

Evaluación de subpoblaciones leucocitarias en sangre periférica por citometría de flujo en pacientes pediátricos admitidos en la Unidad de Terapia Intensiva

Ariel Fabian Rodríguez¹, Damián Prado¹, Eduardo Gaddi¹

Resumen

Introducción. Un adecuado funcionamiento del sistema inmune es fundamental en la respuesta del paciente frente a infecciones y procesos inflamatorios.

Objetivos. Evaluar la expresión de los marcadores HLA-DR en monocitos (M) y CD64 en neutrófilos (N), y niveles de linfocitos T reguladores (Tregs), en la evolución de pacientes internados en la Unidad de Terapia Intensiva Pediátrica.

Materiales y métodos. Estudio exploratorio, de cohorte. Se incluyeron pacientes ≥ 1 año con 48 h de internación entre abril/21- marzo/22, clasificados según motivo de admisión: infeccioso (A) o no infeccioso (B), y tiempo de permanencia en días (t) < 14 o ≥ 14 . La inmunofenotipificación se realizó entre el día 2-5. El análisis estadístico se efectuó con GraphPad Prism versión 8.0.

Resultados. Se estudiaron 35 pacientes, 16 del grupo A y 19 del B. Se encontraron niveles disminuidos de HLA-DR M de pacientes del grupo A con $t \geq 14$ con respecto a $t < 14$ ($28,4 \pm 12\%$ vs $51,3 \pm 19\%$; $p < 0,05$). La expresión de CD64 N no presentó diferencias significativas entre grupos, observándose disminución en casi el 50 % de los pacientes. Los niveles de Linfocitos Tregs no presentaron diferencias entre ambos grupos si bien se encontraron aumentados con respecto al valor de referencia.

Conclusión. Los marcadores ensayados permitieron una evaluación parcial de la respuesta inmunitaria. Mayor expresión de HLA-DR M sería reflejo de una activación inmune más eficaz, mientras que el aumento de linfocitos Tregs no implicó disminución en la capacidad de respuesta inmune.

Palabras clave: citometría de flujo; monocitos; pediatría.

Introducción

El sistema inmune desempeña un rol central en la evolución de los pacientes críticos, tanto en la defensa frente a infecciones como en la regulación de la respuesta inflamatoria. En este contexto, diversas subpoblaciones leucocitarias participan activamente mediante funciones efectoras y reguladoras que pueden influir en el pronóstico clínico¹.

Entre ellas, los monocitos cumplen un papel clave en la presentación antigénica y en la modulación de la respuesta inmune. La disminución de la expresión de HLA-DR en estos leucocitos ha sido descrita como un marcador de anergia del sistema inmune y se ha asociado con sepsis, infecciones nosocomiales y mayor mortalidad. Por su parte, los neutrófilos, fundamentales en la inmunidad innata, presentan un aumento en la expresión de CD64 en situaciones de activación inflamatoria, lo cual ha sido relacionado con procesos infecciosos. Asimismo, linfocitos Tregs participan en el control de la respuesta inmune inadecuada o exacerbada, y su incremento se ha vinculado con un mayor riesgo de infecciones secundarias o neoplasias¹.

En los últimos años, ha crecido el interés por identificar biomarcadores inmunológicos que permitan predecir la evolución de pacientes críticos. Estudios como los protocolos INFECT y REALISM han explorado combinaciones de marcadores inmunológicos en este sentido²⁻⁴. Sin embargo, los resultados han sido heterogéneos y los estudios en población pediátrica continúan siendo limitados⁵⁻⁷.

Correspondencia: Ariel Fabian Rodríguez. ari.rod@hotmail.com
Trabajo recibido el 29 marzo 2026 y aprobado el 8 abril 2026

¹ División de Inmunología, Bioquímica Clínica, Área Inmunología, Hospital General de Niños Pedro de Elizalde

En este marco, el presente estudio se propuso evaluar la expresión de HLA-DR en monocitos, CD64 en neutrófilos y los niveles de linfocitos Tregs en pacientes internados en la Unidad de Terapia Intensiva Pediátrica (UTIP) del Hospital General de Niños Pedro de Elizalde (HGNPE), con el objetivo de explorar su asociación con la evolución clínica.

Materiales y métodos

Diseño: Estudio descriptivo analítico exploratorio de cohorte prospectiva.

Población

Se incluyeron pacientes pediátricos admitidos en la UTIP entre el 1 de abril de 2021 y el 26 de febrero de 2022, que cumplieron con los siguientes criterios de inclusión: edad: mayor a 1 año y una estancia mínima de 48 horas en la UTIP.

Se excluyeron aquellos pacientes que recibían tratamiento inmunosupresor o inmunomodulador (excepto corticoides), o factores estimulantes de colonias en los tres meses previos, así como aquellos con diagnóstico de inmunodeficiencia o errores innatos de la inmunidad. También se excluyeron los pacientes admitidos con diagnóstico de shock séptico.

Adicionalmente, se excluyeron del análisis las muestras no aptas para el estudio inmunológico, como aquellas con errores en la etapa preanalítica (por ejemplo, muestras coaguladas) o en las que no se obtuvieron resultados confiables para las poblaciones celulares evaluadas.

Procedimiento

En los pacientes que cumplieron los criterios de inclusión se obtuvo una muestra de sangre periférica ($\leq 0,5$ mL) en tubos con anticoagulante EDTA, entre el día 2 y 5 desde la admisión a la UTIP.

Las muestras fueron procesadas en el laboratorio de Inmunología del HGNPE siguiendo el procedimiento estándar. Inicialmente, se incubaron 100 μ L de sangre entera con anticuerpos monoclonales durante 20 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Posteriormente, se realizó la lisis de eritrocitos con una solución de cloruro de amonio (NH_4Cl) durante 15 minutos en las mismas condiciones.

Para la inmunofenotipificación de monocitos y neutrófilos se emplearon paneles de anticuerpos monoclonales dirigidos contra CD14, CD64, CD45, CD16, CD10, CD4, CD19 y HLA-DR, conjugados con distintos fluorocromos. Para la identificación de linfocitos Tregs se utilizaron anticuerpos contra CD3, CD4, CD25, CD127 y CD45.

La adquisición se realizó en un citómetro CytoFLEX (Beckman Coulter) utilizando el software CytExpert. Se registraron al menos 5000 eventos en el gate de monocitos y 500 eventos en el gate de linfocitos Tregs, definidos según sus características de dispersión y expresión de marcadores.

El análisis se llevó a cabo con el software Kaluza 2.1 (Beckman Coulter). La expresión de HLA-DR se evaluó en monocitos utilizando linfocitos B como control interno positivo, mientras que la expresión de CD64 se analizó en neutrófilos, tomando a los linfocitos como control interno negativo. Los linfocitos Tregs se definieron como células CD4+ con alta expresión de CD25 y baja o negativa de CD127.

Los valores de referencia para HLA-DR y CD64 se obtuvieron de la literatura, mientras que los correspondientes a linfocitos Tregs provinieron de estudios previos realizados en el laboratorio⁸⁻¹⁰.

Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se efectuaron utilizando el software GraphPad Prism versión 8.0. Las variables continuas se describieron como mediana y rango intercuartílico, dado que no presentaron distribución normal.

Los pacientes fueron clasificados según la duración de la internación en la UTIP en dos grupos: menor a 14 días y mayor o igual a 14 días. Asimismo, se consideró la presencia o ausencia de identificación microbiológica del germen.

Para la comparación de las variables continuas entre grupos independientes se utilizó la prueba de Mann-Whitney. Las variables categóricas se expresaron como frecuencias y porcentajes y se compararon mediante la prueba de chi-cuadrado o test exacto de Fisher, según correspondiera. Se consideró estadísticamente significativo un valor de $p < 0,05$.

Aspectos éticos

Se solicitó el consentimiento y/o asentimiento informado según correspondía. Protocolo aprobado por el Comité de Ética en Investigación del HGNPE.

Resultados

Durante el período de estudio se incluyeron 35 pacientes admitidos en la UTIP, con edades entre 1 y 17 años; 14 varones y 21 mujeres. Los pacientes fueron clasificados según la etiología del cuadro clínico en: infeccioso ($n = 16$; 45,7 %) y no infeccioso ($n = 19$; 54,3 %).

A su vez, se estratificaron según la evolución clínica en función de la duración de la internación: menor a 14 días y mayor o igual a 14 días. En el grupo infeccioso, 11 pacientes presentaron una internación menor a 14 días y 5, mayor o igual a 14 días. En el grupo no infeccioso, 14 pacientes permanecieron menos 14 días y 5, 14 días o más.

Las características de los pacientes con procesos infecciosos se detallan en la Tabla 1 en donde el 69 % tenía una edad menor 10 años y en su mayoría cursaban infecciones virales, mientras que los diagnósticos del grupo no infeccioso se resumen en la Tabla 2.

Tabla 1. Características clínicas de pacientes con procesos infecciosos internados en la UTIP

Paciente	Edad (años)	Tiempo en UTIP	Germen aislado
1	1	> 14 días	VSR
2	1	> 14 días	VSR
3	13	> 14 días	SARS-CoV 2
4	6	> 14 días	Rinovirus, enterovirus
5	1	> 14 días	Moraxella, estreptococo
6	2	< 14 días	VSR
7	7	< 14 días	SARS-CoV 2
8	11	< 14 días	Staphylococcus aureus
9	4	< 14 días	Rinovirus, estreptococo
10	1	< 14 días	VSR, influenza
11	1	< 14 días	VSR
12	13	< 14 días	Rinovirus, enterovirus, parainfluenza
13	3	< 14 días	Rinovirus, adenovirus, enterovirus
14	3	< 14 días	Rinovirus, enterovirus
15	10	< 14 días	Burkholderia cepacia, SAMS
16	12	< 14 días	Estreptococo - (Herida quirúrgica)

VSR: Virus sincial respiratorio; SARS-CoV 2: Síndrome agudo respiratorio grave por Coronavirus 2; SAMS: Staphylococcus aureus sensible a meticilina

Tabla 2. Cuadros no infecciosos de pacientes internados en UTIP

Motivo de internación en UTIP	Pacientes
Control postquirúrgico	6
Traumatismos graves	4
Síndromes neurológicos	5
Enfermedad del parénquima renal	2
Crisis asmática grave	1
Shock hipovolémico	1

Expresión de HLA-DR en monocitos

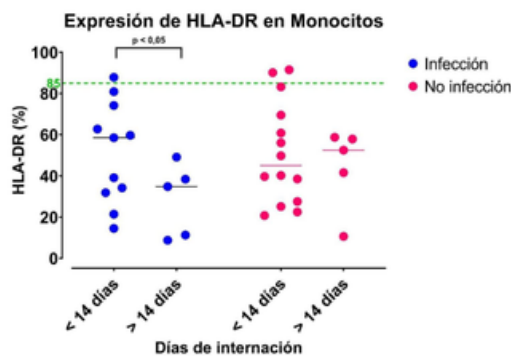
En el grupo de pacientes con patología infecciosa, aquellos con internación de 14 días o más presentaron una menor expresión de HLA-DR en monocitos en comparación con aquellos con internación de menos 14 días ($28,4 \pm 12$ % vs $51,3 \pm 19$ %; $p < 0,05$).

En contraste, en el grupo no infeccioso no se observaron diferencias significativas en la expresión de HLA-DR entre pacientes con internación prolongada y aquellos con menor duración ($44,2 \pm 11$ % vs $48,2 \pm 9,9$ %).

Se destaca que los valores obtenidos en los 4 grupos de pacientes resultaron menores al valor tomado como referencia (85 %)

Los valores individuales se muestran en la Figura 1.

Figura 1. Expresión del marcador HLA-DR sobre monocitos de pacientes con y sin cuadros infecciosos internados en la UTIP



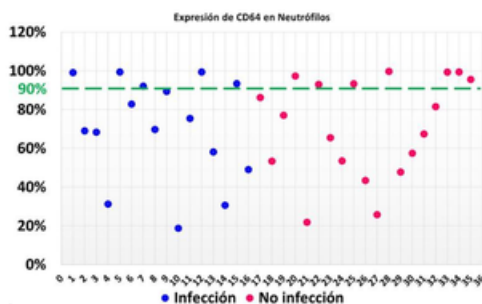
Expresión de CD64 en neutrófilos

No se observaron diferencias significativas en la expresión de CD64 en neutrófilos entre los grupos definidos por etiología ni por duración de la internación (Tabla 3). En casi el 50 % de los pacientes se observaron valores francamente disminuidos de expresión del CD64 (Figura 2).

Tabla 3. Valores medios de expresión porcentual de CD64 sobre neutrófilos en ambos grupos de pacientes evaluados

Pacientes	Tiempo en UTIP (n: pacientes)	Niveles porcentuales de CD64 sobre neutrófilos (X ± DS)
Grupo A (infectados) n: 16	>14 días (n: 5)	65,8 ± 29,4
	<14 días (n: 11)	71,9 ± 26,2
Grupo B (no infectados) n: 19	>14 días (n: 5)	88,2 ± 13,9
	<14 días (n: 14)	64,9 ± 26,3

Figura 2. Distribución de la expresión porcentual de CD64 sobre neutrófilos en cada uno de los pacientes internados en la UTIP, con y sin procesos infecciosos



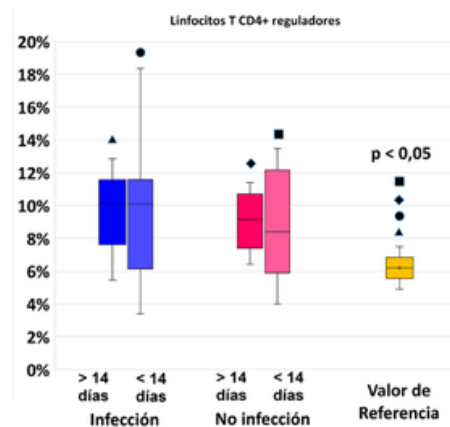
Linfocitos T reguladores (Tregs)

Los niveles de linfocitos Tregs (CD4+CD25++CD127+/-) no mostraron diferencias significativas entre los grupos analizados según etiología ni duración de la internación (Tabla 4). Sin embargo, dichos valores porcentuales estuvieron incrementados significativamente con respecto al valor de referencia, $6,3 \pm 1,2$ %, para esta subpoblación de linfocitos TCD4+ (Figura 3).

Tabla 4. Niveles porcentuales de células T regulatorias en ambos grupos de pacientes evaluados

Pacientes	Tiempo en UTIP (n: pacientes)	Niveles porcentuales de Tregs CD4+CD25++CD127 +/- (X±DS)
Grupo A (infectados) n: 16	>14 días (n: 5)	9,7 ± 2,6
	<14 días (n: 11)	9,6 ± 3,9
Grupo B (no infectados) n: 19	>14 días (n: 5)	9,1 ± 1,87
	<14 días (n: 14)	8,8 ± 3,1

Figura 3. Distribución de los niveles de linfocitos T CD4+CD25++CD127+/- en los grupos evaluados comparados con el valor de referencia



Discusión

En este estudio, la marcada disminución de la expresión de HLA-DR en monocitos se asoció con una evolución clínica desfavorable —definida como una estancia de 14 o más días en la UTIP— en pacientes con patología infecciosa. Hallazgo que no se observó en aquellos con etiología no infecciosa. Se destaca que en todos los grupos los valores de expresión de HLA-DR fueron inferiores al valor de referencia.

La reducción de HLA-DR ha sido descrita como un marcador de inmunosupresión o “inmunoparálisis” en pacientes críticos, particularmente en sepsis, y se ha asociado con mayor riesgo de infecciones secundarias y mortalidad¹¹⁻¹². Nuestros resultados son concordantes con estos antecedentes y sugieren que este fenómeno también podría tener relevancia en población pediátrica.

En relación con la expresión de CD64 en neutrófilos, no se observaron diferencias significativas entre los grupos, aunque una proporción considerable de pacientes presentó valores disminuidos respecto a los niveles de referencia. Este comportamiento variable ha sido previamente descrito y podría depender del momento evolutivo del proceso infeccioso¹³.

Por otra parte, los niveles de linfocitos Tregs se encontraron aumentados en todos los grupos evaluados, sin asociación con la evolución clínica. Este hallazgo podría reflejar un mecanismo compensador orientado a limitar la respuesta inflamatoria, aunque un aumento sostenido podría contribuir a un estado de inmunosupresión relativa¹⁴.

A pesar de las alteraciones inmunológicas observadas, la mayoría de los pacientes presentó una evolución favorable, lo que refleja la complejidad y redundancia del sistema inmune, en un contexto de “inmadurez” y desarrollo de este sistema en población pediátrica; así como el equilibrio entre respuesta inflamatoria y mecanismos reguladores. En este sentido, la activación desregulada de neutrófilos ha sido implicada en el daño tisular, especialmente a nivel pulmonar¹⁵.

Entre las limitaciones del estudio se destacan el tamaño muestral reducido y la heterogeneidad de los cuadros clínicos, así como el uso de la duración de la internación como indicador de evolución clínica, potencialmente influenciado por factores no inmunológicos.

En conclusión, la disminución de la expresión de HLA-DR en monocitos podría constituir un marcador de evolución desfavorable en pacientes pediátricos críticos con patología infecciosa, mientras que el aumento en el número de linfocitos Tregs podría exponer la necesidad de establecer valores de referencia particulares para la población internada en UTIP, lo que amerita su evaluación en estudios futuros con mayor tamaño muestral.

Referencias

- Juskewitch JE, Abraham RS, League SC, Jenkins SM, Smith CY, Enders FT, et al. Monocyte HLA-DR expression and neutrophil CD64 expression as biomarkers of infection in critically ill neonates and infants. *Pediatr Res*. 2015;78(6):683-90.
- Conway Morris A, Datta D, Shankar-Hari M, Weir CJ, Rennie J, Antonelli J, et al. Predictive value of cell-surface markers in infections in critically ill patients: Protocol for an observational study (ImmuNe FailurE in Critical Therapy (INFECT) Study). *BMJ Open*. 2016; 6(7):e011326. doi: 10.1136/bmjopen-2016-011326.
- Conway Morris A, Datta D, Shankar-Hari M, Stephen J, Weir CJ, Rennie J, et al. Cell-surface signatures of immune dysfunction risk-stratify critically ill patients: INFECT study. *Intensive Care Med*. 2018;44(5):627-35.
- Rol M-L, Venet F, Rimmelé T, Mouchadel V, Cortez P, Quemeneur L, et al. The REAnimation Low Immune Status Markers (REALISM) project: a protocol for broad characterisation and follow-up of injury-induced immunosuppression in intensive care unit (ICU) critically ill patients. *BMJ Open*. 2017;7(6):e015734.
- Boeddha NP, Kerklaan D, Dunbar A, van Puffelen E, Nagtzaam NMA, Vanhorebeek I, et al. HLA-DR Expression on Monocyte Subsets in Critically Ill Children. *Pediatr Infect Dis J*. octubre de 2018;37(10):1034-40.
- Burgos J, Los-Arcos I, Álvarez de la Sierra D, Falcó V, Aguiló A, Sánchez I, et al. Determination of neutrophil CD64 expression as a prognostic biomarker in patients with community-acquired pneumonia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2016; 35(9):1411-6.
- Soleimanpour H, Sanaie S, Movassaghpour AA, Hamishehkar H, Chamari AA, Paknezhad S, et al. Flow Cytometry of CD64, HLA-DR, CD25, and TLRs for Diagnosis and Prognosis of Sepsis in Critically Ill Patients Admitted to the Intensive Care Unit: A Review Article. *Anesthesiol Pain Med*. 5 de diciembre de 2018;8(6):e83128. doi: 10.5812/aapm.83128.
- Lekkou A, Karakantza M, Mouzaki A, Kalfarentzos F, Gogos CA. Cytokine Production and Monocyte HLA-DR Expression as Predictors of Outcome for Patients with Community-Acquired Severe Infections. *Clin Vaccine Immunol*. 2004; 11(1):161-7.
- Barth E, Fischer G, Schneider EM, Wollmeyer J, Georgieff M, Weiss M. Differences in the expression of CD 64 and MCD 14 on polymorphonuclear cells and on monocytes in patients with septic shock. *Cytokine*. 2001;14(5):299-302.
- Argüello RJ, Balbarski J, Barboni G, Candi M, Gaddi E, Laucella S. Altered frequency and phenotype of CD4+ forkhead box protein 3+ T cells and its association with autoantibody production in human immunodeficiency virus- infected paediatric patients. *Clin Exp Immunol*. 2012;168(2):224-33.
- Johansson C, Kirsebom FCM. Neutrophils in respiratory viral infections. *Mucosal Immunol*. 2021;14(4):815-27.
- Monneret G, Lepape A, Voirin N, Bohé J, Venet F, Debarb AL, et al. Persisting low monocyte human leukocyte antigen-DR expression predicts mortality in septic shock. *Intensive Care Med*. 2006; 32(8):1175-83. doi: 10.1007/s00134-006-0204-8.
- Davis BH, Olsen SH, Ahmad E, Bigelow NC. Neutrophil CD64 Is an Improved Indicator of Infection or Sepsis in Emergency Department Patients. *Arch Pathol Lab Med*. 2006 Apr; 130(5):654-661. doi:10.5858/2006-130-654-NCIAll.
- Venet F, Lepape A, Monneret G. Clinical review: flow cytometry perspectives in the ICU - from diagnosis of infection to monitoring of injury-induced immune dysfunctions. *Crit Care*. 2011;15(5):231. doi: 10.1186/cc10333.
- Matthay MA, Zemans RL, Zimmerman GA, Arabi Y, Beitler J, Mercat A, et al. Acute respiratory distress syndrome. *Nat Rev Dis Primers*. 2019;5(1):18. doi:10.1038/s41572-019-0069-0