



Universidad de Oviedo
Universidá d'Uviéu
University of Oviedo



Universidad de Oviedo

Instituto Universitario de Oncología del Principado de Asturias

Máster en biomedicina y oncología molecular

**ESTUDIO INMUNOFENOTÍPICO DE PACIENTES CON
NEUTROPENIA FEBRIL POST QUIMIOTERAPIA:
VALOR CLÍNICO Y PERSPECTIVAS DE FUTURO**

Autor: Paola Núñez Medina

Julio, 2021

Trabajo Fin de Máster



Universidad de Oviedo
Universidá d'Uviéu
University of Oviedo



INFORME DEL TUTOR

El Dr. D. Enrique Colado Varela como tutor del Trabajo de Fin de Máster titulado “*Estudio inmunofenotípico de pacientes con neutropenia febril: valor clínico y perspectivas de futuro*” realizado por Dña. Paola Núñez Medina en el programa de Máster Universitario en Biomedicina y Oncología Molecular de la Universidad de Oviedo regulado por el BOPA Decreto 37/2012 del 4 de mayo, informa la originalidad del presente trabajo de investigación y resuelve favorablemente el depósito del mismo, dado que reúne las condiciones necesarias para su defensa.

Firma,

Dr. D. Enrique Colado Varela

Oviedo, Principado de Asturias

Julio, 2021

AGRADECIMIENTOS

Ha sido gracias a la ayuda de muchas personas que hoy puedo escribir estas líneas y compartir los frutos de estos meses de investigación y aprendizaje.

Primeramente, quisiera agradecer a mi tutor, el Dr. Enrique Colado Varela y a la Dra. Covadonga Quirós Caso el ser mis guías en este proceso. El haber aprendido de ustedes y gozado de su orientación activa, cercana e incondicional, es un privilegio que no paso por alto. Este trabajo no habría sido posible sin ustedes. Gracias.

Agradezco también al resto del equipo del laboratorio de hematología del Hospital Universitario Central de Asturias. Especialmente a Esther, Mercedes y Ana, gracias por compartir conmigo sus conocimientos de forma paciente y desinteresada; debo gran parte mi crecimiento a su afectuoso tutelaje. Gracias.

A mis colegas y amigos residentes de hematología, oncología e inmunología, muchas gracias por su colaboración con el proyecto, pero, sobre todo, gracias por su complicidad y amistad. Ha sido una dicha coincidir con ustedes.

Finalmente, agradezco a mis padres y a mis hermanos. No bastó un océano para distanciarnos; su amor, su compañía y sus consejos me acompañan siempre y me hacen el ser humano que soy. Gracias por ser mi mejor ejemplo de amor incondicional. A mi abuela, gracias por tus enormes esfuerzos por mantenernos cerca.

Gracias a los amigos que hacen manifiesto su cariño y apoyo trasatlántico; y gracias a mis amigos y afectos de España, por ser mi casa. A mis niños de Zarae, gracias por devolverme la curiosidad y darme la fuerza y la motivación que hoy me tienen aquí.

Y a tantas personas más, por siempre: ¡gracias!

*Cuando emprendas tu viaje a Ítaca
pide que el camino sea largo,
lleno de aventuras, lleno de experiencias.*

[...]

*Ten siempre a Ítaca en tu mente,
llegar allí es tu destino;
mas no apresures nunca el viaje.
Mejor que dure muchos años
y atracar, viejo ya, en la isla,
enriquecido de cuanto ganaste en el camino.*

Ítaca
Constantino Cavafis

A mis padres y hermanos, por darme fuerza.

A mi abuela, por darme esperanza.

A Zarae, por darme razones.

ÍNDICE

1. RESUMEN	3
1.1 Abstract.....	4
2. INTRODUCCIÓN.....	5
2.1 El sistema inmunológico	5
2.2 La neutropenia febril.....	6
2.3 La citometría de flujo como herramienta diagnóstica y pronóstica.....	9
3. HIPÓTESIS.....	11
4. OBJETIVOS.....	11
5. MATERIAL Y MÉTODOS.....	12
5.1 Diseño del estudio	12
5.2 Criterios de inclusión.....	12
5.3 Criterios de exclusión	12
5.4 Recolección de datos y muestras	13
5.5 Método de evaluación de los casos.....	13
5.6 Citometría de flujo	13
5.1 Creación de la base de datos.....	16
5.2 Análisis estadístico.....	16
6. RESULTADOS.....	17
6.1 Características de la serie global.....	17
6.2 Variables clásicas	18
6.3 Los pacientes con neutropenia febril presentan una mayor disfunción inmunológica que aquellos con neutropenia sin fiebre	20
6.4 Los pacientes con desenlace fatal presentaban recuentos celulares notablemente inferiores en diversas poblaciones de leucocitos en comparación con los pacientes sobrevivientes.....	24

6.5 El puntaje del Cumulative Illness Rating Scale (CIRS) se correlaciona con la cantidad de células NK	28
6.6 Las poblaciones de células del sistema fagocitario mononuclear y células NK se correlacionan con los días de duración de la fiebre en pacientes con neutropenia febril	30
6.7 El recuento de neutrófilos mediante citometría de flujo es una herramienta potencialmente predictora del estatus caso/control	31
7. DISCUSIÓN	33
8. CONCLUSIONES	42
9. BIBLIOGRAFÍA	43

1. RESUMEN

La neutropenia constituye una de las principales y más frecuentes complicaciones de la quimioterapia y es un predisponente para el desarrollo de infecciones, que a menudo se manifiestan en forma de neutropenia febril. La neutropenia febril se presenta en cerca del 10 al 18% de los pacientes en tratamiento antineoplásico y supone un importante aumento de su morbi-mortalidad. Las herramientas disponibles en la actualidad para pronosticar su aparición o su severidad son, en su mayoría, subjetivas, poco reproducibles y considerablemente inexactas.

Dado que no todos los pacientes con neutropenia desarrollarán neutropenia febril, es imperativo cuestionarse si existen diferencias fundamentales en sus poblaciones celulares inmunológicas. Para probar esta hipótesis, se estudiaron las poblaciones celulares inmunológicas de pacientes con neutropenia febril post quimioterapia y de pacientes con neutropenia sin fiebre realizando un estudio inmunofenotípico mediante citometría de flujo con una combinación de anticuerpos capaz de detectar 20 poblaciones celulares. Con el objetivo de contrastar la utilidad de las variables clínicas y bioquímicas más comúnmente asociadas al pronóstico de neutropenia febril, éstas fueron incluidas también en el estudio. Secundariamente, se desarrolló un modelo predictivo de neutropenia febril con las variables más significativas.

Se observaron diferencias significativas en 18 de las 20 poblaciones celulares estudiadas, entre las que destacan por su fuerza de asociación, los linfocitos T y los neutrófilos. Además, se encontró que los neutrófilos determinados mediante citometría de flujo son una herramienta potencialmente predictiva del desarrollo de neutropenia febril.

Estos resultados confirman la existencia de diferencias importantes en el sistema inmunológico de ambos grupos que hacen a unos, más vulnerables ante los procesos infecciosos. El estudio inmunofenotípico de los pacientes con neutropenia post quimioterapia mediante citometría de flujo puede ser la base de un modelo predictivo de neutropenia febril, para lo cual, es necesaria la realización de nuevas investigaciones.

1.1 Abstract

Neutropenia constitutes one of the principal and most frequent complications of chemotherapy and it is a risk factor for infection, often presented as febrile neutropenia. Febrile neutropenia presents in nearly 10 to 18% of patients in antineoplastic treatment and entails a considerable increase of their mortality. The tools currently available to predict its presentation or its severity are, in the vast majority, subjective, not replicable, and considerably inexact.

Given that not all patients with neutropenia end up developing febrile neutropenia, it is imperative to raise the question of whether or not fundamental differences among their immune cell populations exist. To test this hypothesis, immune cell populations of both patients with febrile neutropenia and non-febrile neutropenia were studied by immunophenotyping with flow cytometry using an antibody combination capable of recognizing up to 20 cell populations. With the objective of contrasting the usefulness of the clinical and biochemical variables often associated with febrile neutropenia's prognosis, these were also included in the study. Secondly, we aimed to create a predictive model for febrile neutropenia using the most significant variables.

The results showed significant differences in 18 of the 20 immune cell populations analyzed, among which T cells and neutrophils stand out. Furthermore, it was observed that neutrophil concentration determined by flow cytometry is a potentially predictive tool of the development of febrile neutropenia.

These results confirm the existence of relevant differences in the immune system of both groups, which in turn, makes one of them more vulnerable to infection. The immunophenotypic study of patients with post-chemotherapy neutropenia by flow cytometry might be the basis of a predictive model of febrile neutropenia, for which new research is needed.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 El sistema inmunológico

El sistema inmunológico ha constituido durante siglos, uno de los intereses principales de la ciencia médica y biomédica. Las primeras nociones de que el sistema inmunológico jugaba un papel fundamental en el desarrollo de procesos mórbidos datan del siglo XVIII, cuando comenzó a gestarse la idea de que existía dentro del ser humano un sistema complejo que promovía o evitaba la diseminación de patógenos en el organismo [1]. Sin embargo, no sería hasta el siglo XIX que se esclareciera el papel “protector” del sistema inmunológico gracias a los hallazgos de Eli Metchnikoff y su -austera- caracterización de la inmunidad innata. Desde entonces, el sistema inmunológico ha sido objeto constante de investigación, al punto de que hoy somos ampliamente capaces de reconocer sus componentes, sus funciones y su implicación en procesos complejos como las infecciones, la respuesta metabólica al trauma y el cáncer.

En este sentido, hoy se sabe que el sistema inmunológico comprende una red compleja y especializada de órganos, tejidos y células en constante interacción, y que posee dos sistemas de acción fundamentales: la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa. La inmunidad innata, por su parte, constituye la primera línea de defensa ante patógenos y aunque inespecífica, es crucial en el mantenimiento de la homeostasis y la prevención de la invasión microbiana [2]. El papel de la inmunidad innata no se limita a la eliminación de patógenos, sino que es un importante activador y regulador de la inmunidad adaptativa [3], que a su vez, se caracteriza por ser una respuesta antígeno-específica, tardía y generadora de memoria inmunológica [4].

Ambos brazos del sistema inmunológico poseen células con funciones específicas. La inmunidad innata, por un lado, contempla a los mastocitos, implicados en la liberación de histamina y heparina y en la iniciación de la inflamación [1], monocitos, altamente fagocíticos y con capacidad migratoria, denominándose “macrófagos” en los tejidos [5], células dendríticas, con potencial fagocitario y encargadas, junto con

los macrófagos, de la presentación de antígenos [1], células NK, con capacidad antiviral y supresora de tumores [6] y granulocitos, entre los que destacan por su importancia los neutrófilos.

Los neutrófilos son los leucocitos más abundantes en un individuo sano y como la familia de granulocitos en general, son un pilar clave del sistema inmunológico innato al constituir la primera línea de defensa frente a patógenos, aunque su función no se limita a este brazo del sistema inmunológico, sino que también participan de forma crucial en la respuesta adaptativa con mecanismos de cebación y reclutamiento celular [7].

El sistema inmunológico adaptativo, por otra parte, basa su acción en dos tipos celulares específicos: los linfocitos T, originados en médula ósea y que completan su maduración en el timo -de ahí la denominación T, “*thymus*”-, encargados de interacciones de regulación (linfocitos T CD4+ o “*helper*”) y de citotoxicidad (linfocitos T CD8+ o “*citotóxicos*”) [8] y los linfocitos B, que se originan y completan su maduración en médula ósea -denominados B por “*bone marrow*”-, que actúan principalmente expresando inmunoglobulinas [9].

No obstante, en años recientes se ha dilucidado que las diferencias tan marcadas que establecía la inmunología tradicional entre la inmunidad innata y la adaptativa en realidad no existen como tal y se trata más bien de un solo sistema complejo con límites existentes aunque no totalmente delimitados, cuyas células interactúan, incluso, en procesos de regulación bidireccional [3,10-13].

Lo cierto es que, tratándose de un sistema tan complejo, la orquestación perfecta de las funciones de sus componentes es crucial para el correcto desempeño inmunológico, no sólo combatiendo infecciones y el desarrollo tumoral, sino impidiendo la generación de procesos inmunopatológicos o de autoinmunidad.

2.2 La neutropenia febril

La neutropenia febril es una emergencia hemato-oncológica que se define como un recuento total de neutrófilos $<500/mm^3$ o $<1000/mm^3$ pre-nadir en presencia de fiebre (temperatura $>38^{\circ}C$) o signos clínicos de sepsis [14]. Se trata de una

complicación importante del cáncer y una manifestación de toxicidad dosis-limitada de la quimioterapia, que a menudo constituye su desencadenante principal [15].

Las infecciones, que en el contexto de los pacientes con cáncer a menudo se presentan en forma de neutropenia febril, son la complicación principal de la neutropenia inducida por quimioterapia [44]. La neutropenia febril se asocia a la presentación de complicaciones mayores -incluyendo la falla orgánica múltiple- y a un aumento considerable de la mortalidad, que se estima hasta en 11% [16]. La incidencia de la neutropenia febril oscila entre el 10% y el 18% en pacientes que reciben quimioterapia mielo-supresiva [17]; aunque el riesgo varía dependiendo de factores relacionados con el paciente, la neoplasia que presenta y el tipo de tratamiento que recibe; lo que explica que el riesgo de desarrollar neutropenia febril varíe considerablemente de una neoplasia a otra y de un régimen quimioterapéutico a otro [15].

Los pacientes con tumores hematológicos presentan un riesgo incrementado de presentar cuadros infecciosos en general y episodios de neutropenia febril [18]. Esto se debe no sólo a las esenciales características mielo-supresivas de los regímenes quimioterapéuticos empleados en este tipo de neoplasias [19], sino también a las características fisiopatológicas de la enfermedad. Por un lado, con frecuencia se presentan alteraciones en la función de la médula ósea, que comienza la maduración anormal y proliferación desregulada de células pobremente diferenciadas, lo que trae como consecuencia neutropenia y alteración en la función de los granulocitos [20,21]. A la disposición de escasas células inmunológicas y a la deficiencia funcional que muchas de éstas de presentan, se le suman factores predisponentes de infección derivados de las alteraciones moleculares propiciadas por la inmadurez celular. Se ha observado, por ejemplo, que las células mieloides inmaduras suprimen activamente la respuesta antígeno-específica de las células T [22]. Así, se puede documentar bacteremia hasta en el 25% de los pacientes con neoplasias hematológicas [23,24].

Las neoplasias sólidas, por otra parte, presentan menos riesgo de desarrollar bacteremia y neutropenia febril; y también tienen una menor mortalidad que los

pacientes con neoplasias hematológicas [24]. Además, los regímenes terapéuticos usados en tumores sólidos generalmente causan neutropenia de corta duración en comparación con los regímenes usados en neoplasias hematológicas [25]. Los mecanismos fisiopatológicos que subyacen la propensión a las infecciones en pacientes con tumores sólidos están relacionados con el desarrollo de procesos obstructivos propiciados por el mismo tumor y con necrosis intratumoral. No obstante, parece que el principal factor de riesgo en estos pacientes proviene de las estrategias terapéuticas usadas en el tratamiento de sus neoplasias, siendo más propensos a presentar infecciones nosocomiales derivadas de intervenciones quirúrgicas, manipulación de heridas, uso de catéteres y sondas, entre otros [26].

La neutropenia febril tiene numerosas implicaciones negativas para el paciente y el sistema de salud. Por un lado, aumenta la morbi-mortalidad de los pacientes con cáncer, al mismo tiempo que complica el tratamiento antineoplásico al propiciar retrasos y/o reducción en las dosis, afectando la efectividad de la terapia antitumoral [14]. Igual de relevantes son las consecuencias económicas de los eventos de neutropenia febril por cáncer: se estima que los costos de hospitalización de pacientes con neutropenia febril por cáncer ascienden a un promedio de 52 mil USD en el caso de neoplasias hematológicas y hasta 17 mil USD en el caso de pulmón, por ejemplo [27]. No obstante, ahora se sabe que los pacientes con neutropenia febril son una población heterogénea, entre los cuales hasta un 20% tienen un riesgo bajo de presentar complicaciones y podrían ser candidatos al tratamiento ambulatorio [17].

Lo anterior plantea un desafío importante: la identificación certera de aquellos pacientes con bajo riesgo de complicaciones. Ello implica la imperiosa necesidad de desarrollar una herramienta suficientemente sensible para identificar eficazmente a los pacientes de bajo riesgo, de tal forma que ningún paciente con riesgo intermedio o alto sea equivocadamente sometido a tratamiento ambulatorio, con el aumento de morbi-mortalidad que ello podría suponer.

Al respecto, en el año 2000, la Asociación Multinacional de Cuidados de Soporte en Cáncer (MASCC, por sus siglas en inglés) desarrolló un sistema de estratificación de riesgo para pacientes con neutropenia febril. El sistema se basa en la evaluación de

ocho parámetros de predicción positiva para bajo riesgo de complicaciones y tiene la ventaja de que puede usarse para tumores hematológicos y tumores sólidos. No obstante, presenta grandes deficiencias: toma en cuenta variables subjetivas como “carga de la enfermedad” (*burden of illness* en inglés) y una parte importante de su puntuación se atribuye a la ausencia de hipotensión. Al ser la hipotensión en sí misma, un punto definitivo de gravedad; la consideración de su ausencia hace al MASCC-score poco sensible (35-36%) para valorar los casos clínicamente estables [28-31].

Con la finalidad de paliar dichas deficiencias, en el 2018, la Sociedad Española de Oncología Médica diseñó la herramienta *Clinical Index of Stable Febrile Neutropenia* (CISNE); que incluye seis variables asociadas con la incidencia de complicaciones graves. En contraste con el MASCC score, el CISNE score no considera la hipotensión, no valora variables subjetivas e innova en la valoración cuantitativa de células inmunológicas (monocitos). Así, divide a los pacientes en riesgo bajo, intermedio y alto. Es mucho más efectiva prediciendo qué pacientes presentarán complicaciones a pesar de su aparente estabilidad clínica; con una sensibilidad del 66% y un valor predictivo negativo de 91% [31,32]. Tiene la desventaja, sin embargo, de no haber sido diseñada ni validada para tumores hematológicos.

Pese a la notable mejoría pronóstica del CISNE score con respecto al MASCC score, un porcentaje importante de pacientes seguirán siendo clasificados erróneamente como pacientes de bajo riesgo candidatos a terapia ambulatoria; con el aumento de la morbi-mortalidad que ello supone. La utilidad clínica de ambas herramientas se basa en que son, actualmente, las únicas herramientas disponibles para la estratificación de riesgo de pacientes con neutropenia febril por cáncer; aunque su desempeño es aún subóptimo para permitir a los clínicos descartar complicaciones graves [33].

2.3 La citometría de flujo como herramienta diagnóstica y pronóstica

La citometría de flujo es una técnica de alta complejidad que analiza células individuales o partículas conforme son atravesadas por uno o varios láseres mientras

se encuentran suspendidas en una solución amortiguadora. La principal ventaja de esta herramienta es que tiene la capacidad de analizar cientos de células por segundo; permitiendo un análisis complejo de diversas poblaciones celulares en un tiempo muy corto. Los gigantescos avances en la instrumentación usada en la citometría de flujo, el aumento en la disponibilidad de fluorocromos y las mejoras en los software de interpretación de datos han abierto el campo de acción de la citometría de flujo, con lo que se ha convertido en una técnica imprescindible para el diagnóstico, pronóstico y seguimiento de muchas enfermedades en disciplinas como la inmunología, la oncología y la hematología; entre otras [34,35].

Bajo los principios de medición de la dispersión de la luz y la emisión de fluorescencia que ocurren cuando las partículas en suspensión son atravesadas por el láser; está la inigualable capacidad de la citometría de flujo para reconocer modelos inmunofenotípicos de poblaciones normales, reactivas y patológicas mediante la identificación de patrones de expresión de antígenos de cada célula [35]. En ese aspecto, se ha demostrado que la citometría de flujo es una técnica útil para pronosticar gravedad en el contexto de respuesta metabólica al trauma y de procesos infecciosos mediante el inmunofenotipaje [36-43].

Curiosamente, poco se ha estudiado sobre la capacidad predictiva del inmunofenotipaje mediante citometría de flujo en las neutropenias febriles por cáncer, pasando por alto una herramienta potencialmente valiosa para predecir complicaciones. La caracterización inmunológica de los pacientes con neutropenia febril en comparación con aquellos pacientes con neutropenia que no desarrollan fiebre, pueden esclarecer los mecanismos inmunológicos que predisponen la neutropenia febril y favorecer el desarrollo de herramientas predictivas o apuntar a la utilización de terapias dirigidas en los pacientes con más riesgo de desarrollar esta complicación.

3. HIPÓTESIS

- 1) Los pacientes con neutropenia febril post-quimioterapia presentan un perfil inmunológico distinto al de los pacientes con neutropenia sin fiebre, mismo que los hace más susceptibles a los procesos infecciosos.
- 2) Las diferencias inmunológicas entre los pacientes con neutropenia febril y los pacientes con neutropenia sin fiebre pueden ser útiles como variables pronósticas de la presentación de neutropenia febril.

4. OBJETIVOS

- 1) Caracterizar inmunofenotípicamente a los pacientes con neutropenia febril post-quimioterapia y a los pacientes con neutropenia sin fiebre.
- 2) Identificar diferencias estadísticamente significativas en las poblaciones celulares de ambos grupos.
- 3) Identificar si existen diferencias estadísticamente significativas en las variables clínicas y bioquímicas más comúnmente asociadas al pronóstico de neutropenia febril entre ambos grupos.
- 4) Diseñar un modelo predictivo de neutropenia febril a partir de las variables más estadísticamente relevantes.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 *Diseño del estudio*

Se realizó en el Hospital Universitario Central de Asturias, un ensayo unicéntrico prospectivo observacional conducido entre octubre de 2020 y junio de 2021 en el que se evaluaron un total de 100 pacientes, previa aprobación del Comité de Ética de Investigación con Medicamentos del Principado de Asturias.

5.2 *Criterios de inclusión*

Los pacientes se incluyeron en el estudio si cumplían con los criterios siguientes: tener diagnóstico de cáncer (sólido o hematológico), haber sido sometidos a tratamiento antineoplásico, presentar un recuento absoluto de neutrófilos $<1000/mm^3$ en presencia de fiebre ($>38^{\circ}C$) y ser diagnosticados en el área IV del Servicio de Salud del Principado de Asturias. Se contempló la inclusión de pacientes de todos los rangos de edad.

El grupo control de pacientes lo constituyeron pacientes oncológicos o hemato-oncológicos que desarrollaron neutropenia post quimioterapia definida de la misma manera y afebriles los tres días previos y posteriores al día de obtención de la muestra.

5.3 *Criterios de exclusión*

Se excluyeron pacientes sin diagnóstico de cáncer o que, teniéndolo, no hubieran recibido tratamiento antineoplásico previo, así como aquellos que pese a presentar neutropenia febril, fueren identificados >48 horas después del inicio del cuadro febril.

5.4 **Recolección de datos y muestras**

Los análisis se llevaron a cabo en sangre remanente de tubos con EDTA después de los estudios hematológicos. Para el grupo de los casos, las muestras fueron obtenidas las primeras 48 horas tras el inicio del cuadro febril.

5.5 **Método de evaluación de los casos**

La información clínica de los pacientes, incluyendo aquella referente al episodio de neutropenia, a su diagnóstico y tratamiento oncológico y hemato-oncológico y sus antecedentes personales patológicos, se obtuvo consultando la historia clínica electrónica. Además, en cuanto a estudios de laboratorio, se recabaron los resultados de las siguientes pruebas: celularidad de la serie blanca del hemograma (leucocitos, monocitos, neutrófilos), proteína C-reactiva, procalcitonina, así como realización de hemocultivos al diagnóstico y después de 48 horas.

Con la finalidad de valorar el estado de salud general de los pacientes, se usó el sistema de puntuación *Cumulative Illness Rating Score* (CIRS); para determinar el estado funcional de los pacientes, se calculó el *Eastearn Cooperative Oncology Group Performance Status* (ECOG).

Para evaluar el riesgo de complicaciones del episodio de neutropenia febril, se calcularon el *Multinational Asociation of Supportive Care in Cancer Score* (MASCC) y el *Clinical Index of Stable Febrile Neutropenia Score* (CISNE). Para valorar el impacto de la enfermedad en el estado actual del paciente, se determinó la *carga de la enfermedad* de acuerdo al sistema de evaluación del MASCC.

5.6 **Citometría de flujo**

Para la determinación del inmunofenotipo, se usó la sangre remanente de los tubos con EDTA después de las pruebas hematológicas. Se usaron 200 μ L de sangre a los que se agregaron los siguientes anticuerpos de BD Biosciences (San Diego, CA, EEUU): 10 μ L de FITC Mouse Anti-Human CD20, 5 μ L de PE Mouse Anti-Human CD16, 5 μ L de PerCP-CyTM5.5 Mouse Anti-Human CD4, 5 μ L de PE-CyTM7 Mouse Anti-

Human CD19, APC Mouse Anti-Human CD56, 5 μ L de APC-H7 Mouse anti-Human CD8, 2 μ L de Pacific Blue™ Mouse Anti-Human CD3 y 5 μ L de CD45 V500-C.

Tras la tinción de superficie, las muestras se incubaron por 30 minutos en oscuridad a temperatura ambiente. Se les añadieron 2ml de solución lisante de eritrocitos con fijador, se dejaron incubar durante 10 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se centrifugaron y se retiró el sobrenadante. Se les agregó a las muestras un tampón de lavado con PBS enriquecido con albúmina, se centrifugaron y se retiró el sobrenadante. Las muestras se procesaron inmediatamente tras el marcaje en un citómetro de flujo Facs Lyric (BD Bioscences, San Diego, CA, EEUU) en el laboratorio de citometría de flujo del Hospital Universitario Central de Asturias.

La obtención de datos se llevó a cabo con el software Infinicyt™ (versión 2.0, Cytognos, Salamanca, España) con un target de adquisición de 100.000 eventos por muestra. La estrategia de gateo se detalla en la [Figura 2](#).

Los datos de las poblaciones celulares fueron grabados como porcentaje de células y exportados como un archivo .csv para la realización del análisis estadístico.

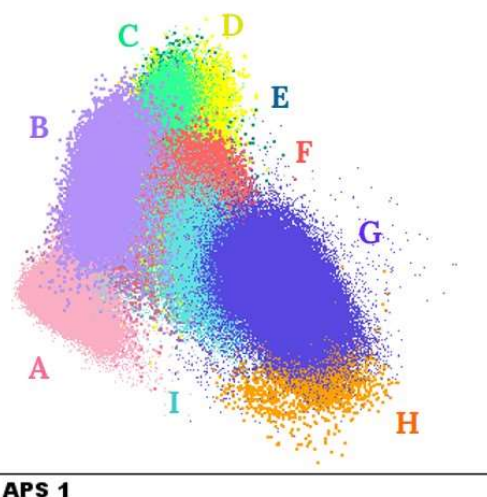


Figura 1. Visualización de las poblaciones celulares estudiadas. Automated Population Separator (APS). A= Linfocitos T CD4+, B= linfocitos T CD8+, C= células NK, D= linfocitos B, E= plasmablastos, F= basófilos, G= neutrófilos, H= eosinófilos, I= monocitos.

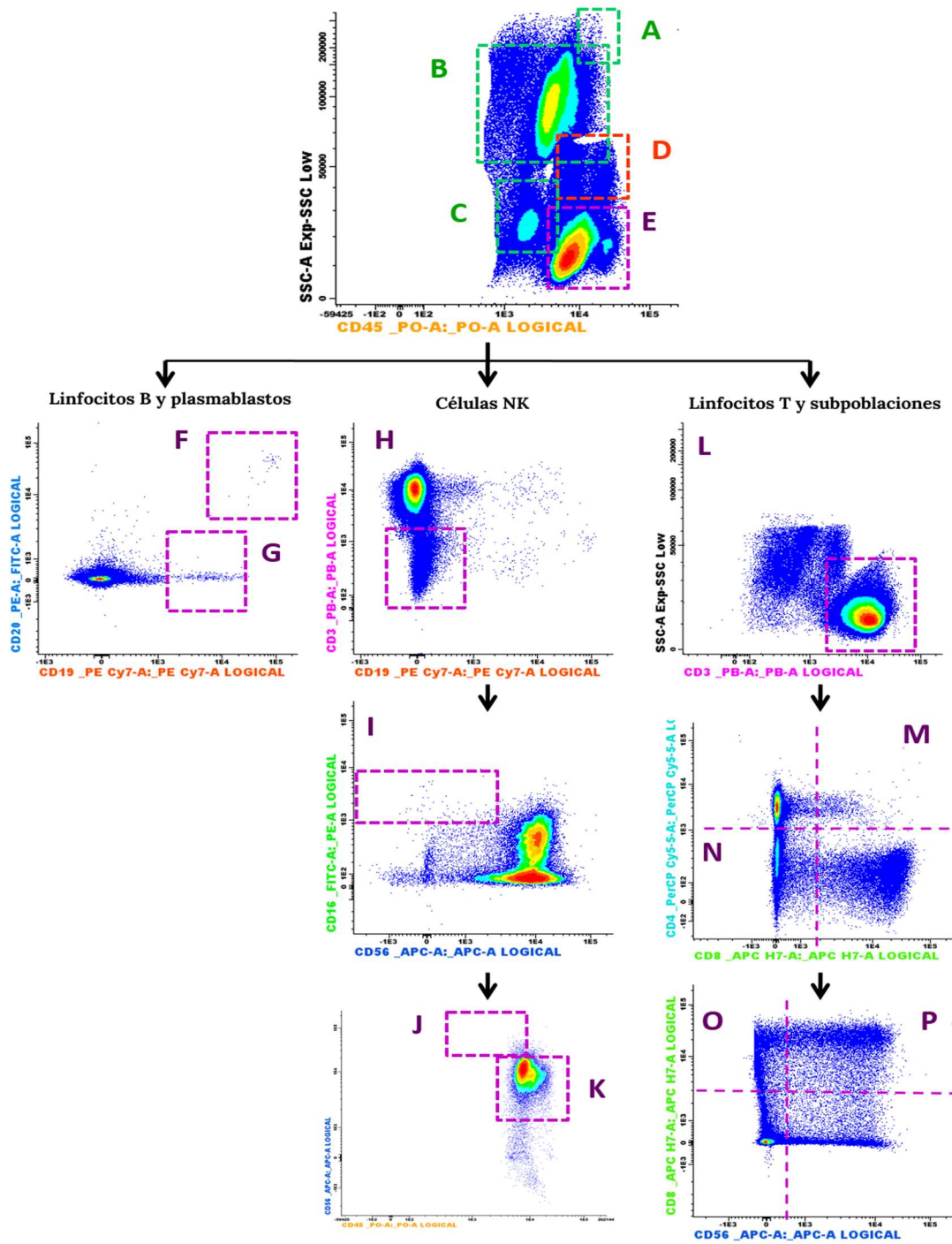


Figura 2. Tras la identificación y eliminación de debris, dobletes y marcajes inespecíficos mediante CD45⁻ vs SSC y FSC-H vs FSC-A, se determinaron las poblaciones de granulocitos usando CD45, CD16 y CD56, **A**= eosinófilos, **B**= neutrófilos, **C**= basófilos. Los monocitos (**D**) se identificaron con el marcador CD45⁺ y CD56⁻, posteriormente se subdividieron en monocitos clásicos y no clásicos usando el marcador CD16. Se identificaron las células maduras (**E**) usando CD45⁺ vs SSC, tras lo cual se identificó la población de linfocitos B (**F**) y plasmablastos (**G**) usando CD19 vs CD20. Las células NK se identificaron usando CD3 vs CD19. Las células NK CD56⁻ CD16⁺ (**I**) fueron identificadas con los marcadores correspondientes. Las NK inmunorreguladoras (**J**) y citotóxicas (**K**) fueron identificadas usando CD56 vs CD45. Finalmente, los linfocitos T se identificaron usando CD3 (**L**) y fueron posteriormente subclasificados en doblepositivos (**M**) y doblenegativos (**N**) usando CD4 vs CD8. Los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ fueron subclasificados de acuerdo a su expresión de CD56 en CD56⁺ (**P**) o CD56⁻ (**O**).

5.1 Creación de la base de datos

La recopilación de los datos obtenidos de cada caso se realizó de forma pseudoanonimizada en una plantilla diseñada para la investigación usando FileMaker Pro Advanced (versión 16.0) y fue posteriormente exportada a un archivo de Microsoft Excel (versión 19.0).

5.2 Análisis estadístico

El análisis estadístico se llevó a cabo usando el software SPSS Statistics (versión 23.0, IBM).

Se usó la prueba de Kolomogorov-Smirnof para comprobar la distribución normal de la muestra. Se observó que la muestra no cumplía con los criterios de normalidad y homocedasticidad para ser considerada paramétrica; por lo que los análisis siguientes se realizaron con estadística no paramétrica.

Las correlaciones entre variables se realizaron mediante la U de Mann Whitney cuando se trataba de una variable categórica y una numérica, la correlación de Spearman cuando se trataba de dos variables numéricas y la chi cuadrada en caso de dos variables categóricas. Se consideró una correlación estadísticamente significativa cuando el p valor era <0.05 . El tamaño del efecto se calculó mediante el coeficiente de Phi ó V de Cramer (según se tratase de variables categóricas de dos o más niveles, respectivamente) y la g de Hedges. Se consideró un tamaño del efecto pequeño <0.5 ; mediano $\geq 0.51-0.79$ y grande ≥ 0.8 .

Para la creación del modelo predictivo de neutropenia febril, se tomaron las cinco variables con mayor significación estadística y mayor tamaño del efecto y se incorporaron a un modelo de regresión logística binaria de tipo “hacia atrás” por razón de verosimilitud. Las variables con un estadístico de Wald menores a la unidad y/o con un valor de p no significativo, fueron descartadas en cada uno de los pasos.

El potencial predictivo del modelo se evaluó usando la N cuadrada de Nagelkerke.

6. RESULTADOS

6.1 Características de la serie global

Entre septiembre de 2020 y mayo de 2021, se identificaron 41 pacientes hemato-oncológicos y oncológicos con neutropenia febril diagnosticados en el Área Sanitaria IV del Principado de Asturias. Los pacientes que no hubieren recibido terapia antitumoral previa a la presentación del episodio de neutropenia febril, fueron excluidos (n=6). De forma similar, se identificaron 65 pacientes hemato-oncológicos y oncológicos con neutropenia sin fiebre (controles). Se realizó un inmunofenotipaje mediante citometría de flujo y se evaluaron variables clínicas y bioquímicas obtenidas a través de la historia clínica electrónica. Se dio seguimiento al episodio de neutropenia por una media de 42 días.

En lo que respecta a la terapia antitumoral, los pacientes con neutropenia febril se encontraban recibiendo regímenes terapéuticos de riesgo alto para desarrollar neutropenia febril casi dos veces más que el grupo con neutropenia sin fiebre (p=0.004) y, al momento del estudio, estaban recibiendo su primer ciclo de quimioterapia con una incidencia 3.7 veces mayor que la del grupo control (p=0.014). Las características clínicas y epidemiológicas de los grupos se resumen en la [Tabla 1](#).

Tabla 1. Caracterización epidemiológica de los grupos (n, media y rango)

Variable	Grupo		p valor	Phi/ V de Cramer
	Casos	Controles		
Participantes	n=35	n=65		
Edad (años)	56.4 (0-78)	58.6 (0-79)	0.701	
Género			0.139	0.156
	<u>Hombres</u>	n=18		
	<u>Mujeres</u>	n=17		
Tipo de neoplasia				
	<u>Hemato-linfoide</u>	n=30 (86%)	n= 19 (29%)	0.000
	<u>Sólida</u>	n=5 (14%)	n=46 (71%)	0.539
Riesgo del régimen quimioterapéutico para desarrollar neutropenia febril (NCCN)			0.004	0.329
	<u>Bajo</u>	n=2 (6%)	n=7 (11%)	
	<u>Intermedio</u>	n=5 (14%)	n=28 (43%)	

<u>Alto</u>	n=28 (80%)	n=30 (46%)		
Presentación de la neutropenia en el primer ciclo de quimioterapia	n=8 (23%)	n=4 (6%)	0.014	0.245

Tras contrastar las variables de interés clínico, se encontró que algunas variables vinculadas con el estado actual del paciente se correlacionaban con la presentación de neutropenia febril (Tabla 2). Se observó que los pacientes con neutropenia febril se encontraban hospitalizados al momento de obtención de la muestra casi dos veces más que el grupo control ($p=0.006$) y que la carga de la enfermedad era 2 y 4 veces más frecuentemente moderada y grave; respectivamente, en el grupo de neutropenia febril que en el grupo de neutropenia sin fiebre; que presentaba una carga de la enfermedad predominantemente leve ($p=0.005$).

También se encontró correlación entre el antecedente de uso de antibiótico (definido como el uso de antibiótico por cualquier causa en los últimos 30 días) y el presentar neutropenia febril; los pacientes de este último grupo tuvieron un antecedente 2.2 veces mayor de uso de antibiótico que el grupo control ($p= 0.000$).

Tabla 2. Correlación de las variables clínicas con el estatus caso/control

Variable	Grupo		p valor	Phi / V de Cramer
	Casos	Controles		
Paciente hospitalizado al momento de adquisición de la muestra	n= 22 (63%)	n= 21 (32%)	0.006	0.294
Carga de la enfermedad			0.005	0.331
<u>Leve</u>	n= 18 (51%)	n= 53 (82%)		
<u>Moderada</u>	n= 9 (26%)	n= 8 (12%)		
<u>Severa</u>	n= 7 (20%)	n= 3 (5%)		
Antecedente de uso de antibiótico en los últimos 30 días	n= 25 (71%)	n= 21 (32%)	0.000	0.374

6.2 Variables clásicas

Los valores de la serie blanca del hemograma también mostraron tener diferencias significativas entre los grupos, según se detalla en la Tabla 3.

En términos generales, se hace evidente que el grupo de los controles presenta más celularidad que el grupo de los casos: el recuento total de leucocitos tuvo una mediana seis veces mayor en los pacientes sin fiebre ($p= 0.000$). Dentro de las

poblaciones analizadas en el hemograma; los neutrófilos destacan por la abismal diferencia entre grupos: los pacientes con fiebre tienen una mediana 31 veces menor que los pacientes control, aunque en todos los casos, se encontraban en rango de neutropenia grado 2. Esta diferencia demostró ser estadísticamente significativa ($p=0.000$) y tener un tamaño del efecto grande (g de Hedges= 1.158). Las diferencias en los valores de la población de monocitos entre los grupos, aunque significativas ($p=0.010$); tuvieron un tamaño del efecto pequeño (g de Hedges=0.431).

Tabla 3. Contraste de los valores del hemograma entre los grupos

	Estatus				U	P valor	G de Hedges
	Caso		Control				
	Mediana	Desv. estándar	Mediana	Desv. estándar			
Leucocitos	310	966	2030	1497	525	0.000	0.860
Neutrófilos	20	267	650	353	668.5	0.000	1.158
Monocitos	20	322	260	219	448	0.010	0.431

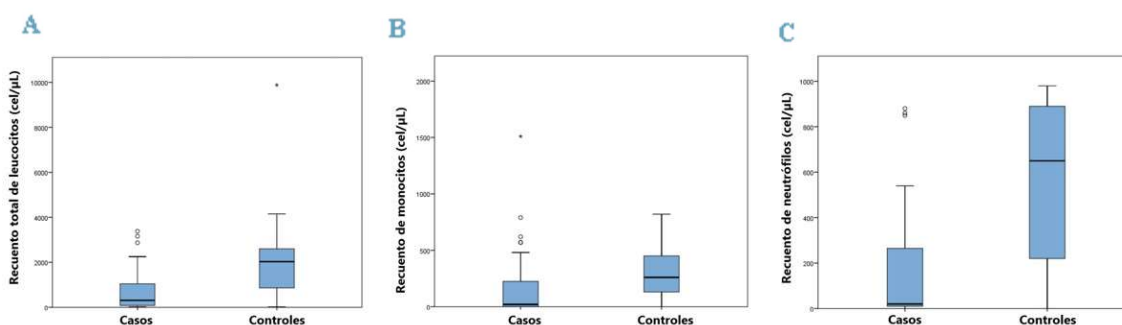


Figura 3. Representación en box-plots de las diferencias observadas en el hemograma de ambos grupos de estudio. En todos los diagramas, se observa una menor celularidad en el grupo de los casos; especialmente notoria en el caso de los neutrófilos.

A: Leucocitos, **B:** Monocitos, **C:** Neutrófilos.

Otras variables como el género, la frecuencia cardiaca, la tensión arterial, la glucemia, la proteína C reactiva, la procalcitonina, el régimen terapéutico de primera línea, la administración profiláctica de G-CSF, el antecedente de uso de esteroides y el día de resolución de la neutropenia; también fueron evaluadas sin que se demostrara correlación con el estatus caso/control.

6.3 Los pacientes con neutropenia febril presentan una mayor disfunción inmunológica que aquellos con neutropenia sin fiebre

Por otra parte, 18 de las 20 poblaciones celulares identificadas mediante citometría de flujo mostraron correlacionarse con el estatus caso/control (Tabla 4).

Tabla 4. Diferencias en las poblaciones leucocitarias entre los grupos

	Estatus				U	P valor	G de Hedges
	Caso		Control				
	Mediana	Desv. estándar	Mediana	Desv. estándar			
Linfocitos T	126.14	362.06	737.84	613.44	523	0.000	0.888
Linf. T doblepositivos	.57	6.04	3.94	5.61	560	0.000	0.532
Linf. T doblenegativos	2.86	12.27	12.10	31.96	669	0.001	0.520
T CD4+	85.50	218.28	472.16	351.66	546	0.000	0.891
T CD4+ 56+	1.19	4.82	2.35	21.39	870.5	0.054	0.417
TCD4+ 56-	83.60	215.95	412.16	345.99	535	0.000	0.888
TCD8+	38.72	138.08	204.75	316.81	543.5	0.000	0.687
TCD8+ 56+	4.59	36.55	32.62	73.67	719	0.002	0.437
T CD8+ 56-	31.68	107.94	168.63	256.78	524.5	0.000	0.723
Linfocitos B	2.42	70.24	44.16	550.01	743	0.004	0.216
Monocitos	19.22	195.06	265.62	198.87	593.5	0.000	0.784
Monocitos clásicos	12.67	172.61	230.40	157.43	640	0.000	0.707
Monocitos no clásicos	.06	37.06	36.00	65.37	525	0.000	0.695
Células NK	8.33	51.62	69.85	140.27	623.5	0.000	0.604
NK inmunorreguladoras	.14	2.49	.00	2.41	737	0.002	0.158
NK citotóxicas	.55	3.30	1.00	9.40	953	0.182	0.127
NK CD56- CD16+	.01	16.66	24.60	113.08	428.5	0.000	0.738
Basófilos	2.44	239.89	20.35	84.38	753.5	0.006	0.243
Neutrófilos	30.72	281.02	618.20	361.17	491	0.000	1.069
Eosinófilos	1.92	22.89	21.75	42.16	429	0.000	0.759

Resulta llamativa la diferencia -casi seis veces menor- en el número de linfocitos T en los pacientes con neutropenia febril con respecto a los controles. Esta diferencia se traslada a las subpoblaciones de linfocitos T helper y de linfocitos T citotóxicos; en cada una de las cuales, los pacientes con neutropenia febril presentan cinco veces menos celularidad que los pacientes con neutropenia sin fiebre.

Tabla 5. Matriz de correlación entre variables. Coeficiente de correlación destacado por colorimetría

	Linfocitos T	Linf T doble positivos	Linf T doble negativos	Linf T CD4+	Linf T CD4+ 56+	Linf T CD4+ 56-	Linf T CD8+	Linf T CD8+ 56+	Linf T CD8+ 56-	Linfocitos B	Monocitos	Monocitos clásicos	Monocitos no clásicos	Células NK	NK inmunoreg	NK citotóxicas	NK CD56- CD16+	Basófilos	Neutrófilos	Eosinófilos
Linfocitos T	1.0	.891	.861	.966	.706	.981	.946	.849	.935	.804	.797	.781	.623	.799	.099	.580	.644	.722	.762	.693
Linfocitos T doble positivos	.891	1.0	.751	.877	.687	.878	.855	.731	.862	.699	.741	.733	.564	.712	.109	.513	.569	.677	.645	.615
Linfocitos T doble negativos	.861	.751	1.0	.819	.671	.816	.846	.802	.833	.704	.718	.693	.589	.744	.002	.578	.545	.678	.653	.659
Linf T CD4+	.966	.877	.819	1.0	.679	.997	.847	.800	.835	.790	.774	.756	.631	.751	.115	.532	.630	.696	.743	.657
Linf T CD4+ 56+	.706	.687	.671	.679	1.0	.655	.686	.732	.662	.615	.508	.507	.397	.631	.056	.464	.425	.549	.464	.475
Linf T CD4+ 56-	.961	.878	.816	.997	.655	1.0	.839	.783	.830	.785	.773	.754	.636	.747	.110	.527	.630	.692	.747	.658
Linf T CD8+	.946	.855	.846	.847	.686	.839	1.0	.833	.982	.737	.766	.748	.582	.798	.077	.603	.617	.722	.724	.684
Linf T CD8+ 56+	.849	.731	.802	.800	.732	.783	.833	1.0	.774	.776	.735	.749	.503	.863	.073	.693	.539	.762	.748	.671
Linf T CD8+ 56-	.935	.862	.833	.835	.662	.830	.992	.774	1.0	.712	.753	.730	.581	.754	.100	.567	.613	.690	.697	.666
Linfocitos B	.804	.699	.704	.790	.615	.785	.737	.776	.712	1.0	.709	.707	.477	.765	.012	.639	.506	.725	.703	.559
Monocitos	.797	.741	.718	.774	.508	.773	.766	.735	.753	.709	1.0	.973	.696	.770	.058	.604	.639	.795	.724	.706
Monocitos clásicos	.781	.733	.693	.756	.507	.754	.748	.749	.730	.707	.973	1.0	.563	.738	.050	.665	.526	.800	.699	.682
Monocitos no clásicos	.623	.564	.589	.631	.397	.636	.582	.503	.581	.477	.696	.563	1.0	.589	.523	.125	.898	.546	.605	.616
Células NK	.799	.712	.744	.751	.631	.747	.798	.863	.754	.765	.770	.738	.589	1.0	.003	.726	.687	.787	.752	.703
NK inmunoreg	.099	.109	.002	.115	.056	.110	.077	.073	.100	.012	.058	.050	.523	.003	1.0	.475	.522	.006	.085	.217
NK citotóxicas	.580	.513	.578	.532	.464	.527	.603	.693	.567	.639	.604	.665	.125	.726	.475	1.0	.161	.642	.531	.481
NK CD56- CD16+	.644	.569	.545	.630	.425	.630	.617	.539	.613	.506	.639	.526	.898	.687	.522	.161	1.0	.557	.649	.642
Basófilos	.722	.677	.678	.696	.549	.692	.722	.762	.690	.725	.795	.800	.546	.787	.006	.642	.557	1.0	.723	.615
Neutrófilos	.762	.645	.653	.743	.464	.747	.724	.748	.697	.703	.724	.699	.605	.752	.085	.531	.649	.723	1.0	.726
Eosinófilos	.693	.615	.659	.657	.475	.658	.684	.671	.666	.559	.706	.682	.616	.703	.217	.481	.642	.615	.726	1.0

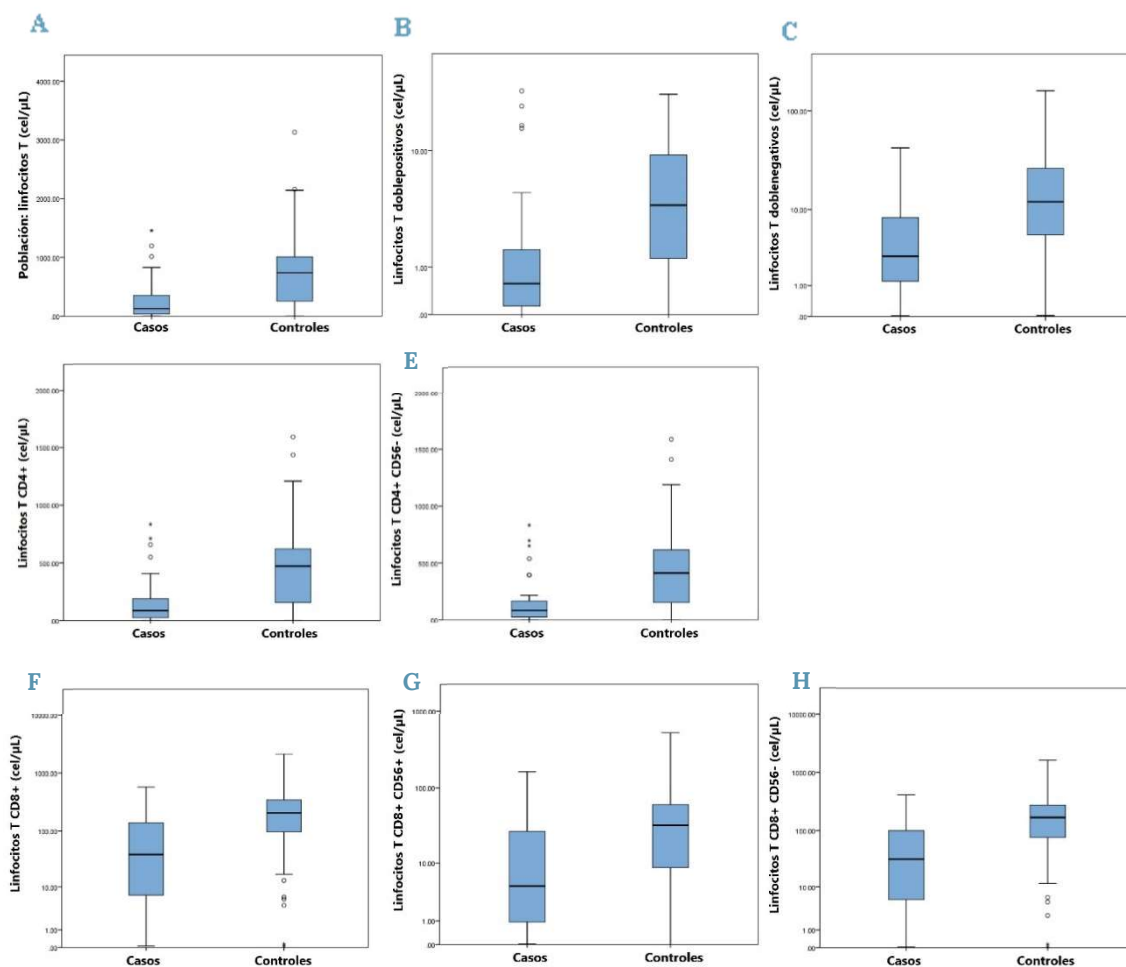


Figura 4. Representación en box-plots de los recuentos de las poblaciones y subpoblaciones de linfocitos T identificadas mediante citometría de flujo que demostraron correlacionarse con el estatus caso/control con una significación <0.05 . Se observa una menor celularidad en todas las poblaciones en el grupo de los casos.

A: Linfocitos T, **B:** Linfocitos T CD4+ CD8+, **C:** Linfocitos T CD4- CD8-, **D:** Linfocitos T CD4+, **E:** Linfocitos T CD4+ CD56-, **F:** Linfocitos T CD8+, **G:** Linfocitos T CD8+ CD56+, **H:** Linfocitos T CD8+ CD56-

La relevancia estadística de estos hallazgos se ve reflejada en el hecho de que en todas las subpoblaciones de linfocitos T (exceptuando los linfocitos T CD4+ CD56+ y los linfocitos T CD8+ CD56+), se encontraron diferencias estadísticamente significativas con tamaños del efecto medianos y grandes de acuerdo con la *g* de Hedges.

Otra población en la que se observaron diferencias destacables entre ambos grupos es la de los monocitos. Se observó que los pacientes con neutropenia sin fiebre tienen cerca de catorce veces más monocitos que los pacientes con neutropenia febril y que la mayor parte de esta diferencia es explicada por la subpoblación de

monocitos clásicos; en la que la significación estadística tuvo un tamaño del efecto mediano.

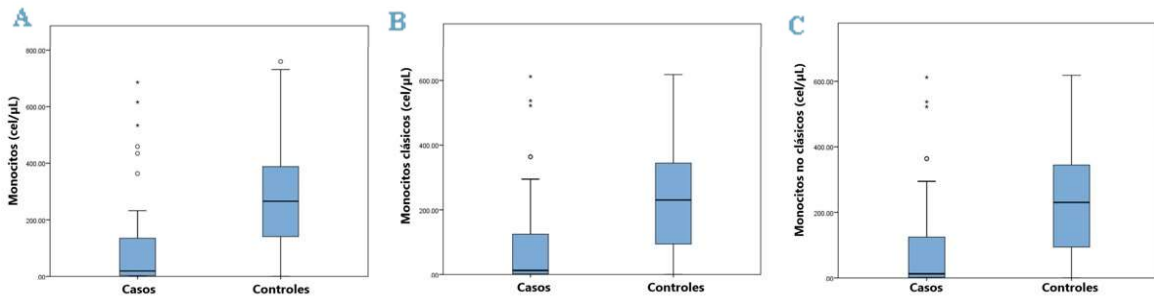


Figura 5. Representación en box-plots de los recuentos de las poblaciones y subpoblaciones de monocitos identificadas mediante citometría de flujo que demostraron una correlación con significación <0.05 con el estatus caso/control. Se observa una menor celularidad en todas las poblaciones en el grupo de los casos.

A: Monocitos totales, **B:** Monocitos clásicos, **C:** Monocitos no clásicos

Las células NK, por otra parte, fueron más de ocho veces más abundantes en el grupo control que en el grupo de pacientes con neutropenia febril; diferencia que predomina en la subpoblación de células NK CD56- CD16+ y que presenta un tamaño de efecto mediano. Aunque se observan diferencias en todos los estadios madurativos de NKs.

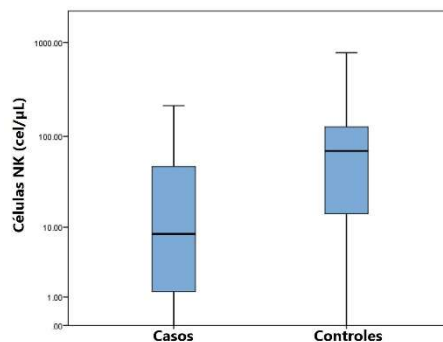


Figura 6. Representación en box-plot del recuento de células NK identificadas mediante citometría de flujo; población que demostró una correlación con el estatus caso/control con significación igual a 0.000. Se observa una menor celularidad en el grupo de los casos.

Finalmente, los granulocitos presentaron diferencias estadísticamente significativas entre los casos y los controles. De especial interés es la observación de que a pesar de que ambos grupos presentaban neutropenia al momento del estudio, el grupo de pacientes con neutropenia sin fiebre tenía cerca de veinte veces más neutrófilos que

el grupo de pacientes con neutropenia febril; y fue esta población de leucocitos la que presentó el tamaño de efecto más grande ($g= 1.069$) de todas las poblaciones en las que se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

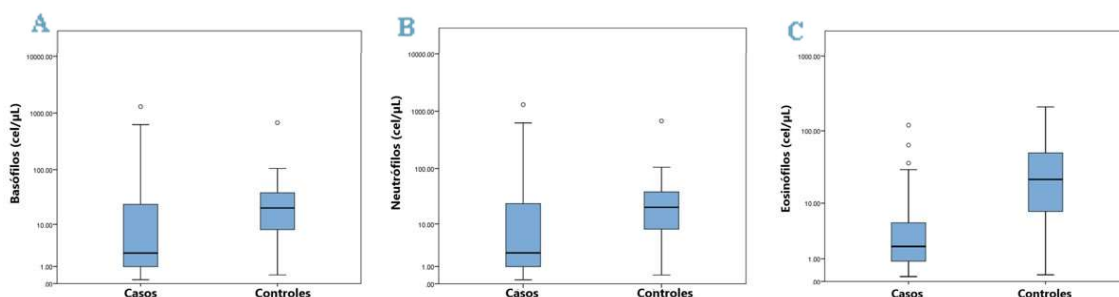


Figura 7. Representación en box-plots de los recuentos de los granulocitos identificados mediante citometría de flujo. Todas las poblaciones de granulocitos demostraron correlacionarse con el estatus caso/control con una significación <0.05 . Se observa una menor celularidad en todas las poblaciones en el grupo de los casos.

A: Monocitos totales, **B:** Monocitos clásicos, **C:** Monocitos no clásicos

6.4 Los pacientes con desenlace fatal presentaban recuentos celulares notablemente inferiores en diversas poblaciones de leucocitos en comparación con los pacientes sobrevivientes

Posteriormente, se evaluó la correlación de diversas variables con el desenlace final de los pacientes; para lo cual se establecieron dos grupos: vivos ($n=93$) y muertos ($n=7$).

En el ámbito clínico; se observó que los pacientes con desenlace fatal habían recibido antibiótico en el último mes con una frecuencia casi dos veces mayor que el grupo de los supervivientes ($p=0.029$). Además, el 71.43% de los pacientes con desenlace fatal recibió esteroides en el último mes; frente a sólo el 15% de los pacientes supervivientes ($p=0.000$). Como era esperable, se observó que los pacientes con desenlace fatal presentaban, al momento del estudio, una carga de la enfermedad catalogada como “severa” con una frecuencia cinco veces mayor que los supervivientes; grupo en el que predominó una carga “leve” ($p=0.001$) (Tabla 6).

Tabla 6. Correlación de las variables clínicas con el estatus vivo/muerto

Variable	Grupo		P valor	Phi / V de Cramer
	Vivos	Muertos		
Antecedente de uso de antibiótico en los últimos 30 días	40 (43%)	6 (86%)	0.029	0.219
Antecedente de uso de esteroides en los últimos 30 días	14 (15%)	5 (71%)	0.000	0.367
Carga de la enfermedad			0.001	0.381
<u>Leve</u>	70 (75%)	1 (14%)		
<u>Moderada</u>	14 (15%)	3 (43%)		
<u>Severa</u>	7 (8%)	3 (43%)		

En cuanto a las pruebas bioquímicas, se encontraron diferencias en los valores de glucemia entre los vivos y los muertos ($107.5 \pm 40.03\text{mg/dl}$ contra 165.29 ± 57.52 , respectivamente; $p=0.013$).

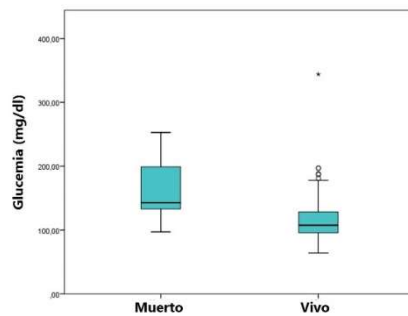


Figura 8. Representación en box-plot de las cifras de glucemia observadas en ambos grupos al momento de adquisición de la muestra. Se observan cifras mayores en el grupo de los pacientes con desenlace fatal.

El recuento total de leucocitos en el hemograma mostró valores casi cinco veces menores en los muertos que en los vivos (mediana de 1490 ± 1456 células por microlitro en los vivos contra 323 ± 281 en los muertos); observándose una correlación con un p valor=0.012. Otros parámetros como el recuento de monocitos y neutrófilos fueron evaluados sin encontrarse correlación ($p=0.051$ y $p=0.091$; respectivamente).

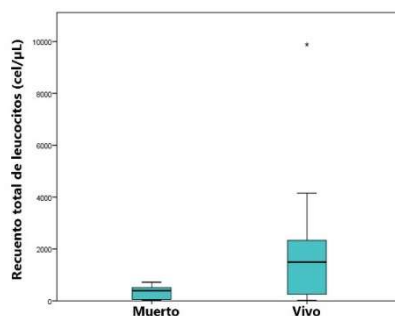


Figura 9. Representación en box-plot de los leucocitos reportados en el hemograma. El recuento total de leucocitos fue el único parámetro del hemograma que demostró correlacionarse con el estatus vivo/muerto ($p=0.012$). Se observan cifras menores en los pacientes con desenlace fatal.

Otras variables como la edad, la proteína C reactiva, la procalcitonina, el ser portador de catéter venoso central, el antecedente de uso de antibióticos, el encontrarse hospitalizado, la administración profiláctica de G-CSF, la quimioterapia de inducción, el riesgo del régimen antineoplásico para generar neutropenia febril, el estar recibiendo quimioterapia de primera línea y el día de resolución de la neutropenia; fueron evaluadas sin que se evidenciara correlación con el desenlace final.

En lo que respecta a las poblaciones celulares analizadas mediante citometría de flujo, 11 poblaciones demostraron correlacionarse con el desenlace final; según se detalla en la [Tabla 7](#).

Tabla 7. Diferencias en las poblaciones leucocitarias entre los vivos y los muertos

	Estatus				U	P valor	G de Hedges
	Muertos		Vivos				
	Mediana	Desv. estándar	Mediana	Desv. estándar			
Linfocitos T	28.80	96.08	456.96	588.70	110	0.004	0.940
Linf. T doblepositivos	.14	.51	2.41	6.01	106	0.003	0.819
Linf. T doblenegativos	.79	5.19	8.53	28.24	156	0.022	0.547
T CD4+	21.60	23.88	247.68	338.73	84	0.001	1.032
T CD4+ 56+	.21	2.13	1.88	18.33	168	0.033	0.412
TCD4+ 56-	21.60	22.27	243.60	333.66	83	0.001	1.020
TCD8+	13.20	79.55	176.64	287.62	147.5	0.016	0.639
TCD8+ 56+	1.75	18.47	22.88	66.07	186	0.059	0.502
T CD8+ 56-	11.60	73.09	131.04	233.39	145.5	0.015	0.644
Linfocitos B	2.62	8.21	19.97	462.46	223	0.166	0.224
Monocitos	58.05	60.03	220.80	212.38	182	0.053	0.860
Monocitos clásicos	58.05	60.05	166.37	173.29	194	0.076	0.802
Monocitos no clásicos	.02	.05	4.44	61.22	120.5	0.005	0.711
Células NK	3.17	16.93	52.44	124.67	186	0.059	0.595

NK inmunorreguladoras	.22	1.66	.99	8.09	206	0.083	0.026
NK citotóxicas	.79	1.38	.00	2.50	316.5	0.903	0.194
NK CD56- CD16+	.00	.01	2.78	99.73	98.5	0.002	0.556
Basófilos	2.43	2.40	17.75	162.50	171	0.037	0.317
Neutrófilos	132.21	174.43	339.57	379.60	198	0.085	0.789
Eosinófilos	4.85	6.45	15.96	39.81	225	0.175	0.587

Destacan por su notoriedad, las diferencias en el número total de linfocitos T; población en la cual los pacientes con desenlace fatal presentan casi dieciséis veces menos células que los supervivientes. Asimismo, se observó que los muertos presentaban cerca de once veces menos celularidad en la población de linfocitos T helper (diferencia casi totalmente atribuible a la subpoblación de linfocitos T CD4+ CD56-) y trece veces menos celularidad en la población de linfocitos T citotóxicos; en comparación con el grupo de supervivientes. Los linfocitos T CD4+ presentaron el tamaño de efecto más grande del estudio, con una *g* de Hedges de 1.032.

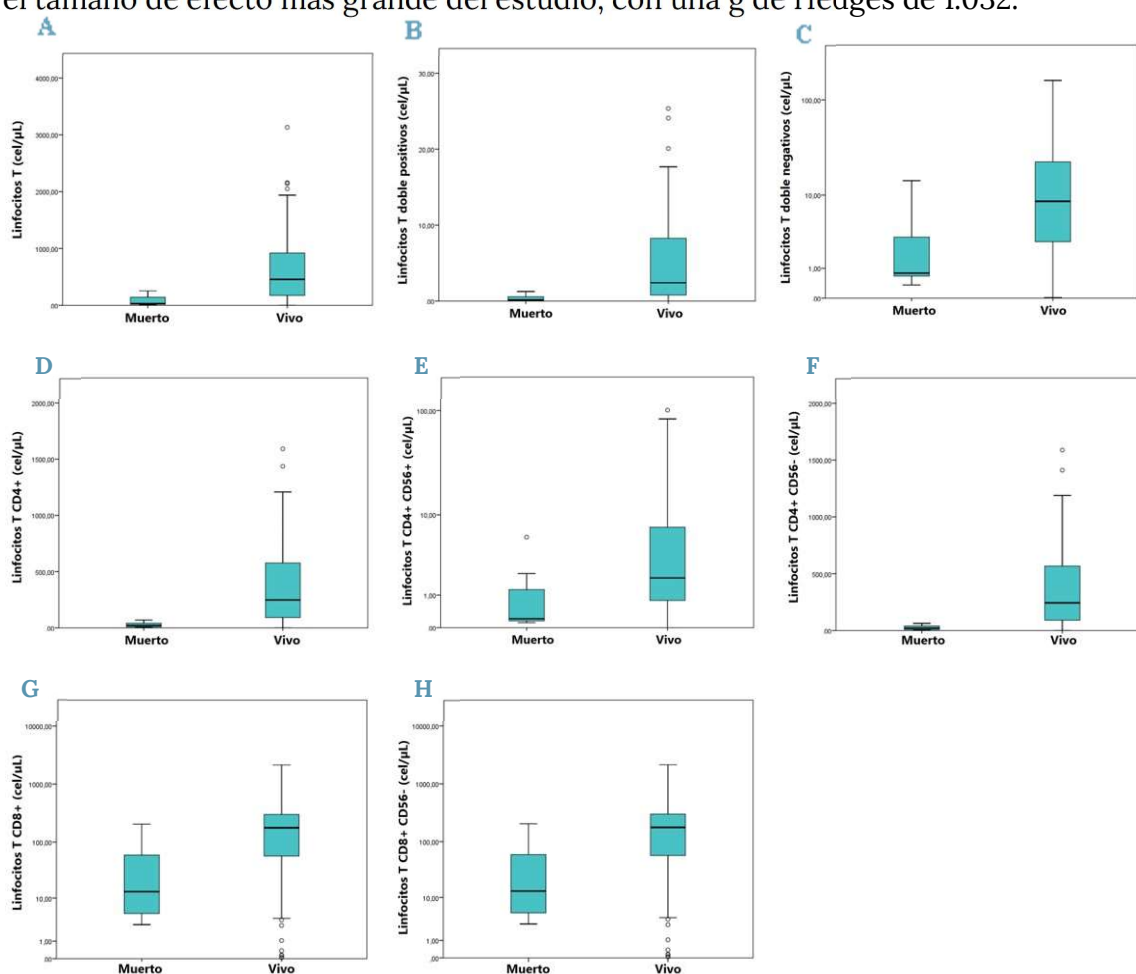


Figura 10. Representación en box-plots de los recuentos de las poblaciones y subpoblaciones de linfocitos T identificadas mediante citometría de flujo que demostraron correlacionarse con el desenlace final con una significación <0.05 . Se observa una menor celularidad en todas las poblaciones en el grupo de los muertos.

A: Linfocitos T, **B:** Linfocitos T CD4+ CD8+, **C:** Linfocitos T CD4- CD8-, **D:** Linfocitos T CD4+, **E:** Linfocitos T CD4+ CD56+, **F:** Linfocitos T CD4+ CD56-, **G:** Linfocitos T CD8+, **H:** Linfocitos T CD8+ CD56+

Igualmente destacables son las diferencias encontradas en las células del sistema fagocitario mononuclear: el grupo de los muertos presentó casi cuatro veces menos monocitos que los supervivientes. Dentro de éstos, los monocitos no clásicos llaman particularmente la atención, puesto que los supervivientes presentaron veinte veces más concentración absoluta que los pacientes con desenlace fatal.

Se observó también que la subpoblación de células NK CD56- CD16+ fue cerca de tres veces mayor en el grupo de los vivos que en el de los muertos.

Finalmente, se encontraron diferencias en la población de basófilos, que fueron más de ocho veces más abundantes en los vivos que en los muertos.

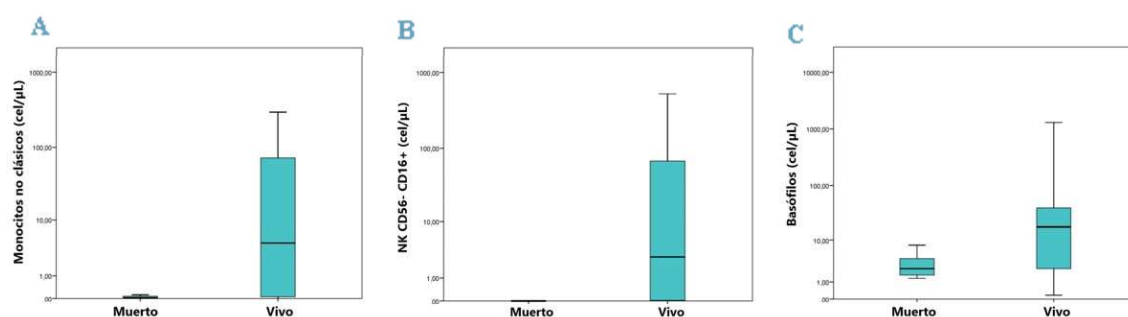


Figura 11. Representaciones en box plots de poblaciones que demostraron correlacionarse con el desenlace final con una $p < 0.05$. En todos los casos, se observa una mayor celularidad en el grupo de los vivos.

A: Monocitos no clásicos, **B:** NK CD56- CD16+, **C:** Basófilos

6.5 El puntaje del Cumulative Illness Rating Scale (CIRS) se correlaciona con la cantidad de células NK

Se buscó correlación entre el puntaje de CIRS determinado en los casos ($n=34$) y diversas variables.

Fueron evaluadas en busca de correlación con el puntaje del CIRS las 20 poblaciones determinadas en el presente estudio mediante citometría de flujo; de las cuales, sólo demostraron correlación las células NK ($p=0.034$, coeficiente de correlación=0.4) y su subpoblación de NK citotóxicas ($p=0.007$, coeficiente de correlación=0.5).

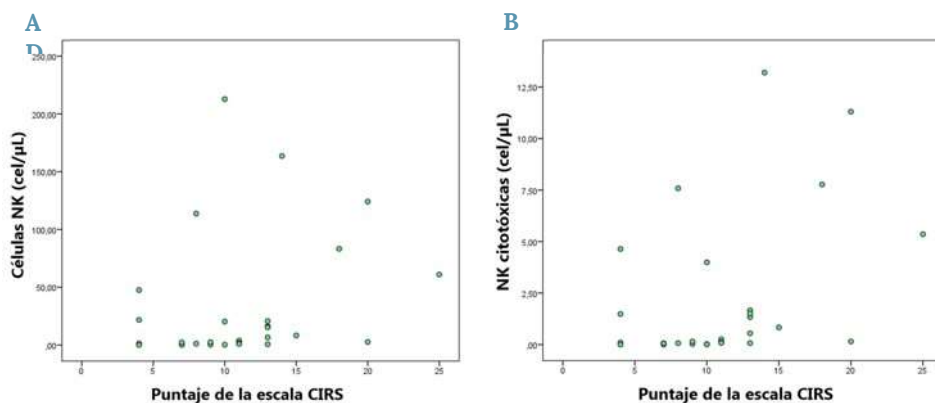


Figura 12. Correlación del CIRS con la población de células NK (A) y la subpoblación de NK citotóxicas (B) identificadas mediante citometría de flujo. Pese a que ambas poblaciones tuvieron correlaciones estadísticamente significativas ($p=0.034$ y $p=0.007$, respectivamente), presentan coeficientes de correlación muy bajos, lo que se hace evidente en los diagramas de dispersión.

También se encontró correlación entre el puntaje del CIRS y el día de resolución de la neutropenia ($p=0.025$, coeficiente de correlación= 0.44); así como con el puntaje MASCC ($p= 0.020$, coeficiente de correlación= 0.39).

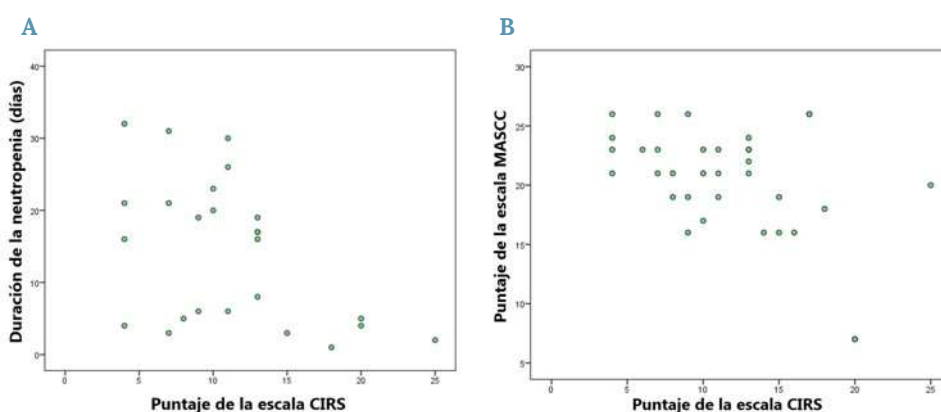


Figura 13. Correlación del CIRS con los días de duración de la neutropenia (A) y el puntaje de la escala MASCC (B). Ambas variables demostraron una correlación estadísticamente significativa ($p=0.025$ y $p=0.020$; respectivamente); aunque con coeficientes de correlación débiles.

Otras variables como el puntaje de CISNE, el recuento de leucocitos, neutrófilos y monocitos en el hemograma; los días de duración de la fiebre, la presencia de un hemocultivo positivo, la presencia de un patógeno resistente en un hemocultivo, el encontrarse hospitalizado, los días de duración de la fiebre, el día de obtención de un hemocultivo negativo y el día de resolución de la neutropenia fueron evaluadas sin que se demostrara correlación.

6.6 Las poblaciones de células del sistema fagocitario mononuclear y células NK se correlacionan con los días de duración de la fiebre en pacientes con neutropenia febril

Se buscó correlación entre los días de duración del episodio febril en los casos (n=35) y diversas variables.

El recuento de neutrófilos del hemograma mostró correlacionarse con la duración del episodio febril con un valor de $p=0.036$ (coeficiente de correlación=0.35). No se observó correlación con otros valores del hemograma.

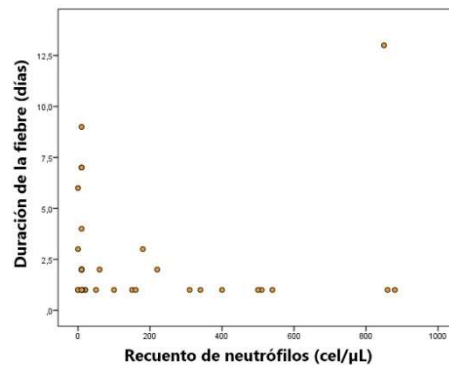


Figura 14. Los días de duración de la fiebre se correlacionan significativamente con el recuento de neutrófilos del hemograma ($p=0.036$); aunque con un coeficiente de correlación muy débil.

De las poblaciones celulares determinadas mediante citometría de flujo, sólo se observó correlación con los días de fiebre en los monocitos no clásicos ($p=0.023$; coeficiente de correlación= 0.38) y con las células NK CD56- CD16+ ($p=0.029$; coeficiente de correlación= 0.37).

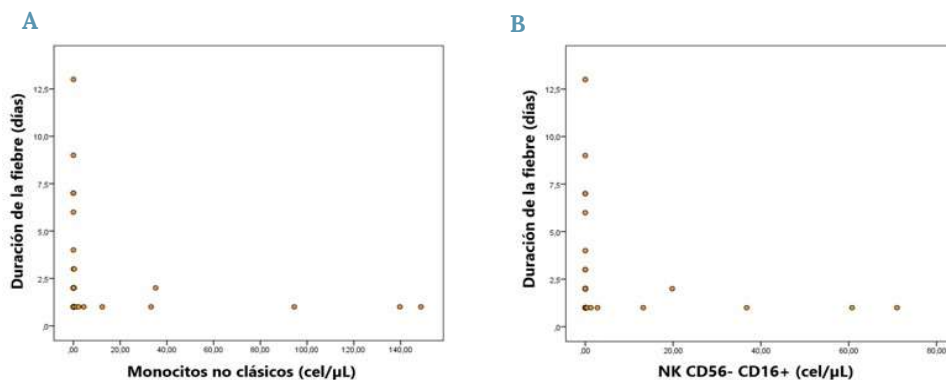


Figura 15. De las poblaciones celulares identificadas mediante citometría de flujo, únicamente los monocitos no clásicos y las células NK CD56- CD16+ demostraron una correlación significativa con los días de duración de la fiebre ($p=0.023$ y $p=0.029$); aunque con coeficientes de correlación muy bajos.

Otras variables, como el género, el antecedente de uso de antibióticos y esteroides, el tratamiento antineoplásico de primera línea, las escalas ECOG, MASCC, CISNE, la procalcitonina, la proteína C reactiva, el riesgo del esquema quimioterapéutico para generar neutropenia febril, la profilaxis con G-CSF, el encontrarse hospitalizado; entre otras, no demostraron correlacionarse con los días de duración del episodio febril.

6.7 *El recuento de neutrófilos mediante citometría de flujo es una herramienta potencialmente predictora del estatus caso/control*

Con la finalidad de valorar el potencial predictivo de las poblaciones identificadas mediante citometría de flujo que habían presentado diferencias estadísticamente significativas entre los grupos, se diseñó un modelo predictivo mediante regresión logística binaria. Debido a que el tamaño muestral de la investigación limitaba considerablemente el número de variables a incorporar al modelo, se seleccionaron las cinco variables que habían demostrado tener una correlación significativa con un tamaño del efecto mediano (g de Hedges >0.5) o grande (g de Hedges >0.8) (Tabla 8) y se aplicó un modelo de regresión logística binaria tipo “hacia atrás” por razón de verosimilitud.

Tabla 8. Variables incluidas en el modelo de regresión

Variable	P valor	G de Hedges
Linfocitos T CD4+	0.000	0.891
Monocitos	0.000	0.784
NK CD56- CD16+	0.000	0.738
Neutrófilos	0.000	1.069
Eosinófilos	0.000	0.759

La regresión demostró que los neutrófilos contabilizados a través de la citometría de flujo son capaces de predecir el 29% del estatus caso/control (R cuadrada de Nagelkerke = 0.291). Los exponenciales de B derivados de su aplicación como modelo predictor apoyan la idea de que una disminución en el recuento de neutrófilos

aumenta un 0.997 el riesgo de desarrollar fiebre en los pacientes con neutropenia post quimioterapia; no obstante, la cercanía del exponencial de B a la unidad evidencia una asociación muy leve (Tabla 9).

Tabla 9. Variables en la ecuación de regresión final

Variable	B	Error estándar	Significación	Exp (B)	CI 95% para OR	
					Inferior	Superior
Neutrófilos	0.003	0.001	0.000	0.997	0.995	0.998
Constante	0.504	0.317	0.112	1.656		

Estos resultados deberán, sin embargo, ser interpretados con discreción, puesto que el tamaño muestral de la presente investigación es relativamente pequeño y hace al modelo, poco consistente.

7. DISCUSIÓN

La neutropenia es uno de los efectos adversos más comunes de la quimioterapia, con una incidencia cercana al 50% [45] e implica, por definición, la alteración funcional del sistema inmunológico; misma que vuelve a los pacientes oncológicos vulnerables a padecer infecciones que a menudo se manifiestan como neutropenia febril.

Se sabe que la neutropenia febril condiciona un aumento de morbi-mortalidad en pacientes con cáncer [46], que afecta negativamente su calidad de vida y que aumenta importantemente los costos derivados de su atención sanitaria [47]. No obstante, a pesar de la necesidad de identificar factores que predigan, eviten o controlen la presentación de neutropenia febril, las herramientas clínicas o paraclínicas derivadas de esta línea de investigación, hasta hoy, se limitan a la estratificación de riesgo de morbi-mortalidad una vez instaurado el cuadro febril, o bien, apuntan a la administración de antibioticoterapia empírica en aquellos pacientes con sospecha clínica de riesgo para infecciones. Hasta ahora, no existe una herramienta que pueda predecir de forma objetiva y certera qué pacientes con neutropenia son más vulnerables a infectarse y desarrollar neutropenia febril.

A este respecto, la citometría de flujo ofrece una posibilidad casi inequivalente: permite la realización de un análisis complejo de diversas poblaciones celulares de forma veraz y relativamente rápida, constituyendo una de las principales técnicas para monitorizar la disfunción inmunológica de los pacientes con cáncer [48]. A pesar de esto, el potencial del inmunofenotipaje mediante citometría de flujo en el contexto de la neutropenia inducida por quimioterapia no ha sido estudiado hasta ahora. El esclarecimiento de las diferencias en las poblaciones celulares del sistema inmunológico de aquellos pacientes con neutropenia febril frente a aquellos con neutropenia que no desarrollan fiebre, es fundamental para comprender los procesos fisiopatológicos que subyacen la presentación de la neutropenia febril y podría, potencialmente, ser una valiosa herramienta predictiva para la misma.

Así, en el presente proyecto de investigación se propuso estudiar, mediante citometría de flujo, las diferencias inmunofenotípicas entre los pacientes con neutropenia post quimioterapia con y sin fiebre. Del mismo modo, se evaluaron las variables clínicas y bioquímicas comúnmente consideradas de riesgo para el desarrollo y para el pronóstico de neutropenia febril.

Primeramente, resulta llamativo que las variables clínicas analizadas presentan correlaciones muy débiles con el estatus caso/control. Por ejemplo, la carga de la enfermedad, considerada una variable pronóstica de gravedad en neutropenia febril en escalas como MASCC [31], al igual que variables como el ciclo quimioterapéutico de presentación de la neutropenia, la escala CIRS, el riesgo del régimen quimioterapéutico para el desarrollo de neutropenia febril, tuvieron correlaciones débiles; mientras que otras como el género, la edad, entre otras, demostraron no correlacionarse en absoluto. Aunque estos resultados podrían verse influenciados por el tamaño muestral, en este estudio, apoyan la idea de que existe la necesidad de buscar variables más objetivas con correlaciones más fuertes y con sentido biológico, que informen sobre estrategias para mitigar la enfermedad.

El primer indicio de que existen diferencias considerables a nivel inmunológico entre los pacientes con y sin fiebre, lo observamos en los resultados del hemograma, especialmente con los neutrófilos, que tuvieron menor concentración en el grupo de los casos. Este resulta un hallazgo de considerable interés y probablemente, una de las piezas clave de este estudio, especialmente si consideramos que ambos grupos son conformados por pacientes con cáncer que han recibido quimioterapia y, sobre todo, que ambos tienen neutropenia, puesto que sugiere la existencia de diferencias significativas en las poblaciones leucocitarias entre los grupos, mismas que condicionan un desempeño inmunológico subóptimo en aquellos pacientes que acaban desarrollando neutropenia febril.

El conteo diferencial de leucocitos del hemograma es, sin embargo, una técnica diagnóstica con numerosas limitaciones: por un lado, la realización del conteo manual es lenta, poco reproducible al depender completamente del examinador y precaria en la distinción de células con base en diferencias cualitativas [49]; por otro lado -y especialmente importante por el tipo de pacientes a estudiar en este caso-,

el conteo manual diferencial de leucocitos es particularmente impreciso en pacientes con leucopenia como consecuencia de un número escaso de células en cada muestra [50,51]. Así, resulta ser un método insuficiente para la caracterización fiable y completa de las poblaciones inmunológicas de los pacientes con neutropenia.

La citometría de flujo, por otro lado, permite la identificación rápida de poblaciones leucocitarias, y la determinación de sus estadios madurativos con base en su expresión de diversos clusters de diferenciación [52]. Constituye un pilar clave en la monitorización de la disfunción inmunológica de los pacientes con cáncer con fines diagnósticos, pronósticos e incluso terapéuticos al ser capaz de medir la frecuencia y función de las células efectoras y supresoras (incluyendo T reguladoras, células supresoras derivadas de mieloides, macrófagos asociados a tumor, entre otras) en sangre periférica y tejidos tumorales [48].

Aunque tradicionalmente su utilidad en la evaluación de las deficiencias inmunológicas se limitaba a la medición de la concentración de células supresoras, las mejoras recientes en las técnicas de gateo y en los sets de marcadores hacen posible la determinación funcional de las células supresoras mediante citometría de flujo, permitiendo la tan necesaria determinación de la correlación fenotipo-función. Kotsakis et al y Huang et al, por ejemplo, han evaluado exitosamente la función de las células supresoras derivadas de tumor en pacientes con carcinoma de cabeza y cuello, melanoma y carcinoma microcítico de pulmón a través de la determinación de especies reactivas de oxígeno por citometría de flujo usando el marcador diclorodihidrofluoresceinadiacetato (DCFDA), que es sensible a oxidación [53,54]. Más recientemente, Reiné et al lograron evaluar mediante citometría de flujo la función fagocítica de los neutrófilos usando gránulos reporter intrafagosomales [55,56]. En el propio laboratorio de citometría de flujo del HUCA, de forma reciente se han demostrado diferencias en el infiltrado inmunológico entre distintos tumores (datos sin publicar).

Así, queda en evidencia que la citometría de flujo es un recurso que no debe pasarse por alto en la evaluación de la inmunidad de los pacientes con cáncer. Al no existir precedentes en la evaluación inmunofenotípica de los pacientes con neutropenia

post quimioterapia, el presente estudio se limitó a la evaluación de la concentración celular. La combinación de anticuerpos monoclonales utilizada en este proyecto es capaz de identificar con claridad 20 poblaciones celulares.

Como era esperable, la caracterización inmunológica realizada a través de citometría de flujo, evidenció numerosas diferencias entre los casos y los controles. Entre ellas, destacan los linfocitos T y sus subpoblaciones, particularmente los linfocitos T CD4+. Los linfocitos constituyen la piedra angular de la respuesta inmunológica adaptativa; concretamente, los linfocitos T CD4+ también llamados “T helper”, participan en la respuesta inmunológica coordinando la movilización de una gran variedad de tipos celulares, como otros linfocitos y células inmunológicas maduras; aunque también actúan sobre tipos celulares no inmunológicos, como el epitelio, con el objetivo de eliminar al patógeno en cuestión [57].

Aunado a esto, los linfocitos T CD8+, también llamados “T citotóxicos”, también presentaron recuentos muy inferiores en los pacientes con fiebre. Los linfocitos T citotóxicos participan en la respuesta inmunológica mediante la eliminación directa de las células infectadas [58]; así, el hecho de que los pacientes con neutropenia febril hayan tenido conteos mucho menores de células T helper y citotóxicas, hace evidente que presentaban una vulnerabilidad inmunológica ante los patógenos derivada del compromiso de su sistema inmunológico adaptativo. Esta misma vulnerabilidad se manifiesta cuando comparamos el inmunofenotipaje de los pacientes vivos contra los muertos, donde aquellos con desenlace fatal presentaban recuentos de linfocitos T muy inferiores a los de los pacientes supervivientes.

Además de la clara disfunción inmunológica que deriva de la disminución de la concentración de linfocitos T, es crucial considerar otras posibilidades que podrían empeorar el rendimiento inmunológico comprometiendo la funcionalidad de las células remanentes; en concreto, sería interesante estudiar si existe extenuación de los linfocitos T, definidos como linfocitos que pese a encontrarse presentes en un tejido –en mayor o menor concentración– han perdido sus funciones efectoras, específicamente, perdiendo su potencial proliferativo, expresando desreguladamente receptores de inhibición (expresados de forma natural como mecanismo regulador inmunológico para prevenir la inmunopatología y/o la

autoinmunidad), y respondiendo pobremente a las citocinas homeostáticas encargadas del mantenimiento de las células T de memoria [59]. Esta posibilidad resulta especialmente relevante en estudios como el presente, debido a la probada asociación que existe entre el cáncer y la extenuación de los linfocitos T como consecuencia de una exposición persistente a antígeno [60].

La extenuación de los linfocitos T suele asociarse con una contención ineficaz de infecciones y tumores, y su presencia se ha asociado a un peor pronóstico en pacientes oncológicos con melanoma [61] y cáncer cervico-uterino [62], así como en pacientes con infecciones como el VIH [63] o con sepsis [80], por lo que sería conveniente estudiar si los linfocitos T de los pacientes que desarrollaron neutropenia febril tenían más huellas de extenuación que los de los pacientes con neutropenia que no desarrollaron fiebre. Esto puede hacerse mediante citometría de flujo al incorporar anticuerpos contra los principales marcadores de extenuación linfocitaria, entre los que destacan la proteína de muerte celular programada 1 (PD-1, CD279) y sus ligandos TIM-3 (CD366) y LAG-3 [64], CD31 [63], CD160 [65] y CD39 [66].

Otra observación que hace plausible la ampliación del presente estudio en miras de investigar la extenuación de las células T, es el hecho de que la población de linfocitos T CD4⁺ se encuentra considerablemente más afectada en cuanto a concentración, que la de los linfocitos T CD8⁺. Esto es, por sí mismo, un factor desencadenante de extenuación linfocitaria, pues se sabe que los linfocitos T CD4⁺ son indispensables para mantener la actividad citotóxica de los linfocitos T CD8⁺ y que su ausencia o baja concentración es capaz de motivar la extenuación de los linfocitos T CD8⁺ [67]. De elucidarse que este es el mecanismo base de la inmunodeficiencia de los pacientes con neutropenia febril, las terapias dirigidas a la restauración de la población de T CD4⁺ podrían resultar beneficiosas en su prevención.

De forma contrastante con los resultados discutidos con anterioridad, los linfocitos B se correlacionaron mucho menos con el estatus caso/control y con el desenlace final de los pacientes. En ambos casos, los grupos tuvieron valores muy bajos, originando correlaciones débiles o nulas. Esto puede explicarse si recordamos el

proceso madurativo de los linfocitos. Tras su producción en médula ósea y la diferenciación hacia precursores T o B influenciada por el microambiente medular, los precursores T migran a través de la sangre periférica rumbo al timo, donde completarán su maduración hacia linfocitos T; los precursores B, por otra parte, completan su maduración en la médula ósea [68]. Es posible, entonces, que los linfocitos B presenten mayor alteración en su producción y maduración como consecuencia de las quimioterapias mielosupresivas, a las que “escapan” de forma relativa, los linfocitos T.

En este sentido, resultaría muy interesante analizar a los linfocitos y sus subpoblaciones como células únicas a través de la citometría de flujo mediante el diseño de tubos capaces de determinar las características fenotípicas y funcionales de las mismas, con el fin de esclarecer, por ejemplo, patrones de distribución que sirvan como hallmark de la neutropenia febril. Un ejemplo de la aplicación de esta tecnología con fines similares es el tubo de orientación para inmunodeficiencias primarias (PIDOT) desarrollado por Euroflow, mismo que es capaz de identificar los linfocitos T y B, sus subpoblaciones y los estadios madurativos de las mismas, al tiempo que, mediante el reconocimiento de patrones de distribución, orienta a la presentación de una inmunodeficiencia en específico [69]. Con este fin, tras el análisis antes mencionado, podría crearse una base de datos amplia de pacientes con neutropenia febril y contrastar los hallazgos con el de pacientes con neutropenia sin fiebre, de forma similar a lo que se hizo en la presente investigación; esto con el objetivo de reconocer sus hallmarks de distribución y concentración, lo que facilitaría su diagnóstico y podría, incluso, ser útil en la creación de algoritmos diagnósticos más complejos.

Como es de esperarse al compartir un mismo precursor, la familia de las células NK también demostró encontrarse más afectada en los pacientes con fiebre y en aquellos con desenlace fatal. Lo anterior implica que dichos pacientes presentaban alteraciones en la respuesta inmunológica innata mediada por las funciones citotóxicas que definen al sistema NK [6,70], haciéndolos más propensos no sólo a infecciones, sino también a las neoplasias, puesto que se ha demostrado que las células NK poseen la habilidad de mediar la selección y diferenciación de un gran número de células stem del cáncer a través de mecanismos como el interferón

gamma y el factor de necrosis tumoral, mitigando así el crecimiento tumoral y la generación de metástasis [71]. Cabe entonces preguntarse si estas alteraciones pudieron, al mismo tiempo, condicionar una mayor agresividad del cáncer que presentaban los pacientes y que pudiera, por diversos mecanismos, desencadenar los desenlaces negativos a los que se asoció la disminución de células NK.

La correlación de los niveles bajos de células NK en el microambiente con un comportamiento tumoral más agresivo ya ha sido demostrada en pacientes con cáncer gástrico y colorrectal, encontrándose que aquellos en los que se desarrollaban múltiples metástasis hepáticas presentaban concentraciones mucho más bajas de NK CD56+ que aquellos pacientes con metástasis únicas o sin ellas [72,73]. Además, se ha encontrado relación entre la disfunción del sistema NK con un peor pronóstico clínico en cáncer de mama [74], leucemia linfocítica crónica [75], leucemia mieloide aguda [76] y en una amplia variedad de tumores sólidos pediátricos [77]. Conforme la inmunoterapia ha avanzado hacia la utilización de células NK contra el cáncer, la identificación precisa de deficiencias en este sistema inmunológico resulta imprescindible para no pasar por alto valiosas alternativas terapéuticas.

La disfunción inmunológica acentuada en los pacientes con neutropenia febril comprende también afecciones al sistema fagocítico mononuclear, observadas en la menor concentración celular que presentan no sólo los casos sino también, los pacientes con desenlace fatal. Los monocitos y sus subpoblaciones juegan un papel clave en la respuesta temprana de la infección aguda conteniéndola a través de la fagocitosis [78]. Los monocitos clásicos, por un lado, son cruciales en la respuesta inflamatoria inicial y en los procesos de fagocitosis, mientras que los monocitos no clásicos están involucrados en la fagocitosis mediada por complemento con un comportamiento claramente pro inflamatorio, secretando citocinas en respuesta a la infección [5,79]. El funcionamiento anormal de este sistema, implica, por ende, deficiencias importantes en la iniciación de la inflamación, la presentación de antígenos a las células T y la detección y fagocitosis de bacterias, promoviendo, en resumen, la infección; lo que explicaría su correlación con los desenlaces negativos (entiéndase: neutropenia febril y muerte) valorados en este estudio.

Uno de los hallazgos más interesantes de este estudio, lo constituye, sin duda, la asociación de una menor concentración de neutrófilos contabilizados mediante citometría de flujo con la presentación de neutropenia febril. Ello implica, la posible existencia de un “punto de corte” en el número de estos granulocitos que pone en especial riesgo a ciertos pacientes, y que podría, al combinarse con la contabilización de las otras poblaciones en las que se observaron diferencias, ser una preciada herramienta predictiva de gravedad, en general y de neutropenia febril, en particular.

Con vistas a esta posibilidad, se realizó una regresión logística binaria para diseñar un modelo predictivo de neutropenia febril. Como se mencionó con anterioridad, casi todas las poblaciones celulares identificadas mostraron correlacionarse con la presentación de neutropenia febril, por lo que, de forma ideal, la mejor manera de probar el potencial predictivo de la citometría de flujo implicaría la inclusión de todas las poblaciones celulares dentro del modelo de regresión. Sin embargo, el tamaño muestral de este proyecto hacía dicho experimento completamente inviable y habría condicionado la creación de un modelo falso. Así, se probaron únicamente las cinco poblaciones celulares que, habiendo demostrado una correlación estadísticamente significativa, tuvieran la mejor fuerza de asociación, de forma tal que la relación individuos-variables fuera 2:1.

Los resultados de dicha regresión demuestran que el conteo de neutrófilos mediante citometría de flujo es potencialmente predictivo de la presentación de neutropenia febril. Dicha asociación fue débil, posiblemente como resultado de un tamaño muestral relativamente pequeño; no obstante, abre el panorama a la posibilidad de usar el inmunofenotipaje mediante citometría de flujo como una herramienta pronóstica de neutropenia febril. Para corroborar este hallazgo y aumentar la potencia predictiva del modelo es necesaria la realización de nuevas investigaciones con un número de participantes mayor.

Además, dado que numerosas diferencias se trasladaban también al desenlace final, es posible deducir que su aplicación podría, posiblemente, predecir gravedad en pacientes con neutropenia post quimioterapia. Este último experimento no pudo ser

realizado por tener un tamaño muestral pequeño y abismalmente distinto entre grupos.

En resumen, el inmunofenotipaje mediante citometría de flujo reveló diferencias importantes entre los pacientes con neutropenia post quimioterapia que desarrollan fiebre y los que no. Se hace evidente así, que los pacientes con neutropenia febril tienen una disfunción inmunológica mayor que aquellos pacientes que sólo padecen neutropenia y que esta disfunción afecta tanto al sistema inmunológico innato como al adaptativo, comprometiendo las dos principales líneas de defensa contra patógenos. Esto constituye un hallazgo sin precedentes en el entendimiento de los mecanismos fisiopatológicos en general, e inmunológicos en particular, que condicionan la presentación de neutropenia febril post quimioterapia.

Además, se ha demostrado que ciertas poblaciones de leucocitos son potencialmente útiles para predecir el desarrollo de neutropenia febril, hallazgo que abre camino a nuevas y más grandes investigaciones que permitan desarrollar un modelo predictivo confiable a partir del inmunofenotipaje de las principales poblaciones y subpoblaciones leucocitarias mediante citometría de flujo y que podría suponer beneficios incalculables en el manejo y pronóstico de los pacientes con cáncer en tratamiento con quimioterapia.

8. CONCLUSIONES

Con base en la presente investigación, se puede concluir lo siguiente:

- 1) Es posible realizar un estudio inmunofenotípico mediante citometría de flujo incluso en pacientes con citopenias marcadas.
- 2) Los pacientes con neutropenia febril post quimioterapia tienen una afectación inmunológica más severa que los pacientes con neutropenia sin fiebre.
- 3) La afectación inmunológica de los pacientes con neutropenia febril comprende ambos brazos del sistema inmunológico: innato y adaptativo.
- 4) Las poblaciones inmunológicas determinadas a través de citometría de flujo tienen una significación estadística considerablemente mayor que las variables clínicas o bioquímicas en la comparación de los pacientes con neutropenia febril y neutropenia sin fiebre.
- 5) El inmunofenotipaje mediante citometría de flujo tiene potencial predictivo para la presentación de neutropenia febril. Se requieren nuevos estudios para determinar su alcance predictivo en el desarrollo de neutropenia febril como en la supervivencia de los pacientes con neutropenia post quimioterapia en general.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. McComb S, Thriot A, Krishna L, Stark F. *Introduction to the immune system*. 2013;
2. Riera Romo M, Pérez-Martínez D, Castillo Ferrer C. *Innate immunity in vertebrates: An overview*. *Immunology*. 2016;148(2):125–39.
3. Iwasaki A, Medzhitov R. *Control of adaptive immunity by the innate immune system*. *Nat Immunol*. 2015;16(4):343–53.
4. Liongue C, John LB, Ward AC. *Origins of adaptive immunity*. *Crit Rev Immunol*. 2011;31(1):61–71.
5. Kapellos TS, Bonaguro L, Gemünd I, Reusch N, Saglam A, Hinkley ER, et al. *Human monocyte subsets and phenotypes in major chronic inflammatory diseases*. *Front Immunol*. 2019;10:1–13.
6. Abel AM, Yang C, Thakar MS, Malarkannan S. *Natural killer cells: Development, maturation, and clinical utilization*. *Front Immunol*. 2018;9:1–23.
7. Browne T, Dearman RJ, Poles A. *Human neutrophil antigens: Nature, clinical significance and detection*. *Int J Immunogenet*. 2021;48(2):145–56.
8. Reinherz EL, Schlossman SF. *The differentiation and function of human T lymphocytes*. *Cell*. 1980;19(4):821–7.
9. Sigvardsson M. *Molecular regulation of differentiation in early B-lymphocyte development*. *Int J Mol Sci*. 2018;19(7).
10. Chun N, Heeger PS. *Blurring the lines between innate and adaptive immunity*. *Transplantation*. 2016;100(9):1789–90.
11. Biron CA. *More things in heaven and earth: Defining innate and adaptive immunity*. *Nat Immunol*. 2010;11(12):1080–2.
12. Manoury B, De Berardinis P. *Editorial: Targeted antigen delivery: Bridging innate and adaptive immunity*. *Front Immunol*. 2019;10:1–3.
13. Shanker A. *Adaptive control of innate immunity*. *Immunol Lett*. 2010;131(2):107–12.
14. Carmona-Bayonas A, Jimenez-Fonseca P, de Castro EM, Mata E, Biosca M, Custodio A, et al. *SEOM clinical practice guideline: management and prevention of febrile neutropenia in adults with solid tumors (2018)*. *Clin Transl Oncol*. 2019;21(1):75–86.
15. Lyman GH, Abella E, Pettengell R. *Risk factors for febrile neutropenia among patients with cancer receiving chemotherapy: A systematic review*. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2014;90(3):190–9.

16. Taplitz RA, Kennedy EB, Bow EJ, Crews J, Gleason C, Hawley DK, et al. *Outpatient management of fever and neutropenia in adults treated for malignancy: American Society of Clinical Oncology and Infectious Diseases Society of America Clinical practice guideline update.* J Clin Oncol. 2018;36(14):1443–53.
17. Weycker D, Barron R, Kartashov A, Legg J, Lyman GH. *Incidence, treatment, and consequences of chemotherapy-induced febrile neutropenia in the inpatient and outpatient settings.* J Oncol Pharm Pract. 2014;20(3):190–8.
18. Hansen BA, Wendelbo Ø, Bruserud Ø, Hemsing AL, Mosevoll KA, Reikvam H. *Febrile neutropenia in acute leukemia. Epidemiology, etiology, pathophysiology and treatment.* Mediterr J Hematol Infect Dis. 2020;11(1):1–19.
19. Sureda A, Domingo-Domenech E, Gautam A. *Neutropenia during frontline treatment of advanced Hodgkin lymphoma: Incidence, risk factors, and management.* Crit Rev Oncol Hematol. 2019;138:1–5.
20. Terwilliger T, Abdul-Hay M. *Acute lymphoblastic leukemia: a comprehensive review and 2017 update.* Blood Cancer J. 2017;7(6):e577.
21. Hansen BA, Wendelbo Ø, Bruserud Ø, Hemsing AL, Mosevoll KA, Reikvam H. *Febrile neutropenia in acute leukemia. Epidemiology, etiology, pathophysiology and treatment.* Mediterr J Hematol Infect Dis. 2020;11(1):1–19.
22. Almand B, Clark JI, Nikitina E, van Beynen J, English NR, Knight SC, et al. *Increased Production of Immature Myeloid Cells in Cancer Patients: A Mechanism of Immunosuppression in Cancer.* J Immunol. 2001;166(1):678–89.
23. Gustinetti G, Mikulska M. *Bloodstream infections in neutropenic cancer patients: A practical update.* Virulence. 2016;7(3):280–97.
24. Karimi F, Ashrafi F, Moghaddas A, Derakhshandeh A. *Management of febrile neutropenia: A description of clinical and microbiological findings by focusing on risk factors and pitfalls.* J Res Pharm Pract. 2018;7(3):147.
25. White L, Ybarra M. *Neutropenic Fever.* Hematol Oncol Clin North Am. 2017;31(6):981–93.
26. Aguado JM, Cruz JJ, Virizuela JA, Aguilar M, Carmona A, Cassinello J, et al. *Manejo de la infección y la neutropenia febril en el paciente con cáncer sólido.* Enferm Infecc Microbiol Clin. 2017;35(7):451–60.
27. Blane Schilling M, Parks C, Deeter RG. *Costs and outcomes associated with hospitalized cancer patients with neutropenic complications: A retrospective study.* Exp Ther Med. 2011;2(5):859–66.
28. Carmona-Bayonas A, Gómez J, González-Billalabeitia E, Canteras M, Navarrete A, González ML, et al. *Prognostic evaluation of febrile neutropenia in apparently stable adult cancer patients.* Br J Cancer. 2011;105(5):612–7.
29. Carmona-Bayonas A, Jiménez-Fonseca P, Virizuela Echaburu J, Sánchez Cánovas M, Ayala de la Peña F. *The time has come for new models in febrile*

- neutropenia: a practical demonstration of the inadequacy of the MASCC score.* Clin Transl Oncol. 2017;19(9):1084–90.
30. Carmona-Bayonas A, Jiménez-Fonseca P. *CISNE or MASCC, which predictor is really the weakest in febrile neutropenia?* Eur J Intern Med. 2018;50:e33–4.
 31. Carmona-Bayonas A, Jiménez-Fonseca P, Echaburu JV, Antonio M, Font C, Biosca M, et al. *Prediction of serious complications in patients with seemingly stable febrile neutropenia: Validation of the clinical index of stable febrile neutropenia in a prospective cohort of patients from the FINITE study.* J Clin Oncol. 2015;33(5):465–71.
 32. Fonseca PJ, Carmona-Bayonas A, García IM, Marcos R, Castañón E, Antonio M, et al. *A nomogram for predicting complications in patients with solid tumours and seemingly stable febrile neutropenia.* Br J Cancer. 2016;114(11):1191–8.
 33. Zheng B, Toarta C, Cheng W, Taljaard M, Reaume N, Perry JJ. *Accuracy of the Multinational Association of Supportive Care in Cancer (MASCC) and Clinical Index of Stable Febrile Neutropenia (CISNE) scores for predicting serious complications in adult patients with febrile neutropenia: A systematic review and meta-an.* Crit Rev Oncol Hematol. 2020;149.
 34. Villas BH. *Flow cytometry: an overview.* Cell Vis. 1998;5(1):56–61.
 35. Craig FE, Foon KA. *Flow cytometric immunophenotyping for hematologic neoplasms.* Blood. 2008;111(8):3941–67.
 36. Estévez O, Anibarro L, Garet E, Martínez A, Pena A, Barcia L, et al. *Multi-parameter flow cytometry immunophenotyping distinguishes different stages of tuberculosis infection.* J Infect. 2020;81(1):57–71.
 37. Gutiérrez-Bautista JF, Rodríguez-Nicolas A, Rosales-Castillo A, Jiménez P, Garrido F, Anderson P, et al. *Negative Clinical Evolution in COVID-19 Patients Is Frequently Accompanied With an Increased Proportion of Undifferentiated Th Cells and a Strong Underrepresentation of the Th1 Subset.* Front Immunol. 2020;11:1–15.
 38. Saksena S, Chattopadhyay P. *Illuminating the immunopathology of SARS-CoV-2.* Cytom Part B - Clin Cytom. 2021;100(1):33–41.
 39. Quadrini KJ, Patti-Diaz L, Maghsoudlou J, Cuomo J, Hedrick MN, McCloskey TW. *A flow cytometric assay for HLA-DR expression on monocytes validated as a biomarker for enrollment in sepsis clinical trials.* Cytom Part B - Clin Cytom. 2021;100(1):103–14.
 40. Seshadri A, Brat GA, Yorkgitis BK, Giangola M, Keegan J, Nguyen JP, et al. *Altered monocyte and NK cell phenotypes correlate with posttrauma infection.* J Trauma Acute Care Surg. 2019;87(2):337–41.
 41. Seshadri A, Brat GA, Yorkgitis BK, Keegan J, Dolan J, Salim A, et al. *Phenotyping the Immune Response to Trauma: A Multiparametric Systems Immunology Approach.* Crit Care Med. 2017;45(9):1523–30.

42. Spec A, Shindo Y, Burnham CAD, Wilson S, Ablordeppey EA, Beiter ER, et al. *T cells from patients with Candida sepsis display a suppressive immunophenotype*. Crit Care. 2016;20(1):1–9.
43. Qian F, Goel G, Meng H, Wang X, You F, Devine L, et al. *Systems immunology reveals markers of susceptibility to west Nile virus infection* Clin Vaccine Immunol. 2015;22(1):6–16.
44. Doerflinger M, Haeusler GM, Li-Wai-Suen CSN, Clark JE, Slavin M, Babl FE, et al. *Procalcitonin and Interleukin-10 May Assist in Early Prediction of Bacteraemia in Children With Cancer and Febrile Neutropenia*. Front Immunol. 2021;12:1–9.
45. Hashiguchi Y, Kasai M, Fukuda T, Ichimura T, Yasui T, Sumi T. *Chemotherapy-induced neutropenia and febrile neutropenia in patients with gynecologic malignancy*. Anticancer Drugs. 2015;26(10):1054–60.
46. Moreau M, Klastersky J, Schwarzbald A, Muanza F, Georgala A, Aoun M, et al. *A general chemotherapy myelotoxicity score to predict febrile neutropenia in hematological malignancies*. Ann Oncol. 2009;20(3):513–9.
47. Lyman GH, Kuderer N, Greene J, Balducci L. *The economics of febrile neutropenia: Implications for the use of colony-stimulating factors*. Eur J Cancer. 1998;34(12):1857–64.
48. Santegoets SJAM, Welters MJP, van der Burg SH. *Monitoring of the immune dysfunction in cancer patients*. Vaccines. 2016;4(3):1–23.
49. Fuentes-Arderiu X, García-Panyella M, Dot-Bach D. *Between-examiner reproducibility in manual differential leukocyte counting*. Accred Qual Assur. 2007;12(12):643–5.
50. Jo Y, Kim SH, Koh K, Park J, Shim YB, Lim J, et al. *Reliable, accurate determination of the leukocyte differential of leukopenic samples by using Hematoflow method*. Korean J Lab Med. 2011;31(3):131–7.
51. Pierre R V. *Peripheral blood film review: The demise of the eyecount leukocyte differential*. Clin Lab Med. 2002;22(1):279–97.
52. Orfao A, Matarraz S, Pérez-Andrés M, Almeida J, Teodosio C, Berkowska MA, et al. *Immunophenotypic dissection of normal hematopoiesis*. J Immunol Methods. 2019;475:112684.
53. Kotsakis A, Harasymczuk M, Schilling B, Georgoulas V, Argiris A, Whiteside TL. *Myeloid-derived suppressor cell measurements in fresh and cryopreserved blood samples*. J Immunol Methods. 2012;381(1–2):14–22.
54. Huang A, Zhang B, Wang B, Zhang F, Fan KX, Guo YJ. *Increased CD14+HLA-DR-/low myeloid-derived suppressor cells correlate with extrathoracic metastasis and poor response to chemotherapy in non-small cell lung cancer patients*. Cancer Immunol Immunother. 2013;62(9):1439–51.
55. Reiné J, Rylance J, Ferreira DM, Pennington SH, Welters ID, Parker R, et al. *The*

- whole blood phagocytosis assay: A clinically relevant test of neutrophil function and dysfunction in community-Acquired pneumonia.* BMC Res Notes. 2020;13(1):1-10.
56. Reiné J, Cooper K, Sewell A, Lyall J, Thorbinson C, Hincks E, et al. *Neutrophil function is impaired in paediatric patients with malignancy and may be a useful clinical marker.* Clin Transl Oncol. 2020;22(11):2121-5.
 57. Reiner SL. *Development in Motion: Helper T Cells at Work.* Cell. 2007;129(1):33-6.
 58. Martin MD, Badovinac VP. *Defining memory CD8 T cell.* Front Immunol. 2018;9:1-10.
 59. McLane LM, Abdel-Hakeem MS, Wherry EJ. *CD8 T Cell Exhaustion During Chronic Viral Infection and Cancer.* Annu Rev Immunol. 2019;37:457-95.
 60. Wherry EJ, Kurachi M. *Molecular and cellular insights into T cell exhaustion.* Nat Rev Immunol. 2015;15(8):486-99.
 61. Navani V, Graves MC, Marchett GC, Mandaliya H, Bowden NA, Westhuizen A. *Overall survival in metastatic melanoma correlates with pembrolizumab exposure and T cell exhaustion markers.* Pharmacol Res Perspect. 2021;9(4):1-9.
 62. Lakomy DS, Wu J, Lombe D, Papisavvas E, Msadabwe SC, Geng Y, et al. *Immune correlates of therapy outcomes in women with cervical cancer treated with chemoradiotherapy: A systematic review.* Cancer Med. 2021;1-15.
 63. Briceño O, Peralta-Prado A, Garrido-Rodríguez D, Romero-Mora K, Chávez-Torres M, de la Barrera CA, et al. *Characterization of CD31 expression in CD4+ and CD8+T cell subpopulations in chronic untreated HIV infection.* Immunol Lett. 2021;235:22-31.
 64. Ibrahim DM, Mahmoud FM, Zaki WK, Hamza AH, ElSheshtawy NM. *Expression of programmed cell death 1 (PD-1) as a marker of T-cell exhaustion and its correlation with interleukin-10 serum level in patients with COVID-19.* J Pure Appl Microbiol. 2021;15(2):650-7.
 65. Bozorgmehr N, Okoye I, Oyegbami O, Xu L, Fontaine A, Cox-Kennett N, et al. *Expanded antigen-experienced CD160+CD8+effector T cells exhibit impaired effector functions in chronic lymphocytic leukemia.* J Immunother Cancer. 2021;9(4):1-17.
 66. Miggelbrink AM, Jackson JD, Lorrey SJ, Srinivasan ES, Waibl Polania J, Wilkinson DS, et al. *CD4 T-cell exhaustion: Does it exist and what are its roles in cancer?* Clin Cancer Res. 2021;clincanres.0206.2021.
 67. Matloubian M, Concepcion RJ, Ahmed R. *CD4 + T Cells Are Required To Sustain CD8 + Cytotoxic T-Cell Responses during Chronic Viral Infection.* J Virol. 1994;68(12):8056-63.
 68. Quesniaux V, Down J, Schuurman H. *Hematopoiesis, including lymphocyte*

- development and maturation*. In: Principles of Immunopharmacology. 2005.
69. Van Der Burg M, Kalina T, Perez-Andres M, Vlkova M, Lopez-Granados E, Blanco E, et al. *The EuroFlow PID orientation tube for flow cytometric diagnostic screening of primary immunodeficiencies of the lymphoid system*. Front Immunol. 2019;10:1–11.
 70. Bi J, Wang X. *Molecular Regulation of NK Cell Maturation*. Front Immunol. 2020;11:1–12.
 71. Jewett A, Kos J, Kaur K, Safaei T, Sutanto C, Chen W, et al. *Natural Killer Cells: Diverse Functions in Tumor Immunity and Defects in Pre-neoplastic and Neoplastic Stages of Tumorigenesis*. Mol Ther - Oncolytics. 2020;16:41–52.
 72. Gulubova M, Manolova I, Kyurkchiev D, Julianov A, Altunkova I. *Decrease in intrahepatic CD56+ lymphocytes in gastric and colorectal cancer patients with liver metastases*. Apmis. 2009;117(12):870–9.
 73. Mordoh J, Levy EM, Roberti MP. *Natural killer cells in human cancer: From biological functions to clinical applications*. J Biomed Biotechnol. 2011;2011.
 74. Nelson MA, Ngamcherdtrakul W, Luoh SW, Yantasee W. *Prognostic and therapeutic role of tumor-infiltrating lymphocyte subtypes in breast cancer*. Cancer Metastasis Rev. 2021;40(2):519–36.
 75. Sordo-bahamonde C, Lorenzo-herrero S, Gonzalez-rodriguez AP, Payer ÁR, Gonz E, Alejandro L, et al. *BTLA / HVEM Axis Induces NK Cell Immunosuppression and*. Cancers (Basel). 2021;1–17.
 76. Liu G, Zhang Q, Yang J, Li X, Xian L, Li W, et al. *Increased TIGIT expressing NK cells with dysfunctional phenotype in AML patients correlated with poor prognosis*. Cancer Immunol Immunother. 2021;
 77. Quamine AE, Olsen MR, Cho MM, Capitini CM. *Approaches to enhance natural killer cell-based immunotherapy for pediatric solid tumors*. Cancers (Basel). 2021;13(11):1–29.
 78. Narasimhan PB, Marcovecchio P, Hamers AAJ, Hedrick CC. *Nonclassical Monocytes in Health and Disease*. Annu Rev Immunol. 2019;37:439–56.
 79. Sampath P, Moideen K, Ranganathan UD, Bethunaickan R. *Monocyte Subsets: Phenotypes and Function in Tuberculosis Infection*. Front Immunol. 2018;9:1726.
 80. Guinault D, Nicolau-Travers M, Silva S, Cointault O, Daniau B, Del Bello A, et al. *Expression of Exhaustion Markers on CD8+ T-Cell Patterns Predict Outcomes in Septic Patients Admitted to the ICU*. Critical Care Medicine. 2021