune en los dos tipos fundamentales de diabetes, pero aún se trabaja por dilucidar los mecanismos de

desregulación con el fin de poder desarrollar terapias inmunomoduladoras para esta población vulnerable ^(49, 53, 55).

La ND al ser una de las principales complicaciones de la DM2 y desencadenante de ERC involucra interacciones complejas entre las células renales residentes y los leucocitos infiltrantes, generando un estado inflamatorio crónico de bajo grado como inferencia del aumento de la masa del tejido adiposo y la producción de citocinas pro-inflamatorias. Durante este proceso el sistema inmune se ve altamente involucrado con la participación de los leucocitos granulocitos (basófilos, eosinófilos, neutrófilos y mastocitos) y agranulocitos (linfocitos y monocitos) que se pueden acumular en el riñón incluso en las primeras etapas de la enfermedad ^(17, 65). Por lo cual es tan importante poder describir las principales células inmunitarias y marcadores inflamatorios involucrados en estos procesos de alteración persistente y crónica en pacientes diabéticos.

Monocitos

Grupo de células sanguíneas clasificadas como leucocitos con núcleo oval que se originan en la medula ósea a partir de los monoblastos, y que se desplazan por el torrente sanguíneo hasta atravesar el endotelio de los capilares para terminar en el tejido conectivo de los principales órganos y tejidos⁽⁹³⁾. Los monocitos están implicados en diversos procesos biológicos para proteger a nuestro organismo, como la fagocitosis y la presentación de antígenos a los linfocitos T. Además, se encargan de eliminar restos celulares o tejidos muertos para poder devolver la funcionalidad al tejido afectado ^(56, 63, 69).

Los monocitos regulan la inflamación mediante la liberación de citocinas, tales como IL-1 β , IL-6, TNF- α y el óxido nítrico sintasa inducible. Cada tipo de monocito responde de manera diferente a los estímulos ^(34, 56, 69, 94).

Subtipos de monocitos

Las subpoblaciones de monocitos han sido identificadas por la expresión de marcadores de superficie, dividiéndose en dos grandes grupos en función de la expresión del receptor CD14 del lipopolisacárido (LPS) y el receptor CD16 (Fc RIII) ^(29, 32, 34, 66).

Los MC (CD14⁺⁺/CD16⁻) representan un total de más del 80 % de monocitos periféricos; expresando CCR2, CD62L y CD64, cuya principal función es desechar los neutrófilos apoptóticos en los lugares de inflamación ^(29, 32, 33, 66, 95, 96). Los MI (CD14⁺/CD16⁺) y los MNC (CD14⁺/CD16⁺⁺) son la población de monocitos que expresan en mayor cantidad citocinas pro-inflamatorias, para la presentación antigénica y extravasación, lo cual se puede ver asociado con la etiopatogénesis de múltiples enfermedades ^(32, 97). Los MNC están estrechamente relacionados con daño endotelial porque contribuyen al incremento de la expresión de quimiocinas (CX3CR1, CCR5 y CCR7) que generan respuesta inflamatoria, estrés oxidativo y muerte celular de células endoteliales ⁽⁷⁷⁾.

La expresión marcada de diversos receptores y moléculas de adhesión en los monocitos, puede jugar un rol importante en la funcionalidad de estas células, otorgándoles no sólo diferentes patrones migratorios sino también diferente respuesta a la infección ⁽⁹⁷⁻⁹⁹⁾.

Linfocitos T

Los linfocitos T son células encargadas de la inmunidad celular que se generan en la médula ósea y completan su desarrollo en el timo, diferenciándose a linfocitos colaboradores o citotóxicos, que posteriormente migran a los órganos linfoides secundarios ^(93, 100).

Linfocitos T CD4⁺ o colaboradores

Las células T CD4⁺ reconocen con su receptor de antígenos (TCR) péptidos unidos a las moléculas MHC de clase II, expresadas en las CPA, o sea macrófagos, linfocitos B y células dendríticas. Una vez activadas, las células T CD4⁺ activadas secretan citocinas que polarizan la respuesta inmunitaria global contra el patógeno. El desarrollo tecnológico y metodológico ha permitido discriminar diferentes subtipos de linfocitos Th, como Th1, Th2, Th17, Treg, Th9 y Th22. Los linfocitos Th1 secretan fundamentalmente citocinas pro-inflamatorias que estimulan la respuesta inmune celular, mediada entre otras células por LT CD8⁺, como IFN- γ , TNF- α , IL-17, IL-9; mientras que los Th2 estimulan fundamentalmente la respuesta humoral mediada por LB, a través de citocinas como IL-4, IL5, IL13. Citocinas anti-inflamatorias como la IL10 también pueden ser secretadas por Th2 ^(32, 63, 69, 100).

Se ha reportado un incremento de células T CD4⁺ de memoria en tejido adiposo en humanos y ratones obesos. Asimismo, el análisis de las secuencias del receptor de células T también revela una diferencia de las células T aisladas de tejido adiposo de ratones obesos en comparación con ratones delgados, sugiriendo una expansión oligoclonal de células T antigénico específico ^(26, 63, 69).

Linfocitos T CD8 o citotóxicos

Las células T CD8⁺ reconocen con su TCR péptidos unidos a MHC de clase I, moléculas que se encuentran en todas las células nucleadas ⁽¹⁰¹⁾. Cuando la célula T CD8⁺ reconoce su antígeno, activa mecanismos para desarrollar su función efectora citotóxica, incluyendo la secreción de citocinas (TNF- α e IFN- γ), la producción y liberación de gránulos citotóxicos, y la vía pro-apoptótica de Fas/Fas L ⁽¹⁰²⁾.

Diversos estudios confirman que la obesidad promueve la activación de células T CD8⁺ en el tejido adiposo, desencadenando la resistencia a la insulina y la DM2⁽²⁶⁾. Se ha medido la funcionalidad de las células CD8⁺ en el tejido adiposo. Experimentos *in vitro* han demostrado que estas células poseen un fenotipo activado y producen grandes cantidades de mediadores pro-inflamatorios, los cuales se han asociado a la activación y reclutamiento de macrófagos ⁽²⁶⁾.

La remoción de las células T CD8⁺ del tejido adiposo disminuye tanto la infiltración de macrófagos M1 dentro de los cúmulos de grasa visceral como las citocinas TNF- α , IL-1, IL-6 y la proteína quimio atrayente de monocitos 1 (MCP-1). Esta condición mejora la sensibilidad de la insulina y la tolerancia a la glucosa ⁽²⁶⁾.

Linfocitos B

Tipo celular que cumple diversas funciones en la inmunidad humoral, fundamentalmente la secreción de anticuerpos o inmunoglobulinas. Su proceso de maduración ocurre en la médula ósea, incluyendo el correcto reordenamiento de los genes de las inmunoglobulinas. Una vez completado, migra a los ganglios linfáticos donde se activa tras el reconocimiento directo de antígenos con su

receptor (BCR). La calidad de la respuesta de anticuerpos depende significativamente de la interacción entre LB y LT CD4⁺ (60, 93).

También desempeñan otros roles, como la presentación de antígenos a los linfocitos T CD4⁺, la regulación negativa de la inflamación y la regulación de las respuestas frente a autoantígenos. Los anticuerpos producidos por los linfocitos B cumplen funciones efectoras como: la activación del sistema de complemento; la opsonización de microorganismos; la neutralización de virus y toxinas; la sensibilización de granulocitos.

Las células B aisladas de pacientes de DM2 muestran una producción disminuida de IL-10 en respuesta a receptores tipo *toll* 2 (TLR2), receptor tipo *toll* 4 (TLR4) y receptor tipo *toll* 9 (TLR9). Así mismo, las células B aisladas de sangre periférica de pacientes con DM2 producen niveles elevados de la quimiocina pro-inflamatoria IL-8, en comparación con sujetos sanos (26, 103).

Linfocito asesino natural (NK)

Las NK son linfocitos grandes granulares, conocidos como células asesinas, que representan el 10-15% de los linfocitos circundantes y del bazo. Caracterizados fenotípicamente por expresar en su membrana las moléculas CD3⁻CD56⁺ y/o CD16⁺. Median funciones citotóxicas, para eliminar células infectadas o tumorales a través de granzimas, perforinas, e IFN- γ , entre otros mediadores (100, 104).

Linfocito T asesino natural (NKT)

Las células NKT comparten propiedades con las células T y las células NK, al reconocer con el TCR lípidos o glucolípidos asociados a la molécula presentadora CD1d. La principal función de estas células es ser nexo entre el sistema inmune innato y adaptativo, siendo capaces de regular las funciones de otras células. De manera adicional estimulan la actividad de las células dendríticas, las NK, los neutrófilos, los macrófagos, los LB y LT. Además, contribuyen al desarrollo de la inflamación en el tejido adiposo y a la resistencia a la insulina (105, 106).

Marcadores de inflamación

La pérdida gradual de la función renal en la ND desencadena una respuesta inflamatoria que puede derivar del reconocimiento de las acciones y efectos de diversas citocinas pro-inflamatorias ^(69, 94).

Interleucina 6 (IL-6)

Es una citocina pleiotrópica que regula una amplia gama de procesos biológicos ayudando a la correcta interacción de los grupos celulares durante la respuesta del organismo a una infección. Tiene efectos significativos a nivel renal, al incrementar la permeabilidad endotelial, excitar las células mesangiales y mediar la expresión de fibronectina por las mismas ^(107, 108).

Esta citocina activa cascadas de señalización celular a través de receptores de membrana y receptores solubles, por lo cual su expresión renal se relaciona directamente con la malformación renal congénita, con la gravedad del daño glomerular y de los cambios estructurales en la ERC ⁽¹⁰⁹⁾.

Diversos estudios detectaron niveles altos de IL-6, tanto a nivel sérico como urinario, en pacientes con ND. Se ha observado un aumento gradual de las concentraciones séricas y urinarias de IL-6 a medida que se desarrolla la lesión renal ⁽⁶⁷⁾.

Interleucina 10 (IL-10)

Es una citocina antiinflamatoria generada principalmente por los linfocitos T y por el estímulo de células monocitárias. La IL-10 contrarresta los procesos inflamatorios como activación y adhesión leucocitaria, lo que genera la disminución de IFN, IL-2, IL-1, IL-6 y TNF- α ⁽¹⁰⁷⁾.

El rol de esta citocina en el contexto del daño renal todavía no ha sido totalmente esclarecido. Algunos estudios le asignan una función protectora en la ND, pero a largo plazo su sobreproducción podría contribuir de manera indirecta a la evolución de la enfermedad ⁽⁷⁵⁾.

Interleucina 1 beta (IL-1 β)

Citocina pro-inflamatoria con diversas funciones en el sistema inmune producida principalmente por monocitos y macrófagos. La resistencia a la insulina genera el incremento de esta interleucina en pacientes diabéticos obesos que se asocia con la disfunción endotelial, las vías de regulación del metabolismo de lípidos, el proceso de adipogénesis y la secreción de moléculas de adhesión celular en sitios inflamados ^(19, 110, 111).

Interferón gamma (IFN- γ)

Citocina de la familia de los interferones, mediadora de respuesta inmune celular, muy relevante en el control de virus y células neoplásicas. Es secretada por linfocitos Th1, NK y NKT participando en la regulación inmunitaria al favorecer la diferenciación de macrófagos M1 y regular la secreción de anticuerpos ^(26, 57, 112).

Citometría de flujo

Esta tecnología es utilizada para realizar mediciones multiparamétricas de células completas o constituyentes celulares preparados, como núcleos y orgánulos que nos permite analizar y cuantificar de manera simultánea sus características ^(113, 114).

El citómetro de flujo está compuesto por tres sistemas: el sistema de fluidos que alinea y transporta las células dentro de una cámara de flujo hacia el haz de luz ⁽¹¹⁵⁾, el sistema óptico que está compuesto por láseres y filtros, que se encargan de iluminar a las células y dirigir las señales resultantes hacia los detectores apropiados ⁽¹¹⁴⁾ y el sistema electrónico que consta de sensores luminosos (fotodiodos y fotomultiplicadores) que convierten los fotones en electrones en corriente eléctrica ⁽¹¹⁶⁾.

La citometría de flujo abre campo al diagnóstico y caracterización de las diversas etapas de las enfermedades, cambios asociados o las posibles terapias ⁽¹¹⁷⁾, así como el seguimiento de la recuperación inmune tras algún trasplante ⁽¹¹⁸⁾ y las aplicaciones en otras áreas como biología molecular, bacteriología, biología del cáncer entre otras ⁽¹¹⁴⁾.

Calibración

Para la calibración del citómetro se emplea una mezcla de perlas “*beads*” estables de diferentes niveles de intensidad con valor referencial, se realiza el ajuste de voltajes de los fotomultiplicadores (PMT) tomando en cuenta los valores objetivo-suministrados por el fabricante. No es necesario que la calibración sea diaria, sin embargo, la calidad del instrumento debe monitorearse. Si los controles están fuera de rango o el citómetro ha sido reparado será necesario recalibrar ⁽¹¹⁹⁾.

Compensación

Es un factor de corrección aplicado por el desbordamiento de fluorescencia de la señal de detección de un fluorocromo para poder garantizar así que los valores objetivo de la intensidad de fluorescencia media (MFI) se mantengan a lo largo del tiempo. Generalmente, es realizado de manera automática por el software de adquisición del fabricante de equipo, mediante la adquisición de controles de compensación (*beads* o muestras preparadas) y luego optimizado por el usuario. Esta etapa se hace más difícil a medida que los paneles son más amplios por lo cual, los citómetros que cuentan con softwares que calculan automáticamente la matriz de compensación son herramientas de mucha utilidad ⁽¹¹⁹⁾.

PCR en tiempo real

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR)-en tiempo real es una herramienta moderna para detectar y cuantificar genes, basada en su alto rendimiento, sensibilidad, precisión y versatilidad a partir de una reacción enzimática *in vitro* utilizando un termociclador que amplifica el número copias de una secuencia específica de ADN durante varios ciclos repetidos ^(120, 121).

La reacción consta de tres fases sucesivas: (1) desnaturalización del ADN de doble cadena (dsDNA) original, (2) hibridación de dos cebadores de ADN monocatenario (ssDNA) cortos y (3) elongación del ADN de cada ssDNA unida al cebador por la ADN polimerasa. Los ciclos se repiten de 30 a 40 veces, lo que da como resultado una amplificación mayor del material inicial ⁽¹²²⁾.

El análisis de la expresión génica se puede realizar mediante el uso de sondas de hidrólisis unidos a oligonucleótidos o agentes de intercalación de ADN bicatenario como *SYBRGreen* que permite la detección de productos de amplificación tanto específicos como no específicos ⁽¹²³⁻¹²⁵⁾.

SYBR Green I

Es un colorante de cianina asimétrico específico de dsDNA que se une al surco menor de dsDNA. Los productos de la PCR se saturan con el colorante 1000 veces generando el aumento de la señal de fluorescencia cuando se monitorea en tiempo real ⁽¹²⁶⁾. Este método evita la utilización de sondas de qPCR, siendo menos costoso; sin embargo, se debe considerar el riesgo de amplificar productos de PCR no específicos como los dímeros de cebadores ⁽¹²⁷⁾.

Real time PCR cuantitativa

La PCR en tiempo real cuantitativa relativa es usada en diferentes campos de investigación incluyendo la expresión génica de experimentos biológicos ^(128, 129).

Cuantificación relativa

Su principal aplicación es la comparación de los niveles de expresión génica RNA mensajero entre diferentes tejidos o tratamientos a partir de la comparación con un gen control como β -actina, β -2-microglobulin o GAPDH, los cuales sirven para mejorar la confiabilidad de los experimentos relativos de RT-qPCR ⁽¹³⁰⁾. No es necesario establecer complejos modelos de cuantificación, convirtiéndose en una herramienta ideal y de bajo costo ⁽¹³¹⁾.

El método $2^{-\Delta\Delta C_T}$ es una forma de analizar cambios relativos en la expresión génica a partir de experimentos de PCR cuantitativa en tiempo real ^(128, 132).

3. Definición de términos básicos

Nefropatía diabética: Complicación crónica de DM debido a las constantes alteraciones metabólicas y hemodinámicas a las que se ve expuesto el sistema de filtración renal ⁽⁸⁸⁾.

Diabetes mellitus: Enfermedad metabólica caracterizada por las concentraciones elevadas de glucosa en la sangre de manera persistente o crónica ^(5, 133).

Filtración glomerular: La filtración glomerular es el paso de líquidos desde el capilar glomerular a la luz tubular a través de las fuerzas de *Starling* ⁽¹³³⁾.

Hemodiálisis: Tratamiento de sustitución de las funciones de los riñones mediante una máquina que filtra los desechos, sales y líquidos del torrente sanguíneo ⁽²⁾.

Células mononucleares de sangre periférica (PBMC): Células sanguíneas con núcleo redondeado, como los monocitos y linfocitos ⁽⁷⁾.

Monocito: Tipo de glóbulo blanco agranulocito que representa del 2 al 8% de leucocitos en la sangre ^(32, 93).

Linfocito: Célula inmunitaria que representa el 30 % del total de leucocitos en la sangre periférica ^(93, 100).

Citocina: Conjunto de proteínas y glucoproteínas secretadas por diferentes células que actúan como reguladores de la respuesta inmune ⁽¹⁰⁰⁾.

Interleucina: Conjunto de citocinas de bajo peso molecular expresadas por los leucocitos para regular las funciones del sistema inmune ⁽¹⁰⁸⁾.

Interleucinas proinflamatorias: Grupo de citocinas que regulan el aumento de la respuesta inflamatoria de manera eficaz ante las infecciones. Entre las consideradas pro-inflamatorias, tenemos las interleucinas: IL-1, IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-7, TNF- α e IFN- γ ^(19, 55, 69, 108).

Interleucinas antiinflamatorias: Grupo de citocinas que tienen la función de inhibir la cascada de liberación de las interleucinas pro-inflamatorias. En condiciones patológicas y durante el proceso de inflamación las funciones antagonistas de estos dos grupos de interleucinas pueden tener un comportamiento dual. Las principales

antiinflamatorias son IL-4, IL- 10, IL-13 y TGF- β (factor de crecimiento transformante β) (19, 55, 108).

Citometría de flujo: Tecnología que permite medir las señales ópticas emitidas por las células o partículas de tamaño celular, en una corriente de flujo en movimiento. El uso de fluoróforos permite la identificación de moléculas en la membrana plasmática o en compartimentos subcelulares (32, 134, 135).

FSC: Dispersión frontal o *forward scatter*, es un parámetro que nos proporciona información del tamaño del evento (119).

SSC: Dispersión lateral o *side scatter*, es un parámetro que nos proporciona información de la cantidad de estructuras granuladas o la complejidad interna del evento (119).

Fenotipo leucocitario: Es la agrupación de los linfocitos, con determinada función y grado de diferenciación, en base a la expresión de diversos marcadores moleculares en la membrana celular. La citometría de flujo es una técnica muy utilizada para caracterizar el fenotipo leucocitario (136).

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR): Técnica de biología molecular que utiliza una enzima ADN polimerasa termoestable (Taq ADN polimerasa) y un termociclador para seguir en tiempo real la amplificación de millones de copias de un determinado fragmento de ácido desoxirribonucleico (ADN) (120, 137).

Termociclador: Instrumento que consta de una fuente de luz de excitación integrada, un sistema de detección de fluorescencia y un software para automatizar y secuenciar la técnica de PCR (121).

RT-PCR: Es una técnica de PCR con transcripción reversa en tiempo real (RT-PCR, de sus siglas en inglés) que permite la detección de ADNc mediante fluorescencia, a partir de una transcripción reversa de ARNm (120).

q PCR: Técnica que se utiliza para cuantificar ácidos nucleicos para numerosas aplicaciones a partir de una curva de calibración o un estándar ⁽¹²⁹⁾.

Retro transcriptasa: Es una enzima de tipo ADN polimerasa, codificada por retrovirus, cuya función es sintetizar ADN de doble cadena a partir de una copia de ARN ⁽¹³⁰⁾.

Expresión génica: Proceso que utiliza la información cifrada en el ADN, para sintetizar moléculas de ácido ribonucleico (ARN), requeridas para la síntesis de proteínas o con roles vinculados con la regulación de la expresión genética ^(56, 120, 138).

ARN mensajero: El ARNm es el ácido ribonucleico monocatenario que transfiere el material genético del núcleo celular a un ribosoma en el citoplasma, determinando la secuencia de los aminoácidos de una proteína ⁽⁶³⁾.

ADN complementario: El ADNc es un ADN sintético de doble cadena generado a partir de un ARNm mediante la catálisis enzimática de la transcriptasa inversa ⁽⁶³⁾.

4. Hipótesis

Existen diferencias significativas en expresión fenotípica y génica de marcadores funcionales en las subpoblaciones de linfocitos y monocitos de sangre periférica en pacientes con o sin DM2 tratados con hemodiálisis en un centro privado nefrológico

Variables del estudio

Variables dependientes:

- a) Cantidad de subpoblaciones de linfocitos y monocitos; ambos datos serán consideradas en el estudio de forma cualitativa y cuantitativa.
- b) Expresión de citocinas: IL-10, IL-6, IFN- γ e IL-1 β ; estas serán consideradas como variables cuantitativas

Variable independiente: Diabetes *mellitus* tipo 2

Variables confusoras: edad, sexo, etiología de ERC-t y comorbilidades

III. METODOLOGÍA

1. Diseño metodológico

El presente trabajo es un estudio de tipo descriptivo, observacional, comparativo, transversal y prospectivo, que evaluó a pacientes con ERC con o sin DM2, sometidos a HD, en el centro nefrológico privado CENESA S.A.

2. Diseño muestral

Población universo

Pacientes con ERC sometidos a HD

Población de estudio

Pacientes con ERC en HD atendidos en CENESA S.A durante el periodo 2019-2020 (n=91), distribuidos en dos grupos: pacientes con DM2 (G1=9) y control sin DM2 (G2=9).

Unidad de análisis: Muestra sanguínea de pacientes con o sin DM2.

Criterios de elegibilidad

De inclusión

Pacientes

- Mayores de 50 años
- Con diagnóstico ERC, con o sin DM2.

De exclusión

- Pacientes con patologías hematológicas, oncológicas y autoinmunes.
- Tener un periodo de HD menor a 1 año.
- Mala calidad de la muestra para el procedimiento
- Defunción
- Negación a firmar el consentimiento informado.

Selección y tamaño de la muestra

Para establecer la proporción de las poblaciones celulares, se seleccionaron del centro CENESA todos los pacientes con ERC en tratamiento de HD (n=91), se identificaron que 22 pacientes tenían DM2 y solo se seleccionaron a los pacientes que cumplían los criterios de inclusión y exclusión establecidos en este estudio (G1=9). A partir de la otra población de pacientes sin DM2 (n=69) se parearon por rangos de edad con pacientes con DM2, elegidos aleatoriamente hasta alcanzar el mismo número del grupo de pacientes diabéticos (G2=9) (Fig.1). A todos los pacientes del estudio se les invitó a participar voluntariamente y se les solicitó firmar su autorización con el respectivo consentimiento informado. (Anexo1) Se registraron las historias de los pacientes, de los cuales se obtuvieron los datos etiológicos, clínicos y parámetros hematológicos de los pacientes estudiados.

Tamaño de la muestra: 9 pacientes con DM2 y 9 pacientes sin DM2

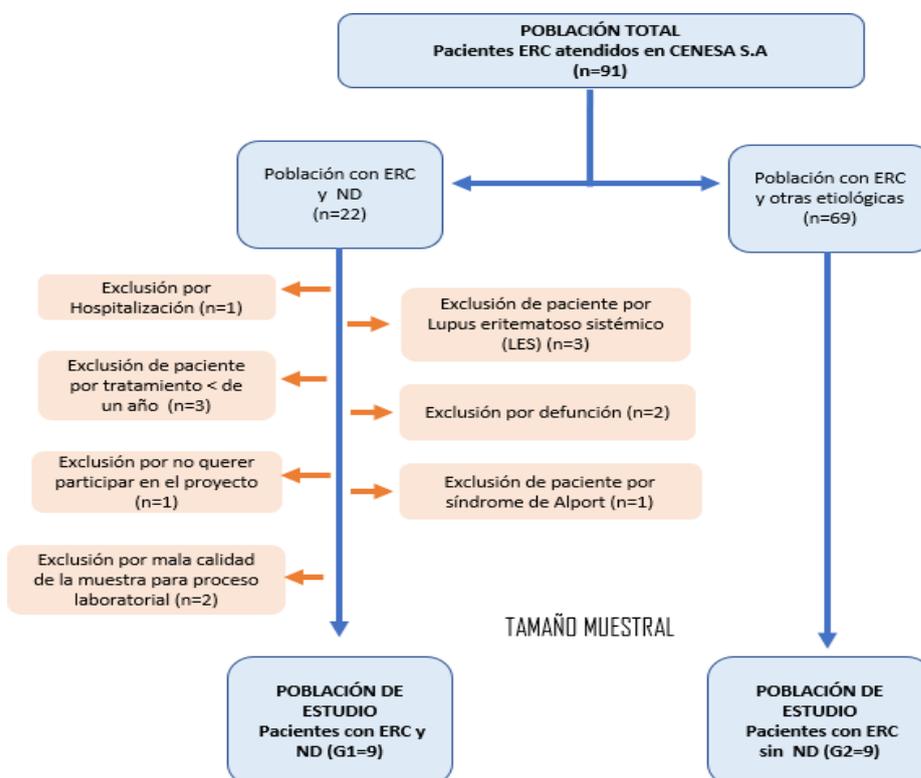


Figura 1. Flujograma de inclusión y exclusión de los pacientes en el estudio

4. Técnica y procedimiento de recolección de datos

Instrumentos de recolección de datos clínicos

La data de cada uno de los pacientes involucrados en este estudio fue obtenida a partir de las historias clínicas, hemogramas, hojas de registro y notas de evolución de CENESA, luego de firmado los consentimientos informados respectivos.

Técnica de recolección de muestras

Recolección y separación de las PBMC

Todas las muestras trabajadas durante este estudio fueron consideradas como agentes potencialmente infecciosos y, por lo tanto, se tomaron todas las medidas de bioseguridad requeridas.

Las PBMC fueron obtenidas a partir de dos tubos (*BD Vacutainer®*) de 4 mL de sangre periférica de pacientes diabéticos y controles, extraídas del antebrazo mediante sistema de colección al vacío, utilizando tubos que contenían EDTA (*Vacutainer, Becton-Dickinson, San José, CA, USA*). Se agregó 4 mL de tampón fosfato salino 1x (PBS) (*Sigma-Aldrich®*) a cada muestra, lo que generó un volumen total de 16 ml por cada paciente.

La separación de los PBMCs de los otros componentes de la sangre se realizó mediante la técnica de centrifugación en gradiente de densidades, con el reactivo Ficoll-Paque PLUS (*Histopaque®-1077*). De la mezcla total se tomaron 3 ml por paciente y se agregaron 3 ml de Ficoll-paque, los cuales fueron centrifugados a 2000 revoluciones por minuto (rpm), durante 20 minutos, a temperatura ambiente (TA), para la formación de las capas e interfases celulares. De la parte superior se recolectó el plasma, almacenado a -80°C para las pruebas serológicas.

El paquete celular de las PBMC se colectó del anillo blanquecino formado en la interfase entre el plasma y el Ficoll-paque. Se agregaron en otro tubo para ser doblemente lavadas y centrifugadas a 2000 rpm por 5 minutos con 1 a 2 ml PBS1X. Finalmente se eliminó el sobrenadante y el pellet con el paquete celular fue re-suspendido en 200 µL de PBS. Las células obtenidas fueron divididas en dos

grupos, el primer grupo fue utilizado para las pruebas de citometría de flujo y el segundo grupo fue utilizado para las pruebas moleculares.

Conteo celular

Se realizó el conteo celular en el hematocitómetro de 0,1 mm de profundidad con reglilla de Neubauer, con un total de 1×10^6 células/mL de sangre del paciente como estándar en cada microvial. Se obtuvo un total de 6 microviales por paciente. Para realizar el conteo de las PBMC se realizó una mezcla de medio *RPMI 1640* (*Gibco*TM) (25 μ L), azul de tripán (12,5 μ L) y muestra (12,5 μ L).

De la mezcla final se colocaron 10 μ L en la cámara de Neubauer previamente homogenizados. (Fig.2 A) Se colocó el hematocitómetro en el microscopio 40x y se localizó la retícula grabada, antes de iniciar se dejaron asentar las células por 2 minutos. El conteo celular para cada cuadrante externo osciló entre las 20 a 50 células, teniendo un total de 80 a 200 células en los cuatro cuadrantes, las células localizadas en los márgenes externos de las esquinas serán excluidas. (Fig. 2B)

El colorante azul de tripán al ser un derivado de la toluidina es capaz de teñir las células muertas (células no viables) de azul para diferenciarlas de las células vivas (células viables) que son birrefringentes o blancas(Fig.2C) ⁽¹³⁹⁾. Para obtener la concentración celular presente en la suspensión inicial cuando se han utilizado los 4 cuadrantes se calculó de la siguiente manera:

$$\text{Concentración celular (cel./mL)} = \frac{\text{Conteo de células vivas} \times \text{Factor de dilución} \times 10,000}{4}$$

Para obtener el total de células presentes en la suspensión original de donde se obtuvo la alícuota:

$$\text{Células totales} = \text{concentración celular} \times \text{volumen total de la muestra original}$$

Para obtener la viabilidad celular de la muestra de los pacientes:

$$\text{Viabilidad celular} = \frac{\text{Número total de células vivas}}{\text{Número de células totales vivas y muertas}} \times 100$$

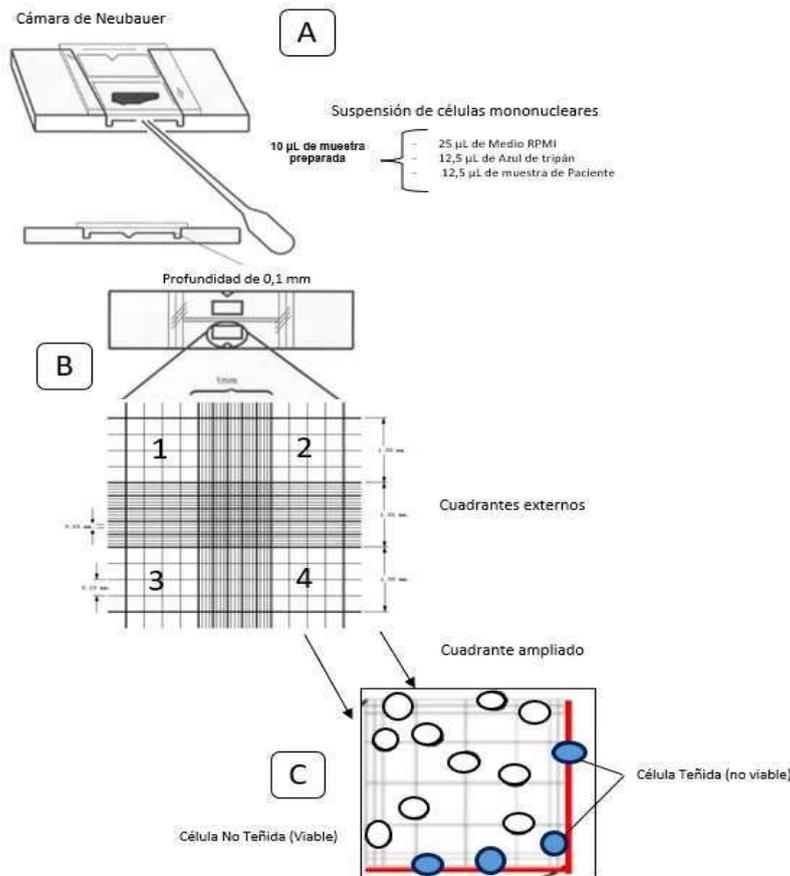


Figura 2. Conteo celular de PBMC con el hematocitómetro.

Citometría de flujo

Las PBMC se lavaron y resuspendieron en solución *FACS* (PBS1x, 10% suero fetal bovino (SFB), 0,1 % azida de sodio) a una concentración de 1 a 2 millones de células por tubo. Los anticuerpos monoclonales se emplearon a razón de 5 µL por millón de células, en 100 µL de volumen de tinción, con base en el siguiente panel de anticuerpos monoclonales: detección de linfocitos T, PE-Cy7-CD3, APC-CD4, PerCP-Cy5.5-CD8, PE-CD45RA, FITC-CCR7; detección de linfocitos B, PercP-Cy5.5-CD19; detección de monocitos, PE-Cy7-CD3, FITC-CD14, APC-CD16; detección de linfocitos NK y NKT, APC-CD16, PE-CD56, PE-Cy7-CD3 ⁽¹⁴⁰⁾.

Fue importante determinar, en primera instancia, el espectro de excitación y emisión de los fluorocromos para el correcto armado de los paneles y para la elección del citómetro, ya que la excitación de los fluorocromos depende de los láseres del instrumento y el rango de emisión de los filtros. Los fluorocromos utilizados en este estudio fueron descritos en la Tabla 1.

Tabla 1. Longitudes de onda máximas para los fluorocromos

Fluorocromo	Abreviatura	Laser	Excitación Max (nm)	Emisión Max (nm)
Isotiocianato de fluoresceína	FITC		494	519
Ficoeritrina	PE	AZUL	496,564	578
Proteína Peridinina clorofila cianina 5	PercP Cy5.5		482	695
Ficoeritrina cy7	PE-Cy7	ROJO	496,564	488,532
Alofococianina	APC		650	785

Las muestras se incubaron por 30 minutos a 4°C. Luego, se lavaron tres veces a 2000 rpm por 5 minutos y se resuspendieron en 200 µL de solución *FACS*. Para mantener la cadena de frío, las células se colocaron en el refrigerador a 4°C hasta la adquisición en el citómetro de flujo. Para identificar a las poblaciones celulares de los pacientes con o sin DM2 se utilizaron los siguientes marcadores fenotípicos Tabla 2 ⁽¹⁴⁰⁾.

Tabla 2. Marcadores fenotípicos evaluados en cada subpoblación leucocitaria

Subpoblaciones		Fenotipo
Linfocitos	Linfocito T CD4+	CD3 ⁺ /CD4 ⁺
	Linfocito T CD8+	CD3 ⁺ /CD8 ⁺
	Linfocito B	CD3 ⁺ /CD19 ⁺
	Linfocito NK	CD3 ⁻ CD56 ⁺ /CD16 ⁺
	Linfocito NKT	CD3 ⁺ CD56 ⁺ /CD16 ⁺
Monocitos	Monocito clásico	CD14 ⁺⁺ /CD16 ⁻
	Monocito intermedio	CD14 ⁺ /CD16 ⁺
	Monocito No clásico	CD14 ⁺ /CD16 ⁺⁺

Adquisición y análisis por citometría de flujo

La adquisición de las muestras se realizó en el citómetro de flujo modelo BD *FACSLyric™ Clinical Flow Cytometry System*⁽¹⁴¹⁾ con la aplicación *BD FACSuite* v1.5 del Instituto de Investigación y Aplicación Celular (INIAC) con apoyo del Lic. Jhon Pando Mayta y con el investigador el PhD Víctor Arrunátegui. Los protocolos se realizaron calibrando los voltajes y ajustando las compensaciones para los distintos fotomultiplicadores según los parámetros recomendados por el instituto INIAC.

Para la calibración del equipo se utilizaron las perlas *BD CS&T* como un control de calidad del rendimiento del sistema con el fin de asegurarse de que la configuración del detector sea óptima y así activar el proceso de alineación láser automatizado.⁽¹⁴¹⁾ Esta funcionalidad habilitada por la aplicación *BD FACSuite™* garantiza que todo el proceso de configuración se pueda realizar sin intervención manual.

La compensación se realizó utilizando como controles las *BD® FC Beads* que tienen una validez de 60 días. Los valores de desbordamiento se mantienen dentro del software y se actualizan automáticamente con los cambios de PMTV. (Anexo 2.)

Se utilizó como control negativo células de pacientes con ERC sin marcar para evaluar la auto fluorescencia de las células y definir la población negativa y el inicio de la población positiva. Se estableció un umbral de adquisición para evitar el registro de eventos no deseados como plaquetas, células muertas y detrito celulares⁽¹⁴²⁾.

Para el análisis de las poblaciones celulares y definición de regiones, se utilizaron los parámetros de tamaño (FSC) y granularidad (SSC) y así obtener un gráfico bipolar, típico de las subpoblaciones leucocitarias como son linfocitos, y monocitos. Se eliminaron los *doublets* utilizando la FSC y la combinación de los tres parámetros de medición del pulso FSC-A (área), FSC-H (altura) y FSC-W (ancho). Además, se utilizó la técnica de *gating* o ventanas de selección que nos

permiten identificar y separar las distintas subpoblaciones para cada tubo, así como como generar imágenes de dos dimensiones de citometría de flujo (*Dot plot*) e histogramas ⁽¹⁴²⁾ (Anexo 3).

El análisis de las muestras fue realizado en el *software* Infinicyt™ considerando que en cada muestra se adquirieron como mínimo 100 mil eventos. En este trabajo se utilizó la clasificación establecida en el documento de consenso de la *European Society of Cardiology* entre otras literaturas ^(59, 100, 143, 144).

Recuentos leucocitarios

El procesamiento de datos de la citometría se llevó a cabo a partir del recuento leucocitario (células/mm³) del hemograma como un total de 100 %, para la obtención del recuento de los linfocitos y monocitos, se obtuvo a partir del porcentaje de linfocitos y monocitos descrito en el hemograma. (Anexo 4.)

En el análisis de citometría, se obtuvo los porcentajes de los linfocitos T, B, NK, NKt y subpoblaciones monocitarias (MC, MI, MNC). El recuento de las subpoblaciones linfocitarias y monocitarias, se calculó a partir del recuento previamente obtenido del hemograma. Los análisis de los porcentajes para recuento de células TCD4⁺ y células TCD8⁺, se tomó el valor de recuento de linfocitos T previamente calculado.

Determinación de la expresión génica de marcadores de inflamación

La determinación de las citocinas IL-6, IL-10, IL-1β e IFN-γ, se realizó mediante la técnica de PCR en tiempo real cuantitativa relativa (RT-qPCR), según se describe a continuación.

Extracción y cuantificación de ácidos nucleicos

Para poder iniciar las pruebas moleculares el paquete celular obtenido a partir de las PBMC de las muestras de los pacientes fue homogenizado con el reactivo TRIzol™ (*Sigma-Aldrich*®). Se adicionó 1 mL de TRIzol™ por cada vial y se incubó por 5 minutos a TA, luego se agregaron 200 µL de cloroformo (*Sigma-Aldrich*®), se agitaron e incubaron en hielo por 15 min. La mezcla resultante se centrifugó a 12 000 rpm por 15 min, a 4°C para obtener la fase acuosa superior incolora. Este

sobrenadante transparente se mezcló con 500 μL de isopropanol (Sigma-Aldrich®) y se incubó durante toda la noche en la congeladora.

Al día siguiente, las muestras se centrifugaron a 12000 rpm por 30 minutos, a 4°C. Se retiró el sobrenadante, y el ARN precipitado se re-suspendió en 1 mL de etanol grado molecular al 75 % (*PanReac AppliChem ITW Reagents*). Las muestras se centrifugaron a 12 000 rpm durante 10 minutos. Finalmente, se eliminó el sobrenadante y se dejó secar el *pellet* por 15 minutos, antes de re-suspenderlo en agua ultra pura (*PanReac AppliChem ITW Reagents*).

De manera previa a realizar la síntesis de ADNc se ajustó la concentración de la muestra de ARN a una concentración de 500- 1200 ng/ μL con el fluorómetro Qubit con el kit *Qubit™ RNA High Sensitivity (HS)*, se utilizó 1 μL de muestra y 199 μL de solución de trabajo (10 μL del reactivo de Qubit™ y 1990 μL de la solución tamponada de Qubit™).

Síntesis del ADNc

La síntesis de ADNc se realizó según las indicaciones del kit *MAXIMA 1STR CDNA SYNTH KIT (Thermo Scientific™)*.⁽¹⁴⁵⁾ Este kit está optimizado para la síntesis de cDNA mediante la prueba de RT-PCR cuantitativa (RT- qPCR) de dos pasos, utilizando la enzima transcriptasa inversa Maxima™ (RT). Esta enzima produce cantidades de ARN total desde 1 pg a 5 μg , a altas temperaturas (42 a 65°C), en un tiempo de 15 a 30 minutos. Además, contiene una ADNasa bicatenaria específica para eliminar contaminantes sin dañar la calidad o cantidad de ARN. Los insumos del kit se mantuvieron en hielo todo el tiempo para luego ser mezclados y centrifugados a 1200 rpm por 1 minuto. Luego se añadieron en un tubo estéril libre de ARNasas de 1,5 mL (Tabla 3).

El ARN molde fue agregado dependiendo de la cantidad obtenida en la cuantificación de cada muestra (ng/ μL), en caso que la muestra tuviera ≤ 500 ng/ μL se agregó 1 μL y si fuera ≥ 500 ng/ μL se agregó 0.5 μL .

Tabla 3. Primera etapa del protocolo del kit *MAXIMA 1STR CDNA SYNTH KIT (Thermo Scientific™)*

Reactivo	Cantidad
Solución Tampón de dsDNAsa 10X	1 µL
Solución dsDNAsa	1 µL
ARN molde	0,5µL - 1µL
Agua libre de Nucleasas	q.s.p 7 µL
Volumen total	10 µL

Se incubó el tubo con la mezcla en un agitador por 2 minutos a 37°C y luego se centrifugó a 1200 rpm por 1 minuto, según indicaciones del kit. La muestra se colocó en hielo por 1 minuto. Se añadieron los siguientes componentes del kit para iniciar la reacción de síntesis de ADNc (tabla 4)

Tabla 4. Segunda etapa del protocolo del kit *MAXIMA 1STR CDNA SYNTH KIT (Thermo Scientific™)*

Reactivo	Cantidad
5X <i>Master Mix</i>	4 µL
<i>Mix</i> de la Enzima RT	2 µL
Agua libre de Nucleasas	4 µL
Volumen total	10 µL

Se procedió a incubar la mezcla durante 10 minutos a 25°C, luego por 15 minutos a 50°C y se terminó la reacción calentando a 85°C por 5 minutos. El producto obtenido fue almacenado a -20°C para poder ser utilizado al día siguiente.

Ensayo de RT-PCR

El protocolo de trabajo se desarrolló según las indicaciones de Lin et al.,2015.⁽¹⁴⁶⁾ en el termociclador AGS4800 (Daan Gene). En la Tabla 5 se muestran los oligonucleótidos utilizados para el ensayo. Estas secuencias fueron verificadas en la base de datos del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) antes de ser utilizadas en esta investigación.

Tabla 5. Secuencias de oligonucleótidos de los marcadores inflamatorios

Gen	Tamaño (Pb)	Ta (°C)	Secuencia	Referencia
IL-6	284	58	F: 5'-GAA CTC CTT CTC CAC AAG CG -3' R: 5'-GAA TCC AGA TTG GAA GCA TCC-3'	Otsuki T, <i>et al.</i> ,2000 ⁽¹⁴⁷⁾
IL-10	202	57	F: 5'-AAC CTG CCT AAC ATG CTT CG-3' R: 5'-GGT CTT GGT TCT CAG CTT GG-3'	Otsuki T, <i>et al.</i> ,2000 ⁽¹⁴⁷⁾
INF- γ	104	60	F: 5'-GGC ATT TTG AAG AAT TGG AAA-3' R: 5'-TTT GGA TGC TCT GGT CAT CTT-3'	Wheeler A, <i>et al.</i> , 2016 ⁽¹⁴⁸⁾
IL-1 β	391	59	F: 5'-AAA CAG ATG AAG TGC TCC TTC CAG-3' R: 5'-TGG AGA ACA CCA CTT GTT CCA-3'	Lenz A, <i>et al.</i> ,2004 ⁽¹⁴⁹⁾
β -actina	106	60	F: 5'-GCA TGG GTC AGA AGG ATT CCT-3' R: 5'-TCG TCC CAG TTG GTG ACG AT-3'	Lin <i>etal.</i> ,2015 ⁽¹⁴⁶⁾

*Pb: Pares de Bases Ta: Temperatura de Hibridación Cebadores F: *Foward* R: *Reverse*

Para seleccionar los oligonucleótidos, se tuvo en consideración su validación, la cual fue previamente realizada por un proyecto paralelo con determinaciones similares, pero utilizando otros pacientes.

Se descongelaron de manera previa los ADNc almacenados para ser utilizados como muestra según el protocolo del Kit *The Maxima™ SYBR® Green qPCR Master Mix (2X) (Thermo Scientific™)*, se agitaron y centrifugaron los componentes del kit (Tabla 6) antes de iniciar con la prueba.

Tabla 6. Componentes para el protocolo de amplificación del kit The Maxima™ SYBR® Green qPCR Master Mix (2X)

Componentes	Volumen (μ L)
Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (2X)	12,5 μ L
Forward Primer (10 μ M)	0.25 μ L
Reverse Primer (10 μ M)	0.25 μ L
ADNc	2 μ L
Agua libre de nucleasas	10 μ L
Total	25 μ L

Los componentes del *mix* se mezclaron, se centrifugaron y se dispensaron en tubos de PCR para luego ser colocados en el termociclador. El termociclador utilizado fue el AGS4800. Las condiciones de ciclaje se describen en la tabla 7.

Tabla 7. Condiciones del ciclaje

Pasos	Temperatura (°C)	Tiempo	Numero de ciclos
Pre-Tratamiento	50	2 min	1
Desnaturalización Inicial	95	10 min	1
Desnaturalización	95	15s	45
Alineamiento	57-60	30s	
Extensión	72	30s	

Se consideró un ciclo final de *melting* de 60 a 95 °C

La adquisición de datos fue programada durante el paso de alineamiento se utilizó el software del equipo fue AGS4800v 1.1. El experimento se consideró válido, si las muestras presentaban una curva de disociación única sin presencia de productos inespecíficos y una curva de amplificación clara. Respecto al control positivo y ausencia de contaminantes en el control negativo.

Se registraron los valores del ciclo umbral (Ct) para cada una de los marcadores de inflamación evaluados. Se utilizó al gen β -actina como control interno para la normalización de los datos de expresión génica, el cual fue previamente validado en el laboratorio (como parte de un segundo proyecto relacionado a esta misma temática).

Expresión génica

Para la cuantificación relativa de la expresión génica se tomó el modelo Delta Ct desarrollado por PE *Applied Biosystems* (Perkin Elmer, Foster City, CA). Se utilizó la fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$. (Livak *et al*, 2001)

Donde:

$$\Delta Ct = Ct_{\text{target (Interleucina)}} - Ct_{\text{gen normalizador (actina)}}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct - \text{Promedio de } \Delta Ct \text{ del grupo control (No diabéticos)}$$

$$2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{-(\Delta\Delta Ct)}$$

Se consideró eliminar los pacientes atípicos y los pacientes sin ningún Ct detectado. Para la expresión génica de la IL-6 se utilizaron un total de 12 pacientes (6

pacientes diabéticos y 6 pacientes control), se eliminaron los pacientes LM026, LM003, LM015, LM007, LM006 y LM023.

Para la expresión génica de la IL-10 se realizaron 2 análisis con 6 pacientes cada estudio (3 pacientes diabéticos y 3 pacientes control), se eliminaron los pacientes LM019, LM016, LM021, LM006, LM010 y LM007.

5. Procesamiento y análisis de los datos

Se calcularon las frecuencias para las variables cualitativas, y las variables numéricas se expresaron con la media y su desviación estándar o con la mediana y su rango intercuartil. Ambas variables describen las características sociodemográficas y etiopatogénicas de la población estudiada.

Se realizó un análisis comparativo de las variables sociodemográficas, etiopatogénicas, de las subpoblaciones linfocitarias y de monocitos entre la población de pacientes con ERC con y sin DM2. Para comparar las variables categóricas se usó la prueba de Chi cuadrado o la prueba exacta de *Fisher*, cuando los valores esperados fueron menores a cinco en un 20 % o más del total de celdas. Para realizar las comparaciones de las variables numéricas se utilizó la prueba T de *Student*, cuando cumplieron una distribución normal o la prueba *U Mann-Whitney*, cuando presentaron una distribución no normal.

Luego se procedió a analizar las variaciones de las subpoblaciones de linfocitos y monocitos, por categorías de tiempo de hemodiálisis, mediante la prueba de ANOVA, si la variable seguía una distribución normal o la prueba de *Kruskal Wallis*, cuando seguía una distribución no normal.

También se analizó, mediante el coeficiente de correlación de *Spearman*, la correlación entre las subpoblaciones de células mononucleares, y con parámetros hematológicos como los recuentos de neutrófilos, eosinófilos y plaquetas obtenidos del hemograma. Se usó el *software GraphPad Prism 5.0* para el conteo de las subpoblaciones de monocitos y linfocitos, y el programa de *STATA v.12* para el análisis integral de los datos del estudio. En todos los casos se consideraron diferencias estadísticamente significativas para $p < 0,05$.

6. Aspectos éticos

El presente estudio fue sometido y evaluado por el Comité de Ética de la Facultad de Medicina Humana de la Universidad de San Martín de Porres. Se entregaron previamente los consentimientos informados para poder contar las muestras sanguíneas de los pacientes. En tal sentido, los posibles riesgos para los voluntarios fueron mínimos y estaban relacionados principalmente a una brecha en la confidencialidad.

IV. RESULTADOS

1. Características sociodemográficas y clínicas de los pacientes

Las características sociodemográficas y clínicas de los pacientes con ERC incluidos en la investigación se detallan en la Tabla 8. Se incluyeron 18 pacientes renales (9 con DM y 9 sin DM). La edad media de la población de estudio fue $66,6 \pm 9,1$, con distribución equitativa de individuos de cada sexo.

Tabla 8. Características sociodemográficas y clínicas de los pacientes con ERC

Variables		N = 18
Género	Masculino	9 (50 %)
	Femenino	9 (50 %)
Edad (años)*		66,6 \pm 9,1*
Etiología de IRCT	Glomerulonefritis	3 (16,7 %)
	Nefropatía hipertensiva	3 (16,7 %)
	Nefropatía diabética	9 (50 %)
	Disfunción crónica Injerto renal	2 (11,1 %)
	Litiasis renal	1 (5,5 %)
Tiempo de hemodiálisis (años)*		7 \pm 7†
Tiempo de uremia (categoría años)	(1-3)	2 (11,1 %)
	(4-6)	5 (27,8 %)
	(\geq 7)	11 (61,1 %)
Índice de masa corporal (IMC)	Insuficiencia ponderada (< 18,5)	0 (0 %)
	Normal (18,5 -24,9)	10 (62,5 %)
	Sobrepeso (25 – 29,9)	6 (37,5 %)
	Obesidad (\geq 30)	0 (0 %)
	No se tallaron	2
Acceso vascular	CVC (catéteres venosos centrales)	8 (44,4 %)
	FAV (Fístula arteriovenosa)	10 (55,6 %)
Hipertensión		9 (50 %)
Hepatitis C		6 (33,3 %)
Otras comorbilidades		7 (38,9 %)

*media \pm desviación estándar

†mediana \pm rango Inter cuartil

Se estableció que la principal etiología fue ND, con un 50 % de incidencia. El 62,5 % de la población estudiada tenía un IMC dentro de los parámetros normales. La incidencia de HA fue predominante en la mitad de este grupo (N=18). El tiempo del tratamiento de sustitución con HD fue determinado por el número de años, con un tiempo de uremia máximo de 11 años que represento al 61,1 % de la población de estudio.

Las características de los pacientes con ERC con o sin DM2 se detallan en la Tabla 9. Los pacientes con DM2 tienen más edad respecto a los no diabéticos ($71,3 \pm 5,8$ vs $61,9 \pm 9,5$ $p=0,022$). Los pacientes no diabéticos tienen el doble de tiempo realizando el tratamiento de HD (5 ± 3 vs 11 ± 5 , $p=0,046$) y se evidenció que el tiempo de permanencia es mayor a 7 años (88,9 %, $p=0,029$). Se encontró que la HA fue más frecuente en los pacientes diabéticos en comparación con los no diabéticos.

Tabla 9. Características socioepidemiológicas y etiopatogénicas de los pacientes diabéticos y no diabéticos

Variables	Diabético (n=9)	No Diabético (n=9)	Valor p
Género			
Femenino	3 (33,3 %)	6 (66,7 %)	0,173*
Masculino	6 (66,7 %)	3 (33,3 %)	
Edad (años)	$71,3 \pm 5,8$	$61,9 \pm 9,5$	0,022†
Tiempo de Hemodiálisis (años)	5 ± 3	11 ± 5	0,046‡
Tiempo de uremia (años)			0,029*
(1-3)	1 (11,1 %)	1 (11,1 %)	
(4-6)	5 (55,6 %)	0 (0 %)	
(> 7)	3 (33,3 %)	8 (88,9 %)	
Índice de masa corporal (IMC)			0,549*
Insuficiencia ponderada (< 18.5)	0 (0 %)	0 (0 %)	
Normal (18.5 -24.9)	4 (57,1 %)	6 (66,7 %)	
Sobrepeso (25 - 29.9)	3 (42,9 %)	3 (33,3 %)	
Hipertensión (HA)	6 (66,7 %)	3 (33,3 %)	0,173*
Hepatitis C	2 (33,3 %)	4 (66,7 %)	0,310*

Mediana \pm RIQ (rango Inter cuartil), *Prueba de Chi2 o Fisher Exact, †Prueba de T de Student y ‡Prueba de

Mann-Whitney

2. Recuento de las subpoblaciones linfocitarias en pacientes con ERC, diabéticos y no diabéticos

El análisis de recuentos de las subpoblaciones de células mononucleares se realizó a partir del conteo celular total de los valores obtenidos en las muestras de sangre periférica (Tabla 10). Los pacientes con ERC diabéticos presentan una ligera tendencia al incremento con respecto al grupo control (Fig.3). Ambas poblaciones de pacientes con ERC, con o sin DM2, presentan una ligera disminución en los linfocitos totales.

Tabla 10. Recuento total de linfocitos y monocitos en pacientes con ERC

Variables	Diabético (n=9)	No Diabético (n=9)	Rango referencial	Valor p
Linfocitos Totales	1674,3 ± 792,9	1467 ± 436,4	1500 -7500 /mm ³	0,566†
Monocitos Totales	640,2 ± 233,1	543,1 ± 172,7	100-900/mm ³	0,330*

*Prueba de T de *Student* (media ± DE (Desviación Estándar), †Prueba de *Mann - Whitney* (mediana ± RIQ) Véase el rango referencial para las subpoblaciones de linfocitos ⁽¹⁵⁰⁾

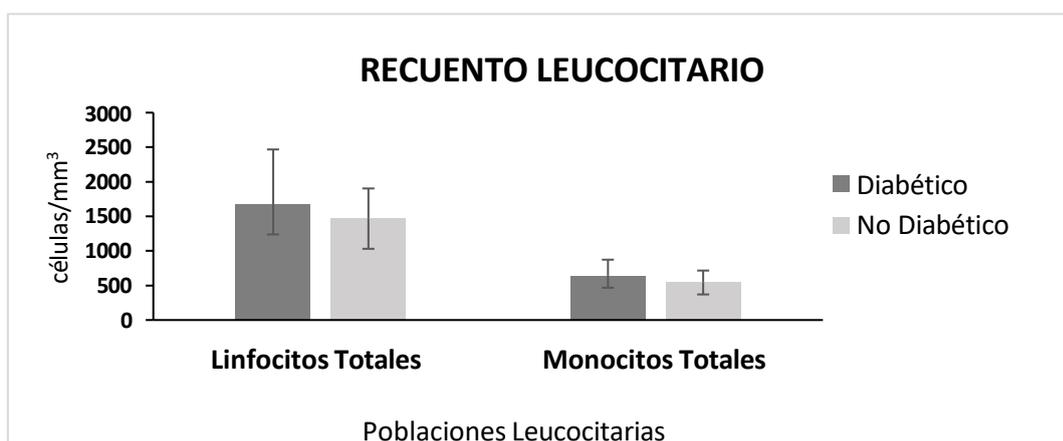


Figura 3. Recuento total de linfocitos y monocitos en pacientes con ERC con y sin DM2

Se utilizó la técnica de citometría de flujo para caracterizar las células nucleadas de la sangre periférica de los pacientes con ERC, con o sin DM2, basado en el tamaño y la complejidad de las poblaciones. El análisis fenotípico de las subpoblaciones linfocitarias explicado en la figura 4.

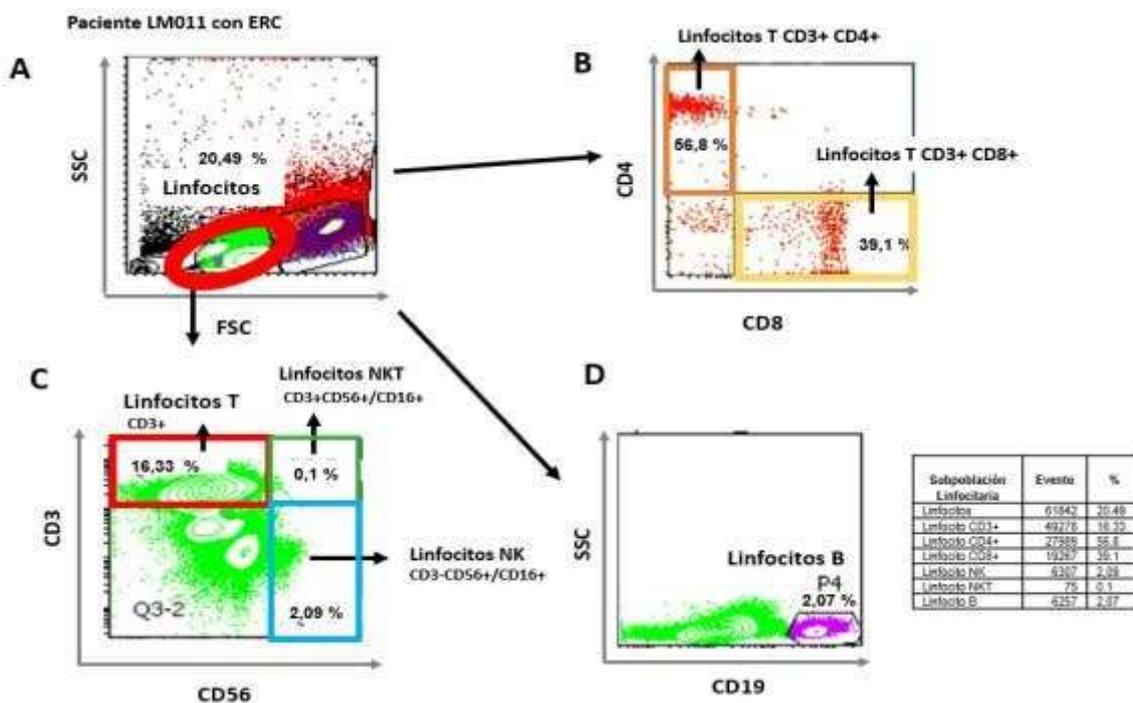


Figura 4. Análisis fenotípico de los linfocitos T, linfocitos CD4, CD8, B, NK y NKT de pacientes con ERC, mediante citometría de flujo, a partir de PBMC.

Nota. La estrategia de agrupamiento para el panel de linfocitos fue la siguiente **(A)** Sobre la población de *singlets*, se identificaron (FSC)/ (SSC), agrupadas en el *gate* P2 identificadas como Linfocitos; **(B)** Agrupación de las células que expresan el marcador poblacional CD3 considerando la población CD3⁺ como Linfocitos T. Gráfico de dotplot para discriminar las poblaciones T CD4⁺ y T CD8⁺; **(C)** Identificación de la población celular con ausencia de CD3⁺ (linfocitos NK;CD3-CD56⁺/CD16⁺) y presencia como Linfocitos T (CD3⁺) y linfocitos NKT (CD3⁺CD56⁺/CD16⁺) **(D)** identificación de la población de linfocitos B (CD3⁻/CD19⁺) en el P4. Las *gates* para definir cada subpoblación se establecieron a partir de un *layout* validado en INIAC, en base al marcaje con controles. Estas son imágenes referenciales de los *dot plot* utilizados en los experimentos realizados

La cantidad de células correspondiente a cada subpoblación de linfocitos (anexo 5) analizada no evidencia diferencias significativas entre los pacientes diabéticos y no diabéticos (tabla 11). Sin embargo, el conteo de células de linfocitos de los pacientes diabéticos fue notablemente superior en comparación con los pacientes no diabéticos (Fig.5). El porcentaje de células NKT es menor que 0.5 % ambos grupos de estudio.

Tabla 11. Recuento linfocitario entre la población de pacientes con ERC, diabéticos y no diabéticos

variables	Diabético (n=9)	No Diabético (n=9)	valor p
Linfocito T CD3⁺ (células/mm ³)	1223,2±413,7	1171,2 ± 471,8	0,807*
Linfocito T cooperador CD3 ⁺ CD4 ⁺	702,7 ± 298,4	610,0 ± 291,7	0,515*
Linfocito T citotóxico CD3 ⁺ CD8 ⁺	440,7 ± 220,5	432,0 ± 124,4	0,919*
Linfocito B C19 ⁺ (células/mm ³)	109,7 ± 162,4	87,8 ± 83,0	0,965†
Linfocito NK CD3 ⁻ CD16 ⁺ CD56 ⁺ (células/mm ³)	377,4 ± 168,5	285,6 ±116,7	0,453†
Linfocito NKT CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺ (células/mm ³)	0.29 ± 0.25	0.36 ± 1.43	0.628†

*Prueba de T de *Student* (media ± DE), †Prueba de *Mann-Whitney* (mediana± RIQ)

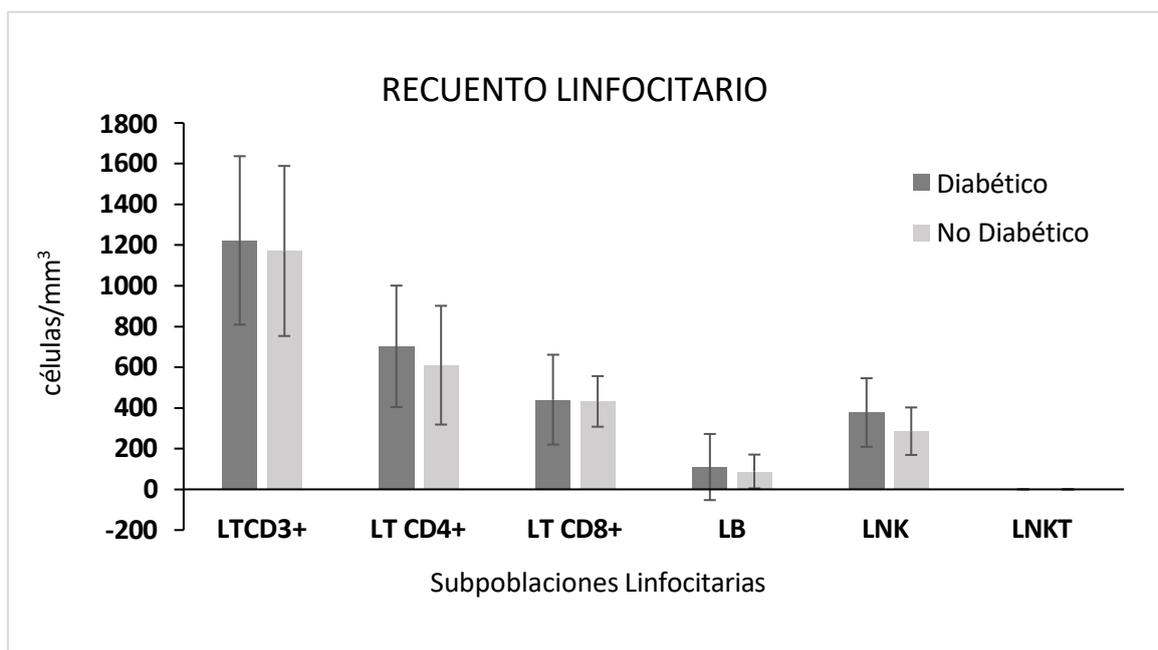


Figura 5. Recuento células linfocitarias en pacientes con ERC, con y sin de DM2. Se utilizaron las medias ± DE y medianas ± RIQ, respectivamente, para la elaboración del gráfico

3. Recuento de subpoblaciones de monocitos en pacientes con ERC, diabéticos y no diabéticos

El análisis de recuentos de las subpoblaciones de monocitos a partir de sangre periférica (anexo 6.), no tiene diferencias significativas entre los pacientes diabéticos y no diabéticos (tabla 12). Sin embargo, en ambos grupos se evidencia valores alterados en las subpoblaciones de monocitos, con porcentaje de monocitos clásicos disminuido y porcentaje elevado de monocitos no clásicos en donde se visualiza un ligero incremento en la población diabética con respecto a la población no diabética.

El análisis fenotípico total y diferenciado nos permite distinguir las tres subpoblaciones monocitarias (CD14⁺⁺CD16⁻, CD14⁺CD16⁺ y CD14⁺CD16⁺⁺) de los dos grupos de estudio (Fig.6)

Tabla 12. Recuento y porcentajes de subpoblaciones de monocitos entre la población de pacientes ERC, diabéticos y no diabéticos

Variables	Porcentaje referencial	Diabético (n=9)	No Diabético (n=9)	Valor p
Monocitos clásicos	cel. /mm ³	337,2 ± 220,3	322,2 ± 235,0	0,825†
CD14 ⁺⁺ CD16 ⁻	80-95 %	69,4 ± 13,1 %	69,4 ± 7,1 %	0,859†
Monocitos intermedios	cel. /mm ³	57,8 ± 49,7	30,24 ± 19,16	0,566†
CD14 ⁺ CD16 ⁺	2-11 %	7,2 ± 4,2 %	8,2 ± 3,8 %	0,965†
Monocitos no clásicos	cel. /mm ³	194,2 ± 83,3	115,7 ± 52,5	0,309†
CD14 ⁺ CD16 ⁺⁺	2-8 %	22,6 ± 17,7 %	21 ± 11,4 %	0,479†

†Prueba de *Mann-Whitney* (mediana ± RIQ) Véase los valores de porcentaje referencial en ^(26, 151)

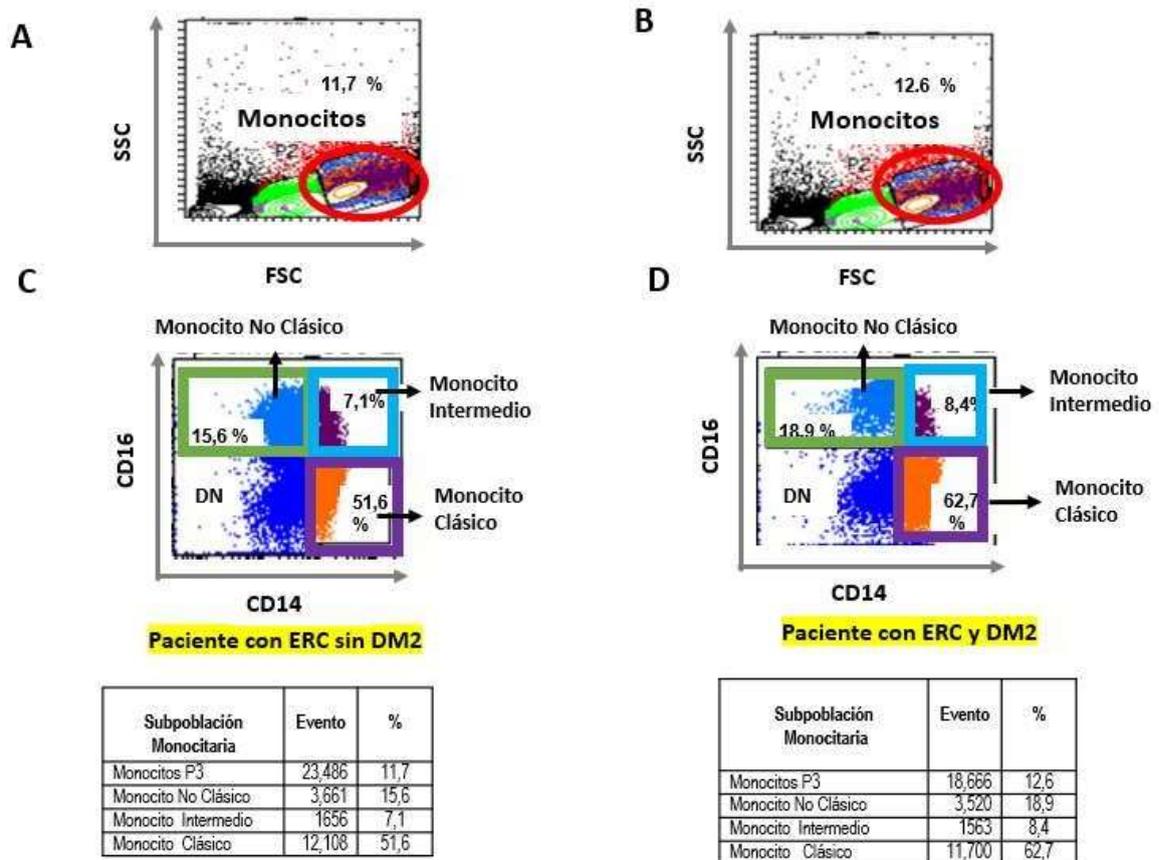


Figura 6. Análisis fenotípico de las subpoblaciones de monocitos, mediante citometría de flujo, a partir de PBMC de pacientes con ERC con y sin DM2

Nota. (A-B) Identificación de las poblaciones de monocitos (FSC/SSC) del paciente no diabético LM025 y del paciente diabético LM015; **(C-D)** Gráfico de las subpoblaciones de monocitos. Se identifican los monocitos clásicos (CD14⁺⁺ CD16⁻), los monocitos intermedios (CD14⁺CD16⁺) y los monocitos no clásicos (CD14⁺CD16⁺⁺). Las ventanas para definir cada subpoblación se establecieron a partir de un *layout* validado en el INIAC, en base al marcaje con controles. Estas son imágenes referenciales de los *dot plot* utilizados en los experimentos realizados

4. Relación de expresión de marcadores de inflamación en la población de pacientes con ERC, diabéticos y no diabéticos

Se utilizó la prueba de RT-PCR para amplificar regiones específicas del mRNA de las citocinas IL-6, IL-10, IL-1- β , e IFN- γ . (Anexo 7)

Para confirmar si los *primers* utilizados en la determinación de los marcadores de inflamación detectan la amplificación de la diana correspondiente, se evaluó la

temperatura de disociación (Tm) de los amplicones y como control endógeno la expresión de la proteína β-Actina (Fig. 7) (tabla 13).

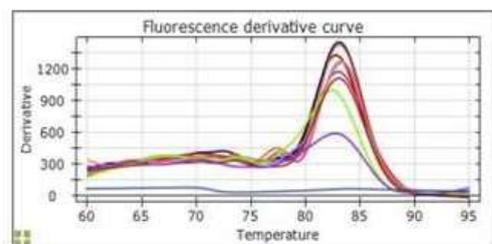
Las citocinas IL-6, IL-10 y el gen endógeno tienen un promedio de Tm que correspondencia con lo reportado por la literatura. El ARNm de la citocina IFN-γ no presento la curva de disociación (Tm) en la mayoría de las muestras; por lo cual, al ser un requisito indispensable para la aprobación del experimento, se decidió eliminar esta citocina del análisis de la expresión génica por no tener data concluyente, de la misma manera se procedió con la IL-1β puesto que; se encontraba por fuera del rango aceptado (anexo 8) (anexo 9)

Tabla 13. Detección del ARNm de las citocinas recolectadas de los PBMC de pacientes de ambos grupos de estudio

Citocina	Valores de Ct	Tm (C°)
IL-6	33,20 ± 2,09	83,1 ± 0,29
IL-10	33,15 ± 1,35	79,9 ± 0,27
β-Actina	19,66 ± 2, 28	82,5 ± 0,39

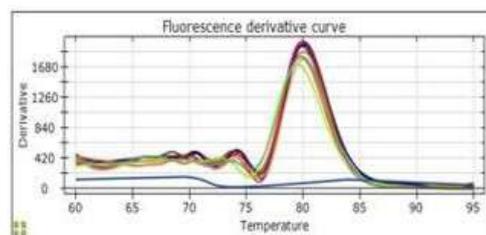
medias ± DE

A. IL-6



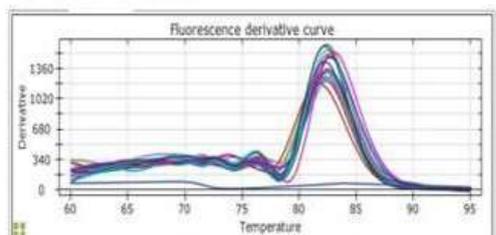
— A2:LM006 — A5:LM010 — A6:LM011 — A7:LM012 — A8:LM013 — A9:LM015
 — A10:LM016 — A11:LM017 — A12:LM018 — A13:LM019 — A14:LM020 — A15:LM021
 — A16:LM022 — A17:LM023 — A18:LM024 — A19:LM025 — A20:LM026 — A21:Ch — A22:Cp

B. IL-10



— A3:LM003 — A4:LM006 — A5:LM010 — A6:LM011 — A8:LM013 — A9:LM015
 — A10:LM016 — A11:LM017 — A12:LM018 — A13:LM019 — A14:LM020 — A15:LM021
 — A16:LM022 — A17:LM023 — A19:LM025 — A20:LM026 — A21:Ch — A22:Cp

D. Gen Control



— A1:LM003 — A2:LM006 — A3:LM007 — A4:LM008 — A5:LM010 — A6:LM011
 — A7:LM012 — A8:LM013 — A9:LM015 — A10:LM016 — A11:LM017 — A13:LM019
 — A14:LM020 — A15:LM021 — A16:LM022 — A17:LM023 — A19:LM025 — A20:LM026
 — A21:Ch — A22:Cp

Figura 7. Gráfico de las curvas de disociación de los productos amplificados con el juego de oligonucleótidos para la expresión de IL-6, IL-10 y la actina, determinada por RT-PCR para ambos grupos de estudio. El pico se forma en la Tm promedio de cada una de las citocinas estudiadas.

El análisis de la expresión génica de las citocinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias no tiene diferencias significativas entre los pacientes diabéticos y no diabéticos (tabla. 14). sin embargo, se evidencia una tendencia al alza en los pacientes diabéticos (anexo 10).

Tabla 14. Diferencias en la expresión génica de los marcadores inflamatorios

Interleucinas	Diabético (n=6)	No diabético (n=6)	Valor p
IL-6	1.40 ± 1.56	0.29 ± 0.71	0.200*
IL-10	1.12 ± 5.07	0.98 ± 0.67	0.872*

*Test de Mann-whitney

4. Análisis de correlación de las subpoblaciones leucocitarias y los parámetros hematológicos de pacientes ERC diabéticos

Subpoblaciones leucocitarias

El análisis bivariado de las subpoblaciones monocitarias, determinadas por citometría de flujo en pacientes con DM2, evidencia que los monocitos MNC (CD14⁺CD16⁺⁺) presentan una correlación directa y estadísticamente significativa con los linfocitos totales y los linfocitos B ($p=0,011$ y $p=0,017$). Por lo tanto, al incrementar los subtipos de esta clase de monocitos también aumentan estos grupos linfocitarios (Tabla 15).

Tabla 15. Correlación de los monocitos no clásicos y linfocitos

Variables correlacionadas		Rho de Spearman	Valor p
Monocito no clásico	Linfocitos totales	+0,585	0,011
Monocito no clásico	Linfocitos B	+0,556	0,017

*La correlación de las concentraciones de monocitos/linfocitos se realizó calculando el coeficiente de correlación de Spearman. (Rho de Spearman; $p<0,05$)

Por otra parte, se realizó un segundo análisis para constatar si existe correlación entre los datos obtenidos por citometría de flujo y los parámetros hematológicos laboratoriales de los pacientes con ERC con diabetes. De este análisis se

desprende, que existe una relación directa entre los MC (CD14⁺⁺CD16⁻) y los neutrófilos. Basándonos en los resultados anteriores obtenidos durante este estudio se evidencia que existe un decremento significativo de ambos paquetes celulares (Rho de Sperman: +0,605; $p \leq 0,007$) (Fig.9). La subpoblación de MNC (CD14⁺CD16⁺⁺) presenta una correlación positiva y estadísticamente significativa entre los eosinófilos (Rho de Sperman: +0,733; $p \leq 0,025$) y los linfocitos TCD4⁺ (Rho de Sperman: +0,767; $p \leq 0,016$), estas correlaciones directas se definen como un incremento de estas células sanguíneas en pacientes con ERC y DM2.

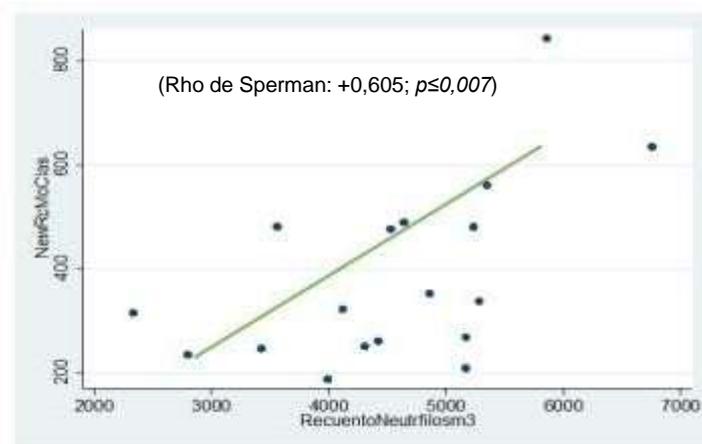


Figura 9. Correlación directa entre el recuento de MC y neutrófilos en los pacientes con ERC diabéticos

V. DISCUSIÓN

La DM2 es una enfermedad inflamatoria crónica causada por el desequilibrio prolongado del sistema inmunológico, síndrome metabólico o exceso de nutrientes relacionados a la obesidad (8, 11, 24). Se ha demostrado que las alteraciones de la inmunidad innata y adaptativa están estrechamente relacionadas con la aparición y progresión de las complicaciones asociadas a la DM2, como es la ND (7, 53).

En la ND, la inmunidad y la inflamación juegan un papel importante en la patogenia de esta enfermedad, desde su inicio hasta su progresión⁽⁴⁵⁾. Se ha reportado que en la ND se reclutan leucocitos hacia los riñones, es decir, una mayor infiltración de células inmunitarias, que incluye a los monocitos/macrófagos, células T, células B, además de citocinas inflamatorias, quimioquinas y factores que modulan la respuesta inmunitaria en los riñones (50, 65, 152).

Nuestro primer hallazgo, en relación con el grupo de pacientes con ECR y DM2, evidenció que el promedio de edad de este grupo poblacional fue superior al grupo de pacientes sin DM2 de manera significativa ($71,3 \pm 5,8$ vs $61,9 \pm 9,5$ $p=0,022$). Este resultado a pesar de desprender de una variable confusora guarda concordancia con otros estudios que afirman que las personas mayores de 65 años representan el 50 % de prevalencia de ND en los pacientes con DM2 (16, 153). Por lo tanto, se puede sugerir que a medida que aumenta la edad cronológica incrementa la probabilidad y la incidencia de ND (4, 17, 49, 72).

Los pacientes con DM2 presentaron un tiempo de uremia significativamente menor frente a los pacientes no diabéticos (5 ± 3 vs 11 ± 5 , $p=0,046$), este tiempo de terapia de sustitución renal se ve refrendando por otro estudio donde se establece que el tiempo regular del tratamiento de HD de pacientes con DM2 es de $4,1 \pm 4$ años en una cohorte que incluyó 31 hombres y 14 mujeres (58). El tiempo de permanencia en HD es significativo para este estudio siendo mayor a 7 años (88,9 %, $p=0,029$) en los pacientes no diabéticos. Es importante resaltar que estos pacientes permanecen en terapia de HD casi el doble de tiempo que los pacientes

diabéticos, lo que nos permite contextualizar por qué su sistema inmunitario y poblaciones leucocitarias están crónicamente activadas y como el proceso inflamatorio al que se ven constantemente sometidos tiene considerables repercusiones ⁽⁵²⁾.

Recuento de las subpoblaciones linfocitarias en pacientes con ERC, diabéticos y no diabéticos

En los pacientes diabéticos, diversos estudios han reportado que se producen variaciones en la expresión de leucocitos agranulocitos ^(49, 53, 69). En este estudio no se hallaron diferencias significativas en los recuentos totales de los linfocitos en los grupos de estudio. Nuestro resultado es similar al obtenido por Chávez *et al.* 2017, quienes no evidenciaron un cambio en conteo linfocitario total en sangre periférica de pacientes en HD con y sin DM2 con inflamación, pero si una disminución con respecto a estos grupos sin inflamación ⁽¹⁵⁴⁾.

El conteo de linfocitos totales de pacientes con enfermedad renal crónica con o sin DM2, los ubican en el límite inferior del valor referencial. Nuestros resultados al ser comparados con otros estudios demuestran que el recuento linfocitario obtenido está próximo a una linfopenia ^(16, 47). Cabe recalcar que la población diabética presenta un ligero incremento que posiblemente se ve relacionado con el IMC en la categoría normal de estos pacientes. Se ha demostrado que la pérdida de peso es una sólida estrategia para lograr la nefro protección de los pacientes diabéticos, lo que nos brinda un contexto más completo para poder entender la tendencia al aumento sin significancia estadística ^(9, 50).

Los pacientes con ERC están asociados con una serie de procesos inflamatorios que compromete a todos sus componentes. Adicionalmente, estos pacientes deben recibir el tratamiento de HD, que debería regular la respuesta inmune de los linfocitos y amortiguar los posibles daños ^(19, 24, 52, 63).

Según evidenciamos, la diferencia en la cantidad de las subpoblaciones linfocitarias no fue estadísticamente significativas entre los grupos de estudio y, en todos los casos, se hallaron dentro del rango referencial. Sin embargo, en los pacientes

diabéticos se evidencia una tendencia al incremento en el recuento de linfocitos T totales, T CD4⁺ y T CD8⁺. En estos pacientes se favorece el proceso inflamatorio, que podría relacionarse con el tiempo de uremia y la menor supervivencia del paciente diabético en HD, comparado con el paciente no diabético ^(34, 77, 155).

Estos hallazgos apoyan el papel fundamental de los linfocitos en DM2, como factores en la inflamación local y sistémica ⁽⁶³⁾. Las células T inducen la producción de citocinas pro-inflamatorias en diversos órganos y tejidos (hígado, páncreas, tejido muscular y adiposo) contribuyendo a la resistencia a la insulina ⁽¹⁹⁾. Las células T auxiliares aumentaron en los riñones en pacientes con DM2, mientras que han reportado que el incremento de las células T CD8⁺ modulan la sensibilidad a la insulina en los enterocitos ⁽²⁴⁾. Por lo tanto, se confirma que los linfocitos T CD4⁺ y T CD8⁺ contribuyen a la inflamación en DM2 ⁽¹⁵⁶⁾.

Se ha reportado en biopsias renales de pacientes con ND la infiltración renal de neutrófilos, macrófagos y linfocitos ⁽²⁴⁾. También se ha demostrado que los recuentos altos de neutrófilos y linfocitos en suero están asociados con la enfermedad renal diabética ⁽¹⁵⁷⁾. La activación de los linfocitos está asociada con la respuesta inmune, resistencia a la insulina, obesidad e inflamación crónica en la patogenia de DM2 ^(24, 26, 65). También se ha documentado que algunas subpoblaciones de linfocitos (linfocitos T CD4⁺, células NK, linfocitos T citotóxicos, células B2) y las inmunoglobulinas (IgG e IgE) desempeñan un papel proaterogénico. Otros mediadores de la inmunidad como las T reguladoras (Tregs), las células B1a, el activador de respuesta innata (IRA), las células Bregs y las células secretoras de IgM natural, muestran funciones protectoras en sujetos sanos ⁽¹⁵⁸⁾.

La respuesta inmune de los pacientes con enfermedad renal crónica se ve afectada principalmente por la toxicidad de la uremia, generando disminución de linfocitos B, alteraciones en la relación de células efectoras Th1/Th2 y disminución de las células NK ⁽¹⁵⁹⁾. En pacientes trasplantados se evidenció depleción de LB reguladores comparados con personas sanas. También se observó un recuento

menor de estas células en pacientes con HD infectados por COVID-19 en contraste con pacientes sin esta etiología ^(60, 160).

Nuestro estudio confirma que los pacientes con ERC presentan una disminución de LB; sin embargo, se puede observar un ligero incremento de estas células en los pacientes diabéticos. Es probable que este resultado se vincule con la producción de inmunoglobulinas específicas contra antígenos producidos en la DM2 ⁽¹⁵⁶⁾. En pacientes con obesidad, la incorporación y activación de los macrófagos M1 (macrófagos activados clásicamente), mastocitos, neutrófilos, células Th1, Th17, LB y TCD8 generan una inflamación excesiva por la producción aumentada de citocinas pro-inflamatorias que desencadenan en resistencia a la insulina contribuyendo al daño renal y la progresión de la enfermedad ^(26, 65).

El recuento de las células NK en pacientes diabéticos es $337,4 \pm 168,5$ células/mm³ del total de linfocitos en sangre periférica, dato superior al rango promedio ⁽⁷⁸⁾. A nivel internacional, se ha demostrado que los rangos pueden variar dependiendo de la raza y ubicación geográfica. En América Latina, específicamente en poblaciones mexicanas, el promedio de estas células es 17,4 % con rangos entre 8 a 33 % ^(79, 161).

El incremento mínimo de estas células puede asociarse a una compensación por la disminución de linfocitos B, similar a lo reportado por Chiang *et al.* 2017 en donde ratones deficientes de linfocitos B y T presentaron incremento de células NK ⁽²⁴⁾. La participación de esta población celular en procesos inflamatorios como la DM2 es descrita por otros autores como reducida y alterada, y se correlaciona con el control de la glucosa ^(51, 57). En consecuencia, es importante realizar estudios adicionales para evaluar los efectos citotóxicos de la liberación de proteasas (perforinas y granzimas) de estas células y tener una visión completa de su rol en la inflamación.

El conteo de las células NKT en las dos poblaciones de pacientes con ERC no evidenció diferencias significativas, mientras que se confirmó una fuerte disminución de esta población celular con respecto al estudio de Verastegui en el 2017 ⁽¹⁰⁶⁾ donde el recuento de pacientes sanos es de $233,03 \pm 117,90$ células/mm³.

Esto además se ve avalado por otro estudio, en donde estas células presentan decremento frente a pacientes sanos y es correlacionado con la disminución de linfocitos totales y el aumento de las células T CD4⁺ activadas en fases crónicas ⁽²⁴⁾.

Cabe agregar que las NKT segregan una gran variedad de interleucinas y mediadores inflamatorios, existen estudios donde se comprueban la relación entre la funcionalidad de estas células y la secreción de INF- γ ⁽¹⁰⁶⁾, así como los niveles de hemoglobina glicosilada ⁽¹⁶²⁾. A la fecha las células NKT tienen un papel controversial en la regulación de la inflamación, resistencia en la insulina y protección contra el trastorno metabólico en la obesidad por lo cual siguen siendo un punto de partida para futuras investigaciones ^(24, 26).

Recuento de subpoblaciones de monocitos en los pacientes con ERC, diabéticos y no diabéticos

En el contexto de la DM2, los monocitos no han sido revisados de manera exhaustiva como otros grupos celulares. No obstante, estudios recientes han demostrado que existen alteraciones en la quimiotaxis y la fagocitosis, refiriendo que la hiperglucemia estimula la activación de estos agranulocitos y moléculas de adhesión ^(7, 47, 69). En relación con las subpoblaciones de monocitos, se han realizado análisis de secuenciación de biopsias renales de pacientes con ND y se evidenció un aumento significativo de monocitos, fibroblastos y miofibroblastos en riñones con ND avanzada ^(49, 163). Por lo tanto, hay posibles mecanismos moleculares en la progresión de la ND que influyen en los cambios estructurales y funcionales de estos pacientes ^(66, 163).

De forma consistente, en la literatura se describe que, en personas sanas, la mayor subpoblación monocitaria circulante son los MC que comprenden entre el 80-95%; mientras los MI entre el 2-8 % y los MNC entre el 2-11 % ^(26, 151). Las funciones de los monocitos pueden variar de manera radical en pacientes con ERC iniciando procesos inflamatorios crónicos que muestran una exacerbada expansión de los subtipos de monocitos CD16⁺ ^(7, 34, 77).

En nuestro trabajo, se evidencia un incremento de los MNC y la disminución de los MC en toda la población con ERC, incluyendo la ND. Los MI se encuentran en porcentajes dentro del rango referencial de otros estudios ^(151, 164, 165). A pesar de que ambas poblaciones estudiadas presentan porcentajes similares, la frecuencia de subpoblaciones por conteo celular continúa demostrando el grado de inflamación a los que están sometidos los pacientes diabéticos frente a los pacientes no diabéticos ^(58, 77).

Nuestros resultados se ven avalados con diferentes artículos que confirman que el incremento de los MNC se debe a su activa participación en la cascada de inflamación, estrés oxidativo, daño endotelial y con el envejecimiento de los pacientes con ERC ^(7, 56, 58, 66, 77). Otros estudios recalcan que el porcentaje disminuido de MC frente al aumento porcentual de MI y de MNC en pacientes con ERC en HD comparados con pacientes sanos está asociado al medio urémico y al tratamiento que se ven sometidos ^(34, 77, 166).

En estudios previos realizados a pacientes con ERC con enfermedades cardiovasculares, se determinó que los MC e MI fueron más elevados en estos pacientes, pero que solo los MI se asociaron de manera significativa con la tasa de filtración glomerular estimada actual ^(7, 64). Nicolas *et al*, 2018 de igual manera observaron que los biomarcadores mayoritarios fueron los MC respecto a las otras subpoblaciones ($\approx 81\%$ versus 8% y 11% respectivamente) ⁽⁶³⁾. Por lo tanto, nuestros hallazgos sugieren que el fenotipo de los monocitos circulantes se altera por las patologías y complicaciones a las que se ven sometidos los pacientes renales con HD y como la DM2 tiene un mecanismo diferente de desregularización de estas subpoblaciones monocitarias frente a otras enfermedades ⁽⁵⁹⁾.

Nuestro estudio no evidenció ningún cambio importante en los MI, contrario a lo obtenido por otros autores, donde los monocitos proinflamatorios (CD14⁺CD16⁺) presentaron un incremento de número en comparación con el grupo de voluntarios sanos ^(58, 99). Esta diferencia puede deberse a la progresión de la maduración de los MC hacia los MNC ⁽³¹⁾ o al correcto tratamiento de HD del centro nefrológico que

reduce de manera efectiva los niveles de uremia, lo que puede contribuir a mantener los niveles de MI o proinflamatorios ⁽³⁴⁾.

La adecuada regulación de los niveles de monocitos proinflamatorios significaría que los pacientes con ERC en HD tendrán una mayor posibilidad de supervivencia, pues la reducción de estos monocitos durante la HD se ha asociado con el aumento del período libre de eventos cardiovasculares y la reducción de la mortalidad en pacientes con ERC, sin embargo, todavía se requieren estudios adicionales en pacientes con DM2 y HD que puedan contribuir a dilucidar estos vacíos ^(7, 31, 59, 165).

Relación de expresión de marcadores inflamatorios en la población de pacientes con ERC, diabéticos y no diabéticos

Los niveles de expresión de las citocinas se obtuvieron mediante la extracción y cuantificación del ARNm de las muestras, utilizando la técnica RT-PCR en tiempo real cuantitativa; puesto que las cantidades de estas moléculas en pacientes con ERC pueden ser tan bajas que las técnicas disponibles como ELISA no son lo suficientemente sensibles para detectarlas ⁽¹⁶⁷⁾.

La expresión del gen β -Actina, sirvió para estimar la viabilidad y normalización de las muestras en el proceso de cuantificación relativa ^(146, 168). El análisis de la Tm de los amplicones resultantes para nuestro gen endógeno mostró curvas de disociación de un pico único teniendo un promedio de Tm (82,5 \pm 0,39) °C, comprobando de ese modo la especificidad de los fragmentos detectados en la PCR y presentando curvas de amplificación diferenciadas para todas las muestras del estudio con Ct promedio de 19,66 \pm 2,28, valores que corresponden con lo reportado por otros estudios con respecto a este gen normalizador ⁽¹⁴⁶⁾.

En este estudio no se encontraron cambios significativos en los niveles de transcripción de IL-6 y IL-10 en el ARNm de las PBMC de los pacientes. Nuestros datos sugieren una posible mayor expresión de ARNm de estas citocinas en pacientes con ERC y DM2. A pesar de no encontrar diferencias significativas en las poblaciones de estudio, los resultados de los pacientes diabéticos concuerdan con los resultados de los conteos celulares obtenidos durante esta investigación.

Nuestros resultados se ven avalados con otros estudios que no encontraron variaciones significativas ^(169, 170) y que recomiendan optimizar el proceso realizando de manera previa un cultivo de células PBMC (aisladas de pacientes con ERC) y estimularlo con fitohemaglutinina A con el objetivo de provocar un incremento en la expresión y producción de citocinas (IL-17, IL-6, IL-1 β y TNF- α) ⁽¹⁷¹⁾. Con respecto a la producción del ARNm de la IL-6 diversos autores concuerdan que se debe analizar en paralelo la transcripción del dominio interactivo 5A rico en AT (ARID5A/Arid5a) y la nucleasa reguladora RNasa-1 (regnasa1) puesto que son los responsables de la desestabilización y degradación de la expresión génica de esta citocina ⁽¹⁷²⁾.

En los pacientes con DM2 se ha comprobado que las alteraciones intrínsecas de los monocitos y las células mononucleares desempeñan un rol fisiopatológico importante en la ERC a secretar menor cantidad de IL-1 e IL-6 en respuesta a la fagocitosis, asociado al incremento de la glicosilación ⁽¹⁰⁹⁾ y a la inhibición de la producción de las IL-10, TNF- α e IFN- γ por las células T. Estos factores van deteriorando la inmunidad celular de estos pacientes ^(7, 49, 55, 69, 94).

Varios estudios han demostrado que los pacientes de hemodiálisis y trasplante renal tienen niveles séricos elevados de IL-6 ^(65, 163). Esta citocina pleiotrópica se involucra en la inflamación y en la regulación de diversas funciones orgánicas. ⁽¹⁰⁹⁾ Sin embargo, el aumento de sus concentraciones en pacientes con diálisis peritoneal podría deberse a una menor eliminación o inducción por factores como toxinas urémicas, estrés oxidativo u otras variables relacionadas directamente con los equipos, procesos utilizados en la terapia de sustitución o con parámetros de desnutrición de pacientes urémicos ^(58, 166).

Estudios *in vitro* de los niveles de citocinas de pacientes diabéticos en diálisis señalan que los monocitos activados CD14⁺CD16⁺ (MI) son los responsables de liberar una mayor cantidad de citocinas concretamente IL-6, IL-1 β , TNF- α , e IFN- γ ^(7, 19, 34), sin embargo, se recalca que la capacidad de respuesta de estas células ante estímulos inflamatorios como el LPS es totalmente reducida ⁽⁵⁸⁾.

En el presente trabajo no se observó incremento o alteración en los MI lo cual explicaría porque no tenemos significancia estadística a pesar de tener un ligero incremento en la citocina IL-6. Además, se detectó una baja cantidad de células B y NKT, así como la intervención de la hiperglucemia en proceso inflamatorio ⁽⁵¹⁾. Se ha informado que la hiperglucemia altera las acciones antiinflamatorias normales de IL-10 con el fin de perpetuar un estado de inflamación crónica, lo cual genera una compensación deficiente frente a la elevación de mediadores proinflamatorios, principalmente TNF- α e IL-6 ^(51, 75).

De manera experimental, la depleción de las células TCD8⁺ genera un decremento de la infiltración en tejidos adiposos de macrófagos M1, que conlleva a una disminución de los marcadores TNF- α , IL-6 y MCP-1 mejorando la sensibilidad de la insulina y la tolerancia a la glucosa ⁽²⁶⁾. Las células B pueden activar a las Th1 y a las T CD8 para la secreción de citocinas pro-inflamatorias o desencadenar respuestas reguladoras ⁽⁶⁰⁾. Por lo tanto, en los pacientes con DM2 la inflamación excesiva aumenta la producción de citocinas pro-inflamatorias las cuales actúan en diversos grupos celulares, lo que interfiere con los procesos metabólicos de la insulina generando resistencia a esta hormona ⁽⁵⁸⁾.

En la actualidad, estudios moleculares como análisis de genotipos y frecuencias alélicas de polimorfismos, han evaluado la asociación de las citocinas TNF- α , IL-6 y IL-10 con la obesidad e inflamación en DM2. Se ha evidenciado que los niveles de IL-6, IL-10 y el polimorfismo del gen -819 T/C se relacionan con la inflamación subclínica en la DM2. Se han encontrado niveles significativamente altos de IL-6 en pacientes diabéticos con IMC > 30 kg/m² involucrado con resistencia a la insulina y disfunción de las células β ^(67, 173). De manera adicional, el tejido adiposo visceral inflamado de pacientes obesos puede polarizar hacia un fenotipo Th1 por producción de leptina, que actúan de manera directa o indirecta en las células T promoviendo la secreción excesiva de IL-2 e IFN- γ ⁽²⁶⁾.

En nuestro estudio no se analizaron los polimorfismos de las citocinas y ninguno de nuestros pacientes se encontraba con obesidad. En consecuencia, el control

adecuado del peso corporal puede incidir de manera positiva en la prevención del estado inflamatorio en pacientes diabéticos con ERC en HD ⁽⁶⁵⁾.

Correlación de las subpoblaciones leucocitarias y los parámetros hematológicos de pacientes ERC diabéticos

En este estudio se observó que el grupo de pacientes diabéticos presenta una serie de correlaciones que fortalecen los resultados obtenidos durante toda la investigación. Diversos autores señalan que el incremento de monocitos pro-inflamatorios (no clásicos e intermedios) tiene una correlación robusta que les brinda un valor predictivo en la inflamación y en el desarrollo de distintas enfermedades^(7, 166). Nuestro estudio revela que los MNC presentan una correlación directa y estadísticamente significativa con linfocitos totales y linfocitos B, sugiriendo que el incremento de este biomarcador monocitario estimula a otros grupos celulares de agranulocitos para propiciar el deterioro o progresión de la enfermedad renal terminal ^(7, 30, 56).

Los datos de las correlaciones obtenidas con los parámetros hematológicos nos permiten contemplar de manera disgregada que subpoblación leucocitaria está interfiriendo directamente con los pacientes con DM2. Los MC presentan una correlación positiva y significativa con los neutrófilos, visualizándose con una inminente disminución de ambos grupos celulares (Rho de Spearman: +0,605; $p \leq 0,007$). Esto puede sustentarse con lo reportado por diferentes artículos, donde la función de reclutamiento de monocitos de los neutrófilos se ve disminuida frente a la hiperglucemia crónica ^(53, 71, 174).

La población monocitaria con mayor incremento fueron los MNC y presentaron correlación significativa con T CD4⁺ (Rho de Spearman: +0,767; $p \leq 0,016$) y con los eosinófilos. (Rho de Spearman: +0,733; $p \leq 0,025$). La DM2 provoca un flujo dinámico de células del sistema inmune e interacciones complejas como activación y migración de monocitos que induce el despertar de granulocitos y subpoblaciones linfocitarias mediante sus quimiocinas que genera la quimiotaxis de estas células ⁽¹⁵⁶⁾.

Los resultados obtenidos durante todo el estudio nos permiten tener un panorama general de las poblaciones leucocitarias, la expresión genética de citocinas y las correlaciones de las mismas en pacientes renales diabéticos en comparación con pacientes sin esta patología. El incremento de estas células sanguíneas a pesar de no ser significativo evidencia un patrón inflamatorio exacerbado al que se ven sometidos estos pacientes.

V. CONCLUSIONES

1. Aunque el número total de células linfocitarias es mayor en pacientes con ERC diabéticos sometidos a HD con respecto a los no diabéticos, las diferencias entre los linfocitos T, auxiliares o citotóxicos, B, NK y NKT, entre pacientes, con o sin DM2, no es estadísticamente significativa.
2. No hay diferencias significativas en la frecuencia de las diferentes subpoblaciones de monocitos, entre los pacientes con ERC diabéticos y no diabéticos, sin embargo, el porcentaje de monocitos clásicos disminuye y los monocitos no clásicos aumentan en la población diabética con respecto a la población no diabética.
3. La expresión génica de las interleucinas pro-inflamatorias, IL-6, y antiinflamatoria, IL-10, no es significativamente diferente entre los dos grupos de pacientes, aunque hay una tendencia al alza en los pacientes diabéticos.
4. En pacientes diabéticos, la subpoblación de monocitos no clásicos correlaciona directa y significativamente con los linfocitos totales, linfocitos B, eosinófilos y linfocitos TCD4⁺, mientras que la subpoblación de monocitos clásicos correlaciona directamente con los neutrófilos.

VI. RECOMENDACIONES

1. Extender el alcance de esta investigación a la evaluación funcional de las diferentes subpoblaciones monocitarias y linfocitarias.
2. Realizar estudios clínicos que permitan discernir la relación entre los biomarcadores inmunológicos y el curso de la ERC, en pacientes con o sin DM2.
3. Evaluar, en modelos de investigación preclínica, la influencia de agentes anti-inflamatorios sobre el curso de los daños renales en el contexto de la DM2.
4. Realizar estimulación *in vitro* de las células de PBMC de los pacientes con ERC, con o sin DM2, para evaluar si existe un incremento de la expresión génica de las citocinas estudiadas.

FUENTES DE INFORMACIÓN

1. Pérez-Díaz I. Diabetes mellitus. *Gac Med Mex.* 2016;152(1):50-5.
2. Cajavilca JL. Acceso vascular en pacientes con enfermedad renal crónica y complicaciones en el servicio de nefrología hospital Cayetano Heredia Piura. 2019-2020 [Disertación]. Piura: Universidad Cesar Vallejo; 2021.
3. Aldrete-Velasco J, Chiquete E, Perusquía-Frías E, Dávila-Valero J, Rodríguez-García J, Reyes-Zavala C, et al. Mortalidad por enfermedad renal crónica y su relación con la diabetes en México. *Med Int Méx.* 2018;34:536-50.
4. Víctor L, Rodríguez D. Enfermedad Renal Crónica. Lorenzo V, López Gómez JM (Eds) *Nefrología al día.* 2021;ISSN 2659-06.
5. Fernández Alonso M, Nocito De Santiago A, Moreno Moreno A, Carramiñana Barrera F, López Simarro F, Miravet Jiménez S, et al. *Guía Clínica. Diabetes mellitus.* España. 2015. 55 p.
6. MINSA. Guía de práctica clínica para el diagnóstico, tratamiento y control de la diabetes mellitus tipo 2 en el primer nivel de atención. 1ra. ed. Lima,Peru. 2016. p. 10-6.
7. Naicker SD, Cormican S, Griffin TP, Maretto S, Martin WP, Ferguson JP, et al. Chronic Kidney Disease Severity Is Associated With Selective Expansion of a Distinctive Intermediate Monocyte Subpopulation. *Front Immunol.* 2018;9.
8. Organization PAH. *Panorama of Diabetes in the Americas.* Washington D.C.: PAHO; 2022.
9. Arroyo C. Nefropatía diabética en España: prevalencia, factores de riesgo y prevención [Disertación]. Cantabria: Universidad de Cantabria 2021.
10. OPS. La carga de enfermedades renales en la Región de las Américas, 2000-2019: Organización Panamericana de la Salud; 2021 [Portal de Datos ENLACE:[Available from: <https://www.paho.org/es/enlace/carga-enfermedes-renales>.
11. OPS. La carga de la diabetes mellitus en la Region of the Americas, 2000-2019: Organización Panamericana de la Salud; 2021 [Portal de Datos ENLACE:[Available from: <https://www.paho.org/es/enlace/carga-diabetes-mellitus>.
12. Bartolo IP, Limaylla EN. Calidad de vida en pacientes con Insuficiencia Renal Crónica en Hemodiálisis en la Clínica H&S Occupational S.A.C. Huancayo 2021 [Disertación]. Huancayo: Universidad Roosevelt 2021.
13. FID. *IDF Diabetes Atlas.* 10th ed: Brussels, Belgium; 2021.
14. MINSA. CDC Perú: El 96,5% de la población diagnosticada con diabetes tiene diabetes tipo 2 Lima, Perú2021 [Available from: <https://www.dge.gob.pe/portalnuevo/informativo/prensa/cdc-peru-el-965-de-la-poblacion-diagnosticada-con-diabetes-tiene-diabetes-tipo-2/>.
15. INEI. Perú: Enfermedades no transmisibles y transmisibles, 2021. ENDES ed. Lima, Perú2022.
16. Villena Pacheco A. Factores asociados a nefropatía diabética en pacientes portadores de diabetes mellitus tipo 2 que se atienden en la unidad funcional de telesalud y telemedicina del hospital Cayetano Heredia 2021 [Tesis Doctoral]. Lima: Universidad Peruana Cayetano Heredia; 2022.
17. Villena Pacheco A. Factores de riesgo de nefropatía diabética. *Acta Med Peru.* 2021;38(4).
18. Zheng Z, Zheng F. Immune Cells and Inflammation in Diabetic Nephropathy. *J Diabetes Res.* 2016;2016:10.

19. Castillo M. Caracterización del efecto inmunomodulador de nitazoxanida en el proceso inflamatorio de pacientes con DM2 [Tesis Doctoral]. Morelos Universidad autonoma del estado de Morelos; 2022.
20. Francis ER, Kuo C-C, Bernabe-Ortiz A, Nessel L, Gilman RH, Checkley W, et al. Burden of chronic kidney disease in resource-limited settings from Peru: a population-based study. *BMC Nephrol*. 2015;16(1):114.
21. Moss-Kolseth IB, Reine TM, Parker K, Sudworth A, Witczak BJ, Jenssen TG, et al. Increased levels of inflammatory mediators and proinflammatory monocytes in patients with type I diabetes mellitus and nephropathy. *J Diabetes Complications*. 2017;31(1):245-52.
22. Sanhueza L, Concha L, Durruty P, De los Ríos MG. Alteraciones hematológicas en la Diabetes Mellitus. *Rev chil endocrinol diabetes*. 2014;7(4):137-42.
23. Lepe JL, Morales P, García GA. Caracterización y correlación clínica de la linfopenia en la enfermedad renal en estadio terminal. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc*. 2016;54(4):446-53.
24. Xia C, Rao X, Zhong J. Role of T Lymphocytes in Type 2 Diabetes and Diabetes-Associated Inflammation. *J Diabetes Res*. 2017;2017:6494795.
25. Lepe-Zúñiga J, Morales-Molina P, García-Nandayapa G. Caracterización y correlación clínica de la linfopenia en la enfermedad renal en estadio terminal. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc*. 2016;54(4):446-53.
26. Guzmán-Flores JM, López-Briones S. Células de la inmunidad innata y adaptativa en la diabetes mellitus tipo 2 y obesidad. *Gac Med Mex*. 2012;148:381-9.
27. Szkandera J, Armin G, Liegl-Atzwanger B, Absenger G, Stotz M, Friesenbichler J, et al. The lymphocyte/monocyte ratio predicts poor clinical outcome and improves the predictive accuracy in patients with soft tissue sarcomas. *Int J Cancer*. 2014;135:362–70.
28. Pecht T, Haim Y, Bashan N, Shapiro H, Harman-Boehm I, Kirshtein B, et al. Circulating Blood Monocyte Subclasses and Lipid-Laden Adipose Tissue Macrophages in Human Obesity. *PLoS ONE*. 2016;11(7):1-14.
29. Ziegler-Heitbrock L. Blood monocytes and their subsets: established features and open questions. *Front Immunol*. 2015;6(423):1-5.
30. Luo Q, Xiao P, Li X, Deng Z, Qing C, Su R, et al. Overexpression of CD64 on CD14++CD16- and CD14++CD16+ monocytes of rheumatoid arthritis patients correlates with disease activity. *Exp Ther Med*. 2018;16:2703-11.
31. Stansfield BK, Ingram DA. Clinical significance of monocyte heterogeneity. *CLIN TRANSL MED*. 2015;4(5):1-10.
32. Rodríguez Y. Caracterización de subpoblaciones de monocitos proinflamatorios y proangiogénicos en la sangre periférica de pacientes con hepatitis crónica C: implicación en el establecimiento y progresión de la enfermedad [Tesis Doctoral]. Madrid: Universidad Autónoma de Madrid; 2012.
33. Elchinova E, Teubel I, Roura S, Fernández MA, Lupón J, Gálvez-Montón C, et al. Circulating monocyte subsets and heart failure prognosis. *PLoS ONE*. 2018;13(9):1-13.
34. Martínez P. Nuevas aproximaciones al estudio de la Biocompatibilidad en Hemodiálisis: Modulación fenotípica de las células mononucleares circulantes [Tesis Doctoral]. Alcalá de Henares: Universidad de Alcalá 2015.
35. Fontana K, Aparecida A, Sandrim V, Teixeira N, Freire F, Braga K. IL-6, TNF- α , and IL-10 levels/ polymorphisms and their association with type 2 diabetes

- mellitus and obesity in Brazilian individuals. *Arch Endocrinol Metab.* 2017;61(5):438-46.
36. Yen-Ling C, Kai-Hsiang S, Feng-Jung Y, Tzu-Ying C, Ping-Min C, Fang-Yun L, et al. A comprehensive characterization of aggravated aging-related changes in T lymphocytes and monocytes in end-stage renal disease: the iESRD study. *Immun Ageing.* 2018;15:27.
37. Ling Chiu Y, ChuanTsai W, Wei Hung R, Yu Chen I, Kai-Hsiang S, Yu Pan S, et al. Emergence of T cell immunosenescence in diabetic chronic kidney disease. *Immun Ageing.* 2020;17:31.
38. Sato Y, Boor P, Fukuma S, Klinkhammer BM, Haga H, Ogawa O, et al. Developmental stages of tertiary lymphoid tissue reflect local injury and inflammation in mouse and human kidneys. *Kidney Int.* 2020;98:448-63.
39. Kooman JP, Dekker MJ, Usvyat LA, Kotanko P, Van-der-Sande FM, Schalkwijk CG, et al. Inflammation and premature aging in advanced chronic kidney disease. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2017;313(4):F938-F50.
40. Naicker SD, Cormican S, Griffin TP, Maretto S, Martin WP, Ferguson JP, et al. Chronic Kidney Disease Severity Is Associated With Selective Expansion of a Distinctive Intermediate Monocyte Subpopulation. *Front Immunol.* 2018;9:2845.
41. Kanter JE, Cheng-Chieh H, Bornfeldt KE. Monocytes and Macrophages as Protagonists in Vascular complications of Diabetes. *Front Cardiovasc Med.* 2020;7(10).
42. Bowe B, Xie Y, Xian H, Li T, Al-Aly Z. Association between Monocyte Count and Risk of Incident CKD and Progression to ESRD. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2017;12(4):603-13.
43. Narasimhan PB, Marcovecchio P, Hamers AAJ, Hedrick CC. Nonclassical Monocytes in Health and Disease. *Annu Rev Immunol.* 2019;37:439-56.
44. Liakopoulos V, Jeron A, Shah A, Bruder D, Mertens PR, Gorny X. Hemodialysis-related changes in phenotypical features of monocytes. *Sci Rep.* 2018;8(1):13964.
45. Pichler R, Afkarian M, Dieter BP, Tuttle KR. Immunity and inflammation in diabetic kidney disease: translating mechanisms to biomarkers and treatment targets. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2017;312(4):F716-F31.
46. Rubinstein G, Mara R. Influencia del condicionamiento genético y del estrés en la desregulación de la respuesta inmune en el estado diabético. Participación del estrés oxidativo [Tesis Doctoral]. Buenos Aires: Universidad de Buenos Aires; 2011.
47. Alvarez Angeles M, Torres Palomino D, Guadalupe Gomez H, Bocanegra D, Arrunategui Correa V. Características hematológicas y bioquímicas en pacientes con y sin diabetes mellitus tipo 2 (DM2) sometidos a hemodiálisis durante un año de seguimiento. *Horiz Med.* 2018;18(3):6-11.
48. Lisowska KA, Dębska-Ślizień A, Jasiulewicz A, Heleniak Z, Bryl E, Witkowski JM. Hemodialysis Affects Phenotype and Proliferation of CD4-Positive T Lymphocytes. *J Clin Immunol.* 2012;32(1):189–200.
49. Campoverde Maldonado MJ, Rosero Caiza JA, Rosero Caiza GE, Benavides Arteaga ME. Características hematológicas en pacientes con diabetes mellitus tipo 2. *Recimundo.* 2021;5(1):20-31.
50. Gutiérrez L, Ortiz D, Parra A, Bueno J, Murillo LÁ, Celis L. Revisión de nefropatía diabética: 2020 actualización. *Rev Colomb Endocrinol Diabet Metab.* 2021;8:2805-5853.

51. Méndez Cordero P, Jordán Pesántez G, Moreno Choez K, Cortez Barragán J, Vázquez Verdugo M, Ochoa Reinoso R, et al. Desregulación inmunológica en el paciente diabético con COVID-19. *Diabetes Internacional y endocrinología*. 2020;XII.
52. Carrero JJ, González ME. Inflamación en Diálisis. *Nefrología al día*. 2020;ISSN:2659-06.
53. López J. Alteraciones Hematológicas en Pacientes con Diabetes Mellitus Tipo II [Disertación]. Managua: Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, Managua 2020.
54. Arango Prado MdC, Villegas Valverde CA, Soto Pardeiro P, Torres Lopez G, Morejón Morales A, Faxas Garcia ME. Caracterización de los inmunofenotipos linfocitarios de sangre periférica en pacientes con cáncer. *Rev cuba hematol inmunol hemoter*. 2020;36(2).
55. Ramos D. Caracterización de las infecciones y determinación de su agente etiológico en pacientes con diabetes mellitus tipo 2 ingresados en el servicio de medicina interna del hospital de especialidades Eugenio Espejo en el periodo enero a diciembre del 2017. [Trabajo académico de especialización]. Quito: Pontificia universidad Católica del Ecuador; 2020.
56. Guerrero FE. Papel de las poblaciones monocitarias en el infarto agudo de miocardio de localización anterior sometido a angioplastia primaria y su valor pronóstico para predecir el remodelado ventricular adverso [Tesis Doctoral]. Sevilla: Universidad de Sevilla; 2020.
57. Kim JH, Park K, Lee SB, Kang S, Park JS, Ahn CW, et al. Relationship between natural killer cell activity and glucose control in patients with type 2 diabetes and prediabetes. *J Diabetes Investig*. 2019;10(5):1223-8.
58. Sabine B, Ewert L, Florian S, Charlotte R, Jonathan L, Xenia G, et al. Altered monocytic phenotypes are linked with systemic inflammation and may be linked to mortality in dialysis patients. *Sci Rep*. 2019;9(19103).
59. Marcos M, Orbe J, Roncal C, Fernández A, Colina I, Rodil R, et al. Análisis de subpoblaciones monocitarias en relación con los factores de riesgo cardiovascular. *Clin Investig Arterioscler*. 2019;31:152-9.
60. Calahorra L. Estudio del estado de maduración del linfocito B y factores solubles asociados a rechazo e infección en pacientes sometidos a trasplante de órgano sólido [Tesis Doctoral]. Madrid: Universidad Complutense de Madrid; 2019.
61. Pérez-Bedoya JP, Gallego-Lopera N, Velarde-Hoyos CA, Franco-Hincapié L, Valencia-Duarte AV. Efecto de la hiperglucemia en el síndrome coronario agudo y sus implicaciones en el tratamiento antiagregante plaquetario. *Iatreia*. 2019;32(2).
62. Henríquez NA. Correlación de la hemodiálisis vs diálisis peritoneal en los pacientes con nefropatía diabética [Tesis Doctoral]. Guayaquil: Universidad de Guayaquil 2018.
63. Nicolas JC. Evaluación clínica de biomarcadores expresados en células mononucleares de sangre periférica: aplicación diagnóstica en pacientes con riesgo de desarrollo de aterosclerosis [Tesis Doctoral]. Córdoba: Universidad Católica de Córdoba 2018.
64. Mazur P, Mielimonka A, Natowska J, Wypasek E, Gaweda B, Sobczyk D, et al. Lymphocyte and monocyte subpopulations in severe aortic stenosis at the time of surgical intervention. *Cardiovasc Pathol*. 2018;35:1-7.
65. Hickey FB, Martin F. Role of the Immune System in Diabetic Kidney Disease. *Curr Diab Rep*. 2018;18(4):20.

66. Ong S-M, Hadadi E, Dang M, Yeap W-H, Tan C, Ng T, et al. The pro-inflammatory phenotype of the human non-classical monocyte subset is attributed to senescence. *Cell Death Dis.* 2018;9(3):266-88.
67. Akbari M, Hassan-Zadeh V. IL-6 signalling pathways and the development of type 2 diabetes. *Inflammofarmacol.* 2018;26(3):685–98
68. Ren X, Mou W, Su C, Chen X, Zhang H, Cao B, et al. Increase in Peripheral Blood Intermediate Monocytes is Associated with the Development of Recent-Onset Type 1 Diabetes Mellitus in Children. *Int J Biol Sci.* 2017;13(2):209-18.
69. Machado L, Montano M, Dimakis D. Diabetes mellitus y su impacto en la etiopatogenia de la sepsis. *Acta Médica grupo Ángeles.* 2017;15(julio-septiembre):207-15.
70. Tsukamoto M, Seta N, Yoshimoto K, Suzuki K, Yamaoka K, Takeuchi T. CD14^{bright}CD16⁺ intermediate monocytes are induced by interleukin-10 and positively correlate with disease activity in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2017;19(28):1-10.
71. Soehnlein O, Steffens S, Hidalgo A, Weber C. Neutrophils as protagonists and targets in chronic inflammation. *Nat Rev Immunol.* 2017;17(4):248-61.
72. Gheith O, Farouk N, Nampoory N, Halim MA, Al-Otaibi T. Diabetic kidney disease: world wide difference of prevalence and risk factors. *J Nephropharmacol.* 2016;5(1):49-56.
73. Yeap WH, Wong KL, Shimasaki N, Teo ECY, Quek JKS, Yong HX, et al. Corrigendum:CD16 is indispensable for antibodydependent cellular cytotoxicity by human monocytes. *Sci Rep.* 2017;6(34310):1-16.
74. Wildgruber M, Aschenbrenner T, Wendorff H, Czubba M, Glinzer A, Haller B, et al. The “Intermediate” CD14⁺⁺CD16⁺ monocyte subset increases in severe peripheral artery disease in humans. *Sci Rep.* 2016;6(39483):1-8.
75. Barry JC, Shakibakho S, Durrer C, Simtchouk S, Jawanda KK, Cheung ST, et al. Hyporesponsiveness to the anti-inflammatory action of interleukin-10 in type 2 diabetes. *Sci Rep.* 2016;17(21244):1-9.
76. Rovira S. Estudio de los mecanismos moleculares de estrés oxidativo, disfunción mitocondrial, estrés de retículo endoplasmático y autofagia en leucocitos de pacientes con diabetes tipo 2 [Tesis Doctoral]. Valencia: Universidad de Valencia; 2015.
77. Martín N. Inflamación crónica en pacientes con hemodialisis [Disertación]. Zaragoza: Universidad de Zaragoza; 2015.
78. Tabora NA, Hernández JC, Montoya CJ, Rugeles MT. Las células natural killer y su papel en la respuesta inmunitaria durante la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana tipo-1. *Inmunología.* 2014;33(1):11-20.
79. Rojas-Pandales F, Bolaños N, Mercado M, González JM, Cuéllar A, Cifuentes-Rojas C. Valores de referencia de células asesinas naturales (NK y NKT) en donantes de sangre de Bogotá. *Acta Med Colomb* 2007;32.
80. Reyes Sanamé FA, Pérez Álvarez ML, Figueredo EA, Ramírez Estupiñán M, Jiménez Rizo Y. Tratamiento actual de la diabetes mellitus tipo 2. *Correo Científico Médico de Holguín.* 2016;20(1):98-121.
81. Herrera-Añazco P, Pacheco-Mendoza J, Taype-Rondan A. La enfermedad renal crónica en el Perú. Una revisión narrativa de los artículos científicos publicados. *Acta Med Peru.* 2016;33(2):130-7.
82. Rojas M, Troya P. Grados de Retinopatía Diabética en Pacientes Diabéticos Tipo2 con enfermedad Renal Crónica Estadia V, sometidos a Hemodiálisis en el

Hospital Eugenio Espejo en el Periodo de Junio 2013 - Mayo 2014 [Trabajo académico de especialización]. Ecuador: Universidad Central Del Ecuador; 2015.

83. Flores JC, Alvo M, Borja H, Morales J, Vega J, Zúñiga C, et al. Enfermedad renal crónica: Clasificación, identificación, manejo y complicaciones. Rev méd Chile 2009;137:137-77.

84. Guía de Práctica Clínica Prevención, Diagnóstico y Tratamiento de la Enfermedad Renal Crónica Temprana Mexico: Secretaria de Salud; 2009.

85. Guerrero M, Montiel J, Mosquera M, Jara L, Moris G. Enfermedad renal crónica y su relación con la ingesta de cúrcuma, catequinas, proantocianidinas y omega-3. Nutr Hosp. 2015;32(4):1825-9.

86. Barceló A, García G, Correa-Rotter R, Barragán D, Vitarella G, López JAV, et al. Prevención, diagnóstico y tratamiento temprano de la Nefropatía Diabética. Mexico: Consensos ALAD; 2009. p. 1-8.

87. Pinto L. Frecuencia de Alteraciones cognitivas en pacientes diabeticos con enfermedad renal cronica ciudad hospitalaria "Dr. Enrique Tejera". Agosto 2014-Marzo 2015 [Trabajo académico de especialización]. Valencia: Universidad de Carabobo; 2015.

88. Bouça B, Bogalho AP, Agapito A. Nefropatia Diabética. Rev port endocrinol diabetes metabol. 2021;16(2):80-9.

89. Tziomalos K, Athyros VG. Diabetic Nephropathy: New Risk Factors and Improvements in Diagnosis. Rev Diabet Stud. 2015;12(1-2):110-8.

90. Serna Higueta LM, Pineda Trujillo N, García Cepero AM, Aguirre Caicedo M, Alfaro Velásquez JM, Balthazar González V, et al. Nefropatía diabética. MEDICINA UPB 2009;28(1):42-53.

91. Morejón N. Complicaciones agudas en pacientes sometidos a hemodiálisis en el hospital Carlos Andrade Marín [Tesis de Maestría]. Ambato: Universidad Regional Autónoma de los Andes "UNIANDES"; 2015.

92. Alvarado MG. Complicaciones de pacientes en la Unidad de Hemodialisis [Tesis de Maestría]. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala; 2014.

93. cancer Sace. Médula ósea, sangre y tejido linfático normal 2018 [updated 30 de Noviembre 2022. American Cancer Society:[Available from: <https://www.cancer.org/es/cancer/leucemia-linfocitica-cronica/acerca/tejido-normal.html>].

94. Qiao YC, Shen J, He L, Hong XZ, Tian F, Pan YH, et al. Changes of Regulatory T Cells and of Proinflammatory and Immunosuppressive Cytokines in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus: A Systematic Review and Meta-Analysis. J Diabetes Res. 2016;2016:3694957.

95. Woollard KJ, Geissmann F. Monocytes in atherosclerosis: subsets and functions. Nat Rev Cardiol. 2010;7(2):77-86.

96. Mizuno K, Toma T, Tsukiji H, Okamoto H, Yamazaki H, Ohta K, et al. Selective expansion of CD 16 high CCR 2 – subpopulation of circulating monocytes with preferential production of haem oxygenase (HO)- 1 in response to acute inflammation. Clin Exp Immunol. 2005;142(3):461–70.

97. Urra X, Oleaga L, Villamor N, Amaro S, Gómez-Choco M, Planas AM, et al. Monocyte subtypes predict clinical course and prognosis in human stroke. J Cereb Blood Flow Metab. 2009;29(5):994–1002.

98. Kuwana M, Okazaki Y, Kodama H, Satoh T, Kawakami T, Ikeda Y. Endothelial Differentiation Potential of Human Monocyte-Derived Multipotential Cells. Stem Cells 2006;24(12):2733–43.

99. Yang M, Gan H, Shen Q, Tang W, Xiaogang D, Chen D. Proinflammatory CD14+CD16+ Monocytes are Associated with Microinflammation in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus and Diabetic Nephropathy Uremia. *Inflammation*. 2012;35(1):388-96.
100. Parra-Ortega I, Salceda-Rangel KS, Najera-Martinez N, Lopez-Martinez B, Ortiz-Navarrete V, Olvera-Gomez I. Determinacion y cuantificacion de subpoblaciones de linfocitos T y celulas natural killer en sangre periferica de individuos sanos por citometria de flujo. *Bol Med Hosp Infant Mex*. 2019;76(2):66-78.
101. Guadalupe C, Vega Anaya A, Hernández L, Hebert L, Hernández M. Mecanismos de lesión inmunitaria en la diabetes mellitus tipo 1. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc*. 2009;47(5):515-22.
102. Hernández-Ruiz J, Becker I. Linfocitos T citotóxicos CD8+ en la leishmaniasis cutánea. *Salud Publica Mex*. 2006;48(5):430-9.
103. Jagannathan M, McDonnell M, Liang Y, Hasturk H, Hetzel J, Rubin D, et al. Toll-like receptors regulate B cell cytokine production in patients with diabetes. *Diabetologia*. 2010;53(7):1461–71.
104. Gargantilla P, Arroyo N, Pintor E. Neoplasia de células T/natural killer. *Galicia-clinica*. 2016;77(1):46.
105. Montalvillo E, Garrote JA, Bernardo D, Arranz E. Células linfoides innatas y células T natural killer en el sistema inmune del tracto gastrointestinal. *Rev esp enferm dig*. 2014;106(5):334-45.
106. Verastegui RP. Comparación de los valores de células NKT en sangre periférica de pacientes con y sin infección por VIH-1 [Disertación]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos 2017.
107. Rodríguez E. Activación del sistema del complemento en la insuficiencia renal aguda y su relación con otras vías inflamatorias [Tesis Doctoral]. Barcelona: Universidad Autónoma de Barcelona; 2015.
108. De la Cruz Conde JC. Citocinas proinflamatorias: participación en la modulación de la actividad del melanoma experimental B16 [Disertación]. Leioa Universidad del Pais Vasco 2014.
109. Hernández-Flórez D, Valor L. IL-6: su papel en la patogenia de la artritis reumatoide. *Consecuencias clínicas. Reumatol Clin Supl* 2018;14:7-10.
110. Alfadul H, Sabico S, Al-Daghri N. The role of interleukin-1beta in type 2 diabetes mellitus: A systematic review and meta-analysis. *Front endocrinol*. 2022;13(1664-2392).
111. Zhao G, Dharmadhikari G, Maedler K, Meyer-Hermann M. Possible role of interleukin-1beta in type 2 diabetes onset and implications for anti-inflammatory therapy strategies. *PLoS Comput Biol*. 2014;10(8):e1003798.
112. Hammad R, Elmadbouly AA, Ahmad IH, Mohammed SA, Farouk N, Futooh Z, et al. T-Natural Killers and Interferon Gamma/Interleukin 4 in Augmentation of Infection in Foot Ulcer in Type 2 Diabetes. *Diabetes Metab Syndr Obes*. 2021;14:1897-908.
113. Brummelman J, Haftmann C, Núñez G, Alvisi G, Mazza C. Development, application and computational analysis of high-dimensional fluorescent antibody panels for single-cell flow cytometry. *Nature Protocols*. 2019;14:1946–69.
114. McKinnon M. Flow Cytometry: An Overview. *Curr Protoc Immunol*. 2018;(21)120:5.1.1-5.1.11.

115. Hoffman A. Flow Cytometry: Instrumentation, Applications, Future Trends and Limitations. Standardization and Quality Assurance in Fluorescence Measurements II. Resch-Genger U, editor 2008.
116. Jaroszeski J, Radcliff G. Fundamentals of flow cytometry. *Molecular Biotechnology*. 1999;11:37–53.
117. Holmberg-Thyden S GK, Ortved A, Fassi D, Reker S, . . . ; : ISSN 0003-2697. A user's guide to multicolor flow cytometry panels for comprehensive immune profiling. *Analytical Biochemistry*. 2021;Aug 15(114210).
118. Barrera L, Drago M, Pérez J, Sainz T, Zamora A. Citometría de flujo: vínculo entre la investigación básica y la aplicación clínica. *Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias*. 2004;17:42-55.
119. Gonzáles Saravia SN. Estandarización del citómetro de flujo Novocyte Advanteon para el análisis automatizado de linfocitos en un laboratorio privado de Lima, 2021 [Disertación]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2021.
120. Deepak S, Kottapalli K, Rakwal R, Oros G, Rangappa K, Iwahashi H, et al. Real-Time PCR: Revolutionizing Detection and Expression Analysis of Genes. *Curr Genomics*. 2007;Jun;8:234-51.
121. Navarro E, Serrano-Heras G, Castaño M, Solera J. Real-time PCR detection chemistry. *Clin Chim Acta*. 2015;Jan 15:231-50.
122. Briones C. Reacción en cadena de la polimerasa. Springer link 2014.
123. Tajadini M, Panjehpour M, Javanmard S. Comparison of SYBR Green and TaqMan methods in quantitative real-time polymerase chain reaction analysis of four adenosine receptor subtypes. *Adv Biomed Res*. 2014;28:85.
124. McChlery S, Clarke S. The Use of Hydrolysis and Hairpin Probes in Real-Time PCR. *Molecular Biotechnology*. 2003;25:267–74.
125. Butler J. *Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Methodology* 2012.
126. Wilhelm J, Pingoud A. Real-Time Polymerase Chain Reaction. *ChemBioChem*. 2003;4:1120–8.
127. Rodríguez-Lázaro D, Hernández M. Identification methods: Real-Time PCR. In: Press A, editor. *Encyclopedia of Food Microbiology* segunda ed 2014. p. 344-50.
128. Harshitha R, Arunraj D. Real-time quantitative PCR: A tool for absolute and relative quantification. *Biochem Mol Biol Educ*. 2021;49:800-12.
129. Heid A SJ, Livak J, Williams M. Real time quantitative PCR. *Genome Res*. 1996;6:986-94.
130. Adeola F. Normalization of Gene Expression by Quantitative RT-PCR in Human Cell Line: comparison of 12 Endogenous Reference Genes. *Ethiop J Health Sci*. 2018;28:741-8.
131. Pfaffl M. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT–PCR. *Nucleic Acids Research*. 2001;9:e45.
132. Livak K, Schmittgen T. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2– $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods*. 2001;25 402-8.
133. MINSA. Análisis de la situación de la enfermedad crónica en el Perú, 2015. 1era ed. Lima, Perú. 2016. p. 100.
134. Guerra LL. "Nueva generación de Inmunoensayos para la detección simultánea de autoanticuerpos: Aplicación al apoyo del diagnóstico en diabetes mellitus autoinmune" [Tesis Doctoral]. Argentina: Universidad de Buenos Aires; 2017.
135. Córdova Izquierdo A, Iglesias Reyes AE, Espinosa Cervantes R, Guerra Liera JE, Inzunza Castro JF, Juárez Mosqueda MdL, et al. Aplicación de la citometría de Flujo en veterinaria. *Rev complut cienc vet*. 2016; 10(2):60-73.

136. Consuelo M. Estudio de inmunofenotipo por citometría de flujo para el diagnóstico de inmunodeficiencias primarias. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter.* 2017;36(0864-0289):1-10.
137. Becerril Parra DE, Torres Guerrero E, Moreno Coutiño G, Aguilar Sarmiento AS, Arenas Guzmán R, Hernández Castro R. Polymerase Chain Reaction (PCR) and its Applications in Dermatology. *Dermatología CMQ.* 2015;13(3):214-9.
138. Roa-Higuera DC, Fiorentino S, Campos-Arenas AM, Rodríguez-Pardo VM, Infante-Acosta EA, Quijano-Gómez SM, et al. Análisis inmunofenotípico de muestras normales de médula ósea: aplicaciones en el control de calidad en los laboratorios de citometría. *Univ Sci.* 2010;15:206-23.
139. Laboratorio de Genomica Viral y Humana FdMU. Conteo celular y evaluación de viabilidad. 2013.
140. Garcia-Gomero D, Matos-Benavides E, Inocente-Malpartida R, Mendoza-Quispe D, Chalco-Huaman J, Lopez-Talledo M, et al. [Lymphocyte population count as a first approach to the diagnosis of primary immunodeficiencies]. *Rev Peru Med Exp Salud Publica.* 2019;36(3):454-8.
141. Becton DaCBB. FACSLyric™ System Instrucciones de uso. In: Healthcare G, editor. 2020. p. 225.
142. Marins dos santos a, Dos santos renzetti ar, Ferreira cunha c, Ribeiro de lima j, Ferraz nogueira r, Oliveira diaz da cruz s, et al. Citometria de fluxo: fundamentos e aplicações na pesquisa científica. In: Saúde Md, editor. Curso de Invierno Fundação Oswaldo Cruz Instituto Oswaldo Cruz 2018. p. 129.
143. Sihem T, Harrivel V, Dumezy F, Guy J, Roussel M, Mimoun A, et al. Multicenter validation of the Flow measurement of classical monocyte fraction for chronic myelomonocytic leukemia diagnosis. *Blood Cancer Journal.* 2018;8:1-10.
144. Ziegler-Heitbrock L, Ancuta P, Crowe S, Dalod M, Grau V, Hart DN, et al. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood *BLOOD.* 2010;116:e74-e9.
145. Scientific TF. Product Information Thermo Scientific Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR 2012. Available from: https://assets.fishersci.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0012718_50rxns_Maxima_FirstStrand_cDNA_Syn_RT_qPCR_UG.pdf.
146. Lin ZW, Wu LX, Xie Y, Ou X, Tian PK, Liu XP, et al. The expression levels of transcription factors T-bet, GATA-3, RORgammat and FOXP3 in peripheral blood lymphocyte (PBL) of patients with liver cancer and their significance. *Int J Med Sci.* 2015;12(1):7-16.
147. Otsuki T, Yamada O, Yata K, Sakaguchi H, Kurebayashi J, Yawata Y, et al. Expression and production of interleukin 10 in human myeloma cell lines. *Br J Haematol.* 2000;111(3):835-42.
148. Wheeler La, Trifonova RT, Vrbanac V, Barteneva NS, Liu X, Bollman B, et al. TREX1 Knockdown Induces an Interferon Response to HIV that Delays Viral Infection in Humanized Mice. *Cell Rep.* 2016;15(8):1715-27.
149. Lenz AG, Hinze-Heyn H, Schneider A, Behr J, Haussinger K, Heindi S, et al. Influence of inflammatory mechanisms on the redox balance in interstitial lung diseases. *Respir Med.* 2004;98(8):737-45.
150. J HA, E. CdJ. Hematología práctica: interpretación del hemograma y de las pruebas de coagulación. Curso de Actualización Pediatría [Internet]. 2018:[507-26

pp.]. Available from: https://www.aepap.org/sites/default/files/507-526_hematologia_practica.pdf.

151. Sampath P, Moideen K, Ranganathan UD, Bethunaickan R. Monocyte Subsets: Phenotypes and Function in Tuberculosis Infection. *Front Immunol.* 2018;9:1726.
152. El Hafez AA. Microinflammation as a Candidate for Diabetic Nephropathy. *Interdisciplinary Journal of Microinflammation.* 2014;1(101):1-9.
153. Candelaria Brito JC, Gutiérrez Gutiérrez C, Bayarre Vea HD, Acosta Cruz C, Montes de Oca DM, Labrador Mazón O. Caracterización de la enfermedad renal crónica en adultos mayores. *Revista Colombiana de Nefrología.* 2018;5(2).
154. Chávez Valencia V, Orizaga de la Cruz C, Mejía Rodríguez O, Gutiérrez Castellanos S, Lagunas Rangel Francisco A, Viveros Sandoval Martha E. Inflamación en hemodiálisis y su correlación con los índices neutrófilos/linfocitos y plaquetas/linfocitos. *Nefrología (Madrid).* 2017;37:554-6.
155. Franco de Diana D, Segovia J, Cabrera W, Castiglioni D, López N, Urdapilleta N, et al. Comet assay as a bioindicator of genomic instability in hemodialysis diabetic patients. *Anales de la Facultad de Ciencias Médicas (Asunción).* 2022;55(1):27-38.
156. Rodríguez López CP, González Torres MC, Aguilar Salinas CA, Nájera Medina O. Mecanismos inmunológicos involucrados en la obesidad. *Invest Clin.* 2017;58:175 - 96.
157. Winter L, Wong LA, Jerums G, Seah JM, Clarke M, Tan SM, et al. Use of Readily Accessible Inflammatory Markers to Predict Diabetic Kidney Disease. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2018;9:225.
158. Carracedo J, Bodega G, Alique Aguilar M, Ramírez R. El papel del envejecimiento en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares asociadas a patologías renales. *RIECS 2020;5(1):106-20.*
159. Vizcarra Vizcarra CA. Diálisis peritoneal de inicio urgente en pacientes con COVID-19 en una ciudad de gran altura. *Rev Cubana Med.* 2022;61(e2533).
160. Florit EA, Diekmann F. Is the immune hyporesponsiveness of uremic patients a protective factor for severe COVID-19 pneumonia? *Nefrologia* 2021;41(2):223-4.
161. Gargantilla Madera P, Arroyo Pardo N, Soladana Blanco P, Pintor Holguín E. Neoplasia de células T/natural killer. *Galicia Clin.* 2016;77(1):46.
162. Piedrahita Chinome HY, Moreno León L. Control metabólico en pacientes diabéticos y relación con procesos infecciosos durante julio 2020 y marzo de 2021 en Clínica del occidente de Bogotá [Trabajo académico de especialización]. Bogotá: Universidad del Rosario 2021.
163. Fan Y, Yi Z, D'Agati VD, Sun Z, Zhong F, Zhang W, et al. Comparison of Kidney Transcriptomic Profiles of Early and Advanced Diabetic Nephropathy Reveals Potential New Mechanisms for Disease Progression. *Diabetes.* 2019;68(12):2301-14.
164. Patel AA, Zhang Y, Fullerton JN, Boelen L, Rongvaux A, Maini AA, et al. The fate and lifespan of human monocyte subsets in steady state and systemic inflammation. *J Exp Med.* 2017;214(7):1913-23.
165. Jeng Y, Lim PS, Wu MY, Tseng TY, Chen CH, Chen HP, et al. Proportions of Proinflammatory Monocytes Are Important Predictors of Mortality Risk in Hemodialysis Patients. *Mediators Inflamm.* 2017;2017:1070959.
166. Borges Bonan N, Schepers E, Pecoits-Filho R, Dhondt A, Pletinck A, De Somer F, et al. Contribution of the uremic milieu to an increased pro-inflammatory monocytic phenotype in chronic kidney disease. *Sci Rep.* 2019;9(10236).

167. Pertosa G, Grandaliano G, Gesualdo L, Ranieri E, Monno R, Schena P. Interleukin-6, interleukin-8 and monocyte chemotactic peptide-1 gene expression and protein synthesis are independently modulated by hemodialysis membranes. *Kidney International*. 1998;54:570-9.
168. Triana-Gutiérrez RI, Gutiérrez-Espinosa MA, Mora-Aguilera G, Cano-Medrano R, Velázquez-Monreal JJ. Selección de genes de referencia en expresión génica de *Citrus sinensis* infectados con CLas o CTV mediante RT-qPCR. *Mexican Journal of Phytopathology*. 2021;39:354-70.
169. Dünner Moreno N. Alteración de la expresión de il-6 en respuesta al ejercicio en la insuficiencia renal crónica experimental [Tesis Doctoral]. Santiago de Chile: Universidad de Chile; 2011.
170. Mondelo Macía P. Implicación del desequilibrio redox en los cambios estructurales de la membrana peritoneal durante la diálisis peritoneal. [Tesis de Maestría]. Coruña: Universidad de la Coruña; 2017.
171. Donate-Correa J, Henríquez-Palop F, Martín-Núñez E, Hernández-Carballo C, Ferri C, Pérez-Delgado N, et al. Perfil antiinflamatorio del paricalcitol en el receptor de trasplante renal. *Nefrología*. 2017;37:622–9.
172. Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T. IL-6 in inflammation, immunity, and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2014;6:a016295.
173. Saxena M, Srivastava N, Banerjee M. Association of IL-6, TNF-alpha and IL-10 gene polymorphisms with type 2 diabetes mellitus. *Mol Biol Rep*. 2013;40(11):6271-9.
174. Alard J-E, Ortega-Gomez A, Wichapong K, Bongiovanni D, Horckmans M, Megens RTA, et al. Recruitment of classical monocytes can be inhibited by disturbing heteromers of neutrophil HNP1 and platelet CCL5. *Sci Transl Med*. 2015;7(317):196-209.

ANEXOS

1. Consentimiento Informado

HOJA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Título del estudio:

“EXPRESIÓN FENOTÍPICA Y GENOTÍPICA DE SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS Y MONOCITOS EN SANGRE PERIFÉRICA DE PACIENTES CON Y SIN DIABETES MELLITUS SOMETIDOS A HEMODIÁLISIS”
CENTRO NEFROLÓGICO PRIVADO 2019

Este documento consta de dos partes:

1. Hoja de información sobre este estudio
2. Consentimiento informado para su firma si acepta ser parte de este estudio de manera voluntaria.

HOJA DE INFORMACION

Estimado(a) Sr (a): _____

Soy estudiante de la maestría de Inmunología con mención en enfermedades infecciosas y autoinmunes de la Universidad San Martín de Porres. Como requisito para la conclusión del grado de maestría, debo realizar un Plan de tesis. Por ello, estoy realizando un proyecto de investigación titulado: “EXPRESIÓN FENOTÍPICA Y GENOTÍPICA DE SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS Y MONOCITOS EN SANGRE PERIFÉRICA DE PACIENTES CON Y SIN DIABETES *MELLITUS* SOMETIDOS A HEMODIÁLISIS”.

Justificación y objetivo de la investigación:

Este proyecto es importante porque permitirá diferenciar que tipo de células inmunes están aumentadas o disminuidas en pacientes diabéticos comparados con pacientes no diabéticos sometidos a hemodiálisis.

La proporción de linfocitos/monocitos (LMR) está definida en otras patologías o cánceres, pero no en diabetes o en pacientes diabéticos luego de someterse a una Hemodiálisis. Sabiendo el valor de la proporción de células inmunes y la clase de linfocito o monocito secuestrado en la sangre periférica de estos pacientes permitirá entender los procesos de inflamación que ocurre en esta enfermedad.

Este estudio tiene como objetivo principal caracterizar la expresión fenotípica y genotípica de linfocitos y monocitos en sangre periférica de pacientes con diabetes sometidos a hemodiálisis. Para lo cual, se requiere muestras de sangre para la obtención subsecuente de células mononucleares periféricas.

Las muestras se obtendrán en el Centro Nefrológico S.A (CENESA). Las células mononucleares (CM) serán obtenidas a partir 8 ml de sangre periférica, extraídas en el momento de la canulación utilizando 2 tubo conteniendo EDTA (Vacutainer, Becton-Dickinson, San José, CA, USA)

Datos preliminares nos demostraron que los pacientes diabéticos tienen mayor número monocitos y menor cantidad de linfocitos que los pacientes no diabéticos sometidos a hemodiálisis (Arrunátegui Correa V. et al, 2018). Este estudio permitirá obtener datos para caracterizar la expresión fenotípica de los tres subtipos de monocitos y los diferentes subtipos de linfocitos incluidos linfocitos T de memoria que pueden ayudar a definir el proceso de inflamación que se ve en las terapias de sustitución de Enfermedad Renal Crónica.

Por ello, **lo invitamos a participar en este estudio** y solicitamos que nos brinde su consentimiento para cooperar en este proyecto, en el que se le tomará una muestra de sangre, con el fin de aportar nuevos conocimientos para mejorar el tratamiento de esta enfermedad.

Este documento le brinda información sobre los posibles riesgos y beneficios que pueden suceder por su participación en este proyecto. Así Ud. Podrá decidir si desea participar o no en el mismo, de manera voluntaria.

Metodología empleada:

Este estudio incluirá a pacientes de CENESA que acepten voluntariamente participar en este estudio y que cumplan con los criterios de inclusión establecidos: Se formarán dos grupos de estudio, uno integrado por pacientes con nefropatía

diabética comprobada y otro grupo control (cualquier paciente sometido a hemodiálisis sin diabetes) de quienes se tomarán muestras sanguíneas.

Procedimientos que involucra su participación:

A los participantes voluntarios se les extraerá una sola muestra sanguínea. Esta muestra obtenida se procesará en el laboratorio para analizar sus células sanguíneas. La aceptación para proporcionar esta muestra de sangre depende completamente de su deseo, en caso usted sea mayor de edad.

Riesgos derivados de este estudio:

Este procedimiento no presenta ningún riesgo ni molestias, porque se recolectará la muestra del control sanguíneo (hematológico y bioquímico) mensual que se realiza a todos los pacientes que reciben atención en CENESA, ello como parte de su protocolo de trabajo. Por lo que, no habrá la necesidad de una punción adicional para los pacientes. En relación a la privacidad y confidencialidad de los datos obtenidos, el investigador principal cuenta con procedimientos estrictos de protección de la privacidad y confidencialidad de los pacientes, así como, de las muestras colectadas. Para evitar que terceras personas conozcan alguna información acerca de usted, no se incluirá ni su nombre ni cualquier otra información que lo identifique directamente con su muestra o su información médica.

Beneficios derivados de este estudio:

No existe beneficio directo para usted por participar en este estudio. Sin embargo, puede haber un beneficio a futuro para las personas que padecen de nefropatía diabética, ya que este estudio está enfocado en desarrollar mejores tratamientos según el proceso de inflamación de la enfermedad renal y entender mejor todo el mecanismo de acción involucrado. A usted no se le proporcionará ninguna titularidad o beneficio económico de este estudio.

Costos relacionados con el estudio

Usted no deberá hacer ningún pago por participar en el estudio. El investigador principal de este proyecto correrá con los gastos relacionados a los materiales que se requieran para la toma de muestra respectiva.

Protección de información, privacidad y confidencialidad

Para proteger su privacidad, guardaremos su información con códigos y no con nombres. No se divulgará ni su nombre ni ninguna otra información que lo identifique directamente fuera de este estudio. Se asignará un código único a su muestra sanguínea. El investigador del estudio conservará la clave que relaciona su información personal con este código de estudio.

El investigador principal conservará los datos con clave de acceso en su laptop personal. Los informes de estos datos se usarán de manera anónima para ser difundidos a otros investigadores. No se conservarán los resultados de las pruebas de este estudio en sus registros médicos.

Si los resultados de este seguimiento son publicados, no se mostrará ninguna información que permita la identificación de las personas que participan en este estudio. Sus archivos no serán mostrados a ninguna persona ajena al estudio sin su consentimiento.

Toda información que lo identifique será eliminada de su muestra antes de que ésta sea analizada y almacenada. No obstante, en caso que los miembros de una Autoridad Sanitaria u otras personas que la ley requiera tengan que acceder a su información del estudio, se puede requerir que se vincule su información con las muestras en estudio.

Uso de la muestra después de finalizado el estudio

Las muestras utilizadas en este estudio serán guardadas a una temperatura de – 80°C para fines posteriores al desarrollo de esta investigación. Estos fines guardan correlación con una nueva investigación hasta el agotamiento de la muestra.

Participación voluntaria y retiro del estudio

La participación en este estudio es totalmente voluntaria y puede solicitar toda la información que crea necesaria para su decisión de participar o no. Así mismo, una vez que nos brindó su consentimiento firmado también se puede retirar del estudio en cualquier momento sin perjuicio alguno.

Contactos para responder ante cualquier duda o pregunta respecto a la investigación

- Investigador principal: Victor Raul Arrunátegui Correa
- Grado académico: Dr. En Ciencias de la Salud
- Institución: Universidad San Martín de Porres

- Teléfono: 943868301
- Dirección: Jr. Huascar 1244, Jesus Maria
- Dirección de correo electrónico: arruna9@hotmail.com
- Presidente del Comité de ética: Dr. Amador Vargas Guerra
- Nombre de la Organización: Comité Institucional de Ética en Investigación de la USMP.
- Dirección: Av. Alameda del Corregidor 1531, Urbanización Los Sirius III Etapa- La Molina, Lima
- Teléfono: 365-2300, Anexo 160.
- Dirección de correo electrónico: etica_fmh@usmp.pe

2. Hoja de consentimiento informado

EXPRESIÓN FENOTÍPICA Y GENOTÍPICA DE LINFOCITOS Y MONOCITOS EN SANGRE PERIFÉRICA DE PACIENTES CON Y SIN DIABETES *MELLITUS* SOMETIDOS A HEMODIÁLISIS. CENTRO NEFROLÓGICO PRIVADO 2019

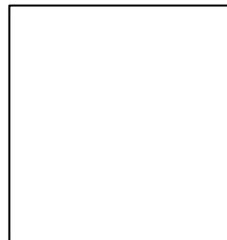
Yo, de años de edad. He leído la hoja de información que se me ha entregado. He podido hacer preguntas sobre el estudio. Así como he recibido suficiente información sobre este estudio de investigación.

He hablado con el Dr. Arrunátegui ante las dudas que he tenido y comprendo que puedo retirarme del estudio en cualquier momento sin tener que dar explicaciones y sin repercusión o perjuicio alguno hacia mi persona.

Por medio del presente documento consiento voluntariamente participar en la investigación “Expresión fenotípica y genotípica de células inmunes en sangre periférica de pacientes con y sin Diabetes *mellitus* sometidos a hemodiálisis. Centro nefrológico privado 2019”.

Lima,de..... 2019

Hora:



.....

Firma del participante

Nombre:.....

DNI:.....

Índice derecho

.....

Firma del Investigador

Nombre:.....

DNI:.....

2. Controles de Calibración y Compensación del experimento

Performed: 1/04/2020 10:44 AM

Cytometer Characterization QC Report 4-Blue 3-Red 3-Violet

Cytometer: BD FACSuite	BD FACSuite	User: Aurima User
Cytometer Name: R659190000276	8659190000276	Institution: None
Serial Number: Normal	Normal	
Fluidics Mode: 1/04/2020 10:44 AM	1/04/2020 10:44 AM	
Last Characterization & QC:		Last Modified: 11/25/2019 2:40 PM
Configuration Name: 4-Blue 3-Red 3-Violet		

SUMMARY: PASSED

DETECTOR SETTINGS

Loc Info	Detector			PMT		Bright Bead		Mid Bead		Dim Bead		Linearity (±2%)			Resolution				
	Name	Mirror	Filter	Position	Voltage at LW at Settings	Slope of Gain	Median at LW at Settings	Median at OC at Settings	%R/CV at Settings	Median at OC at Settings	%R/CV at Settings	Median at OC at Settings	%R/CV at Settings	Min Channel	Max Channel	Sensitivity	Electronic Noise RSD	Or (x10 ³)	Br
LASER: Blue (Wavelength = 488nm)																			
X	FSC	-	-	FSC	236.3	0.0040	17,970	120,907	0.9	120,814	0.9	23,442	1.2	N/A	N/A	290	N/A	N/A	N/A
X	SSC	10	488/15	E	421.3	8.5016	126,028	121,968	2.2	122,766	2.1	54,456	1.5	N/A	N/A	1,689	N/A	N/A	N/A
X	APC	507LP	527/32	D	494.7	8.6761	15,723	100,866	1.6	2,802	8.5	563	20.2	75	229,114	645	17.7	74.4	63
X	PE	560LP	588/42	C	533.1	8.7544	22,430	100,682	1.4	2,311	8.3	450	25.9	119	229,173	976	17.7	414.7	146
X	PerCP-Cy5.5	665LP	700/54	B	629.5	8.6608	37,545	98,213	2.4	2,752	12.9	390	35.7	82	229,978	468	17.7	19.9	21
X	PE-Cy7	752LP	783/56	A	761.5	8.8149	19,240	97,378	4.9	2,165	29.8	281	88.8	103	210,941	2,917	17.7	19.8	0
LASER: Red (Wavelength = 640nm)																			
X	APC	660/10	660/10	C	558.8	8.7664	43,375	100,432	1.9	2,710	9.7	422	25.6	90	229,078	544	19.1	37.9	28
X	APC-R700	705LP	720/30	B	524.2	8.7287	26,019	99,309	1.9	3,123	7.9	430	21.3	142	228,519	169	19.1	13.1	37
X	APC-Cy7	752LP	783/56	A	582.5	8.6389	92,190	99,142	2.1	2,938	7.4	421	19.8	82	228,726	111	19.1	18.6	285
LASER: Violet (Wavelength = 405nm)																			
X	V450	448/45	448/45	E	507.5	8.8430	10,285	100,801	1.7	4,853	8.2	797	30.2	120	228,724	186	20.4	84.3	1,198
X	V500-C	500LP	528/45	D	508.9	8.5729	40,195	100,502	1.2	2,490	6.4	318	21.7	146	229,729	155	19.0	46.0	923
X	BV605	606/36	606/36	C	534.2	8.7034	7,429	100,346	2.6	2,277	17.2	378	49.0	75	228,335	2,408	19.7	207.1	17

LASER SETTINGS

BD FACSuite v1.5

Cytometer Characterization QC Report 4-Blue 3-Red 3-Violet

Laser	Position	Delay		Area Scaling Factor	Power (mW)		Current (mA)	
		Trigger on FSC	Trigger on Fluorescence		Actual	Spec	Actual	Spec
Blue	Second	0.00	0.00	0.85	20.48	>= 16.48	125.54	<= 800.40
Red	Third	36.68	36.71	0.92	44.01	>= 35.20	92.78	<= 117.00
Violet	First	-33.53	-33.46	0.95	44.24	>= 35.44	70.88	<= 82.20

INFO

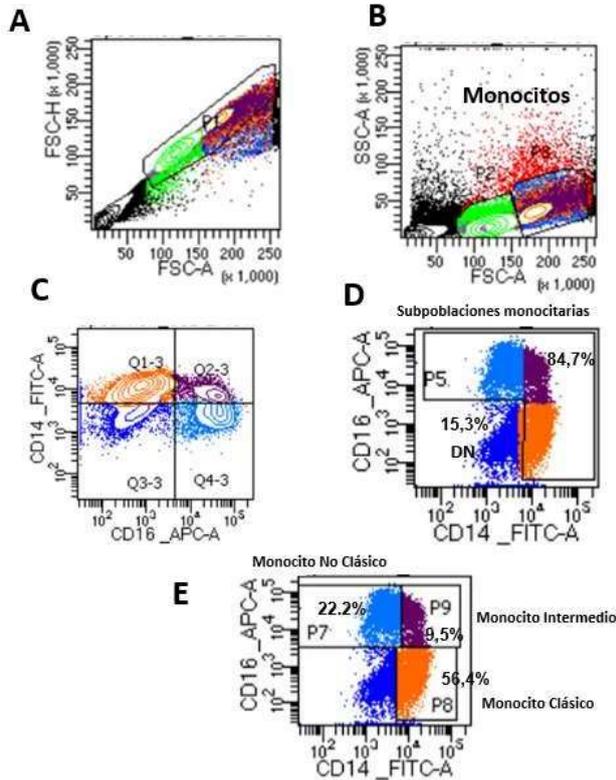
Setup Beads	Cytometer Settings
Bead Product: BD CS&T Beads Lot ID: 1008816 Expiration Date: 1/31/2023	Window Extension: 3.00 FSC Area Scaling Factor: 0.88

*Laser Alignment procedure was performed

COMMENTS

3. Determinación de subpoblaciones leucocitarias por citometría de flujo

Determinación Fenotípica de la Población Monocitaria



La estrategia de agrupamiento para las subpoblaciones monocitarias fue la siguiente: **(A)** Selección de los *singlets* **(B)** Sobre esta población de *singlets*, se identificaron las poblaciones de monocitos en un diagrama de puntos FSC/SSC agrupadas en el gate P3 **(C)** Gráfico de densidad de las subpoblaciones CD14/CD16 detectadas con los fluorocromos FITC y APC **(D)** Gráfico de puntos en donde las subpoblaciones de monocitos son agrupadas en el gate P5, para diferenciarlos del DN que es el remanente de doble negativo de CD14⁻/CD16⁻ **(E)** Se identifican los monocitos clásicos (CD14⁺⁺ CD16⁻) en la ventana P8, los monocitos intermedios (CD14⁺CD16⁺) en la ventana P9 y los monocitos no clásicos (CD14⁺CD16⁺⁺) en la ventana P7. Analizado en BD FACSLyric™ Clinical Flow Cytometry System.

Paciente	Leucocitos (10 ³ mm ³)	Plaquetas (10 ³ mm ³)	Linfocitos (10 ³ mm ³)	Monocitos (10 ³ mm ³)	Neutrófilos (10 ³ mm ³)	Eosinófilos (10 ³ mm ³)	Basófilos (10 ³ mm ³)
LM013	9140	291000	12.5	9.8	73.9	3.2	0.6
LM003	6140	201000	52.8	8	55.8	2.7	0.4
LM010	6480	246000	25.3	8.7	54.9	9.8	1.3
LM007	5370	91000	35.8	8.7	52.1	2.7	0.1
LM026	5090	97000	15.5	5.3	78.4	0.3	0.3
LM012	7230	187000	19.1	7.6	67.2	5.1	0.1
LM025	8000	169000	21.7	5.8	51.5	20.7	0.3
LM008	7600	228000	17.1	9.1	70.4	3.1	0.3
LM017	4500	194050	32.6	11	51.9	3.9	0.6
LM023	6900	236000	16.9	5.1	74.9	2.1	1
LM016	8950	286000	21.1	6.3	59	12.2	0.9
LM019	8630	133000	16.7	12.9	67.9	1.9	0.6
LM022	8880	178000	39.2	8.9	48.5	7.1	0.6
LM020	7150	138000	16.5	9.7	73.2	0.9	0.2
LM006	6980	200050	15.7	10.2	66.5	7.1	0.5
LM015	6697	285000	25	5.4	66	1.7	0.7
LM021	8430	249000	23.4	6.2	61.3	8.2	0.9
LM011	7500	163000	27.1	8.7	60.4	3.1	0.7

5. Recuento de subpoblaciones linfocitarias de pacientes con ERC obtenidos por citometría de flujo

LINFOCITOS								
N°	Código del Paciente	Linfocito totales	Linfocito T	Linfocito CD4	Linfocito CD8	Linfocito B	Linfocito NK	Linfocito NKT
1	LM003	3241.919922	2012.488892	1070.640015	533.3099976	508.8351746	720.595947	2.161787748
2	LM006	1095.859985	903.6400146	524.1099854	337.9599915	42.93999863	149.289993	0.149289995
3	LM007	1922.459961	1341.48999	674.7700195	598.3099976	129.5700073	451.390015	0.451390028
4	LM008	1299.599976	979.9299927	502.7000122	362.5700073	34.11000061	285.559998	15.42023945
5	LM010	1639.439941	1590.060059	985.8400269	505.6400146	32.06000137	17.3099995	0
6	LM011	2032.500000	1619.849976	920.0700073	633.3599854	205.3300018	207.320007	0.207320005
7	LM012	1380.930054	919.4490967	417.4299927	435.8200073	87.81748962	373.663422	0
8	LM013	1142.500000	687.2600098	330.5700073	320.2600098	138.0399933	317.200012	0.951600015
9	LM015	1674.250000	1205.939941	373.8399963	757.3300171	72.23999786	396.070007	0.396070004
10	LM016	1888.449951	1382.160034	791.9799805	508.6400146	109.6999969	396.589996	0
11	LM017	1467.000000	1314.910034	732.4099731	399.730011	56.22999954	95.8600006	0
12	LM019	1441.209961	1094.949951	867.2000122	175.1900024	118.1500015	228.110001	0
13	LM020	1179.750000	770.8656616	454.8099976	239.7400055	31.45264244	377.431702	0.377431691
14	LM021	1972.619995	1433.483154	997.7000122	266.6300049	244.8531799	294.28363	0.294283628
15	LM022	3480.959961	1934.400024	1110.339966	725.4000244	389.4299927	1157.13000	1.157130003
16	LM023	1166.099976	663.7399902	284.0799866	321.9100037	35.40000153	466.959991	2.801759958
17	LM025	1736.000000	1237.609985	591.5800171	529.7000122	241.3899994	257.00000	0.256999999
18	LM026	788.9500122	457.5899963	184.4100037	202.7100067	55.02000046	276.339996	0.276340008

6. Recuento de subpoblaciones monocitarias de pacientes con ERC obtenidos por citometría de flujo

MONOCITOS					
N°	Código de Paciente	Monocitos Totales	Monocitos Clasicos	Monocitos Intermedios	Monocitos No Clasicos
1	LM003	491.2000122	246.2200012	30.23999977	214.7500000
2	LM006	711.9600220	489.3999939	20.44000053	202.1199951
3	LM007	467.1900024	234.6900024	26.96999931	205.5299988
4	LM008	691.5999756	560.8200073	15.09000015	115.6900024
5	LM010	563.7600098	481.2399902	22.87999916	59.63999939
6	LM011	652.5000000	475.9299927	57.79000092	118.7799988
7	LM012	549.4799805	351.7699890	59.25000000	138.4600067
8	LM013	895.7199707	634.4299927	174.5200043	86.77999878
9	LM015	361.6380005	260.7300110	19.30999947	81.59999847
10	LM016	563.8499756	337.1900024	28.82999992	197.8300018
11	LM017	495.0000000	315.3800049	40.38000107	139.2400055
12	LM019	1113.270020	842.9600220	76.08999634	194.2200012
13	LM020	693.5499878	480.9800110	92.08000183	120.4899979
14	LM021	522.6599731	208.9199982	57.75999832	255.9799957
15	LM022	790.3200073	250.7799988	74.94000244	464.6000061
16	LM023	351.8999939	267.8999939	25.28000069	58.72000122
17	LM025	464.0000000	322.2399902	44.34000015	97.41999817
18	LM026	269.7699890	187.9400024	25.18000031	56.65000153

7. Cuantificación de las muestras del estudio

N°	Código del Paciente	D	ND	Cuantificación (ng/uL)
1	LM003		1	80
2	LM006	1		73,4
3	LM007		1	1530
4	LM008		1	1010
5	LM010		1	584
6	LM011	1		1460
7	LM012		1	1060
8	LM013		1	874
9	LM015	1		516
10	LM016	1		120
11	LM017		1	404
12	LM019	1		1720
13	LM020	1		786
14	LM021	1		788
15	LM022	1		1600
16	LM023	1		472
17	LM025		1	552
18	LM026		1	100

8. Expresión de los valores de Ct de las citocinas IL-6, IL-10, IL-1 β e INF- γ siendo actina el gen endógeno

N°	Código de Paciente	IL-6	IL-10	IL-1β	INF-γ	ACTINA
1	LM003	33.50	37.48	0	0	24.95
2	LM006	33.56	0	38.93	0	21.21
3	LM007	0	0	39.65	0	21.44
4	LM008	0	35.70	36.75	0	24.48
5	LM010	31.55	35.77	37.40	0	20.39
6	LM011	37.42	31.36	0	0	19.90
7	LM012	33.66	34.22	0	0	18.59
8	LM013	33.62	33.73	38.3	0	18.98
9	LM015	35.75	31.33	36.08	38.49	16.25
10	LM016	30.06	33.87	35.49	0	16.75
11	LM017	32.89	32.95	38.82	0	19.11
12	LM019	34.7	33.54	34.45	40.41	20.71
13	LM020	31.56	31.46	29.88	37.97	17.67
14	LM021	33.62	34.75	36.19	0	18.90
15	LM022	34.46	32.24	41.57	39.85	19.24
16	LM023	34.69	33.59	40.28	39.72	18.84
17	LM025	32.46	33.42	0	0	17.22
18	LM026	29.01	31.85	36.32	0	20.45

9. Evaluación del Control endógeno

Parte de la información proporcionada corresponde a un trabajo presentado por el grupo de investigación que utilizaron los mismos pacientes en hemodiálisis con y sin DM2 bajo la misma metodología de PCR cuantitativa en tiempo real con otros marcadores de expresión génica.

Control	Ct	Tm
	Media \pm DE	Media \pm DE
β Actina	20.49 \pm 2.39	82.97 \pm 0.26
Tbet	28.12 \pm 2.60	84.85 \pm 0.05

CÓDIGO	Ct	
	TBET	ACTINA
LM003	32.58	27.92
LM013	29.64	19.06
LM007	28.09	21.82
LM017	29.47	19.56
LM012	28.67	21.08
LM025	29.66	20.72
LM028	22.89	17.67
LM026	29.26	21.86
LM027	21.06	14.54
LM008	29.97	21.89
LM010	28.79	21.78
LM019	28.6	19.54
LM016	25.56	18.84
LM021	29.65	19.97
LM006	30.95	21.96
LM024	29.62	21.96
LM015	23.87	18.08
LM022	29.29	21.51

LM011	28.62	21.14
LM023	27.78	20.23
LM020	25.04	17.96
LM014	29.18	19.82
LM001	28.77	22.52
LM002	29.22	21.19
LM018	26.8	19.55

- Se realizaron pruebas antes de iniciar el procesamiento de todas las muestras de los pacientes

Marcadores	Muestras	Ct Media ± DE	Tm Media ± DE
Tbet	LM0019	27.52 ± 0.72	84.8 ± 0.0
	LM0002		
TNF-α	LM0019	24.52 ± 2.01	82.5 ± 0.14
	LM0002		
IL-6	LM0019	33.07 ± 2.30	83.4 ± 0.0
	LM0002		
IL-10	LM0019	34.29 ± 1.05	80.1 ± 0.14
	LM0002		
IL-1β	LM0019	34.18 ± 0.38	83.2 ± 0.0
	LM0002		
IFN-γ	LM0019	41.39 ± 1.39	75.9 ± 0.42
	LM0002		

Control Positivo	Tm
β Actina	84
TNF-α	90.8
IL-6	82.2
IL-10	79.9
IFN-γ	73.8

Todos los controles Negativos recibieron el Ok por ausencia de contaminación en cada una de las pruebas realizadas.

PACIENTE	CODIGO	IL-6	Actina Prom	Δ CT (2)	$\Delta\Delta$ CT	2- Δ CT
D	LM017	32.89	19.34	13.56	-0.45	1.4
D	LM019	32.70	20.13	12.58	-1.43	2.7
D	LM025	32.46	18.97	13.49	-0.51	1.4
D	LM012	33.66	19.84	13.83	-0.18	1.1
D	LM010	31.55	21.09	10.47	-3.54	11.6
D	LM013	33.62	19.00	14.62	0.62	0.7
ND	LM021	33.62	19.44	14.19	0.18	0.9
ND	LM020	31.56	17.82	13.75	-0.26	1.2
ND	LM022	34.46	20.38	14.09	0.08	0.9
ND	LM011	35.42	20.52	14.90	0.90	0.5
ND	LM016	30.06	16.58	13.49	-0.52	1.4
ND	LM018	32.07	18.45	13.63	-0.38	1.3

Calibrador (Promedio Δ Ct Grupo Control)	14.00
--	-------

Estadística descriptiva	Promedio \pm SD		SE
Grupo Control (No diabeticos)	1.0	0.33	0.13
Grupo Tratamiento (Diabeticos)	3.1	4.21	1.72

Anexo 10. Expresión de marcadores de inflamación

PACIENTE	CODIGO	IL-6	Actina Prom	Δ CT (2)	$\Delta\Delta$ CT	2- Δ CT
D	LM017	32.89	19.34	13.56	-0.45	1.4
D	LM019	32.70	20.13	12.58	-1.43	2.7

D	LM025	32.46	18.97	13.49	-0.51	1.4
D	LM012	33.66	19.84	13.83	-0.18	1.1
D	LM010	31.55	21.09	10.47	-3.54	11.6
D	LM013	33.62	19.00	14.62	0.62	0.7
ND	LM021	33.62	19.44	14.19	0.18	0.9
ND	LM020	31.56	17.82	13.75	-0.26	1.2
ND	LM022	34.46	20.38	14.09	0.08	0.9
ND	LM011	35.42	20.52	14.90	0.90	0.5
ND	LM016	30.06	16.58	13.49	-0.52	1.4
ND	LM018	32.07	18.45	13.63	-0.38	1.3

Calibrator (Promedio Δ Ct Grupo Control)	14.00
---	-------

Estadística descriptiva		Promedio \pm SD		SE
Grupo Control (No diabeticos)		1.0	0.33	0.13
Grupo Tratamiento (Diabeticos)		3.1	4.21	1.72

Expresión de IL-6

SE (Error estandar)
SD (Desviación Estándar)

Expresión de IL-10

PACIENTE	CODIGO	IL-6	Actina Prom	Δ CT (2)	$\Delta\Delta$ CT	2- Δ CT
D	LM017	32.89	19.34	13.56	-0.45	1.4
D	LM019	32.70	20.13	12.58	-1.43	2.7
D	LM025	32.46	18.97	13.49	-0.51	1.4
D	LM012	33.66	19.84	13.83	-0.18	1.1
D	LM010	31.55	21.09	10.47	-3.54	11.6
D	LM013	33.62	19.00	14.62	0.62	0.7
ND	LM021	33.62	19.44	14.19	0.18	0.9
ND	LM020	31.56	17.82	13.75	-0.26	1.2
ND	LM022	34.46	20.38	14.09	0.08	0.9
ND	LM011	35.42	20.52	14.90	0.90	0.5
ND	LM016	30.06	16.58	13.49	-0.52	1.4
ND	LM018	32.07	18.45	13.63	-0.38	1.3

Calibrator (Promedio Δ CT Grupo Control)	14.00
---	-------

Estadística descriptiva		Promedio \pm SD		SE
Grupo Control (No diabéticos)		1.0	0.33	0.13
Grupo Tratamiento (Diabéticos)		3.1	4.21	1.72

L-10						
PACIENTE	CODIGO	IL-10	Actina	Δ CT (2)	$\Delta\Delta$ CT	2- Δ CT
D	LM017	32.95	19.34	13.62	-0.52	1.43
D	LM026	31.85	21.17	10.69	-3.45	10.92
D	LM025	33.42	18.97	14.45	0.32	0.80
ND	LM023	33.59	19.54	14.06	-0.08	1.06
ND	LM020	31.46	17.82	13.65	-0.49	1.40

ND	LM015	31.33	16.63	14.70	0.57	0.68
----	-------	-------	-------	-------	------	------

Calibrator (Promedio ΔCt Grupo Control)	14.13
--	-------

Estadística descriptiva		Promedio	SD	SE
Grupo Control (No diabéticos)		1.0	0.36	0.21
Grupo Tratamiento (Diabéticos)		4.38	5.67	3.27

IL-10						
PACIENTE	CODIGO	IL-10	Actina	Δ CT (2)	$\Delta\Delta$ CT	2- Δ CT
D	LM003	35.48	26.44	9.04	-2.38	5.20
D	LM012	34.22	19.84	14.39	2.96	0.13
D	LM013	33.73	19	14.73	3.31	0.10
ND	LM018	30.01	18.45	11.57	0.14	0.91
ND	LM022	32.24	20.38	11.87	0.44	0.74
ND	LM011	31.36	20.52	10.84	-0.58	1.50

Calibrator (Promedio ΔCt Grupo Control)	11.42
--	-------

Estadística descriptiva		Promedio	SD	SE
Grupo Control (No diabéticos)		1.05	0.40	0.23
Grupo Tratamiento (Diabéticos)		1.81	2.94	1.69