



Universidad de Valladolid

BIOCRITIC
Biomedicina en cuidados críticos



PERFILES DE EXPRESIÓN GÉNICA EN LA INFECCIÓN ASOCIADA A LA VENTILACIÓN MECÁNICA



TRABAJO DE FIN DE MÁSTER 2015-2016

MARTA MARTÍN FERNÁNDEZ
Máster en Investigación Biomédica

Tutor 1:
Dra. Raquel Almansa Mora

Tutor 2:
Dr. Juan José Tellería Orriols

INTRODUCCIÓN

Infecciones asociadas a la Ventilación Mecánica:

Aunque la ventilación mecánica es una intervención que salva vidas de manera potencial, también está asociada con importantes riesgos y complicaciones como son las infecciones del tracto respiratorio inferior, dentro de las cuales se incluyen la neumonía asociada a ventilación mecánica (NAV) y la traqueobronquitis asociada a ventilación mecánica (TAV) [1].

El diagnóstico de la infección del tracto respiratorio inferior asociada a la ventilación mecánica se basa en la presencia de al menos dos de los siguientes criterios: temperatura corporal de más de 38,5°C o menos de 36,5°C, contaje leucocitario de más de 12.000 células por μL , aspirados endotraqueales purulentos (ETA). Además, todos los episodios de infección han de tener un cultivo microbiológico positivo en el ETA de al menos 10^5 unidades formadoras de colonia (CFU) por mL, o con un lavado broncoalveolar de al menos 10^4 CFU por mL incluido en el análisis final [1].

La TAV es una complicación infecciosa frecuente y de relevancia clínica en pacientes con ventilación mecánica durante más de 48 horas, con una incidencia similar a la NAV. La TAV se define como la presencia de los criterios anteriormente mencionados más la ausencia de nuevos infiltrados pulmonares o progresión de los mismos en las radiografías de tórax. Aunque se la asocia con una menor mortalidad que la NAV, los supervivientes que han tenido traqueobronquitis han requerido de una duración de la estancia en la UCI y un mantenimiento de la ventilación mecánica similares. Casi todos los pacientes con traqueobronquitis recibieron antibióticos. Mientras que la ausencia de tratamiento antibiótico se relaciona con un mayor riesgo de desarrollar neumonía, un tratamiento antibiótico adecuado está asociado a una reducción de la progresión a neumonía [1].

La NAV se define como la presencia de los criterios anteriormente mencionados más la presencia de nuevos infiltrados pulmonares o progresión de los mismos [1]. Es la principal infección adquirida en las Unidades de Cuidados Intensivos (UCI). Según datos del Estudio Nacional de Vigilancia de Infección Nosocomial (ENVIN) las tasas de la NAV a nivel nacional se han mantenido en torno a 15 episodios por 1000 días de VM entre los años 2000-2008 y de unos 6 en el año 2014 (<http://hws.vhebron.net/envin-helics/>) [2]. La media nacional en EEUU entre los años 2006 y 2008 (National Healthcare Safety Network (NHSN) fue de 3,7 episodios por 1.000 días de ventilación mecánica [3]. Nuestros datos confirman que sólo el 8,7% de los enfermos han adquirido una o más infecciones nosocomiales intra-UCI (5,05% si se contabilizan las infecciones controladas en el ENVIN). Durante el año 2014 los antibióticos empleados para el tratamiento de infección intra-UCI ha sido el 18,4 % de todas las indicaciones, la menor proporción de todos los años [2].

El diagnóstico de NAV se ha relacionado con un incremento de la estancia en UCI y en el hospital, con un alargamiento de la duración de la VM, con un aumento de la mortalidad bruta y con una mortalidad atribuida de hasta el 30% (existen trabajos que encuentran una mortalidad 2,03 veces mayor en lo pacientes con NAV) [4] [5]. El efecto sobre el gasto sanitario (derivado en su mayor parte por la prolongación de la ventilación mecánica y la estancia) se ha calculado en 10.019 euros adicionales por cada episodio [5]. Por todo ello, su prevención es uno de los objetivos más investigados en los últimos años. En la literatura médica se acumulan numerosos estudios que han analizado diferentes medidas para prevenir esta infección y que estudian la eficacia de la aplicación de paquetes de medidas preventivas. Sin embargo, a pesar de la

correcta aplicación de estas intervenciones hasta el momento no ha sido posible erradicar totalmente la NAV [6].

Mayor relevancia aún tiene la dificultad en el seguimiento y cumplimiento de varias de las medidas preventivas de NAV [7]. La aplicación de algunas intervenciones supone un aumento considerable de la carga de trabajo de la enfermería de la UCI, otras medidas conllevan un coste económico que impiden su uso de forma generalizada [8]. En este contexto, la identificación de aquellos pacientes en situación de mayor riesgo o susceptibilidad para el desarrollo de NAV podría permitir un uso más racionalizado de los recursos en cuanto a prevención de la NAV.

Una vez establecida la NAV, el uso precoz y certero del tratamiento antibiótico es el pilar fundamental para lograr una buena evolución del enfermo [9]. Sin embargo, existen pacientes en los cuales a pesar de tener un tratamiento antibiótico correcto presentan una mala evolución [10]. La identificación de factores intrínsecos relacionados con la respuesta inmune podrían explicar la falta de respuesta al tratamiento [11] y mejorar el pronóstico y gestión de recursos de dichos sujetos

A pesar de que la NAV se asocia con una mayor morbilidad y duración de la ventilación mecánica en la Unidad de Cuidados Intensivos (UCI), se ha propuesto que la traqueobronquitis es un estadio intermedio entre la colonización del tracto respiratorio inferior y la neumonía, con efectos inciertos en el desenlace clínico.

Existen al menos 4 razones para sugerir un continuo entre la NAV y la TAV [12].

-Primero, los altos índices de NAV en los pacientes con TAV en comparación con aquéllos que no tienen TAV.

-Segundo, los hallazgos histológicos en estudios en animales y humanos postmortem muestran claramente la coexistencia de estas dos infecciones y las describen como bronconeumonía.

-Tercero, el SOFA elevado, los altos niveles de CPIS y PCT y la mortalidad en NAV comparada con pacientes con TAV sugiere que la TAV podría ser un precursor de la NAV.

-Cuarto, la propia fisiopatología de la NAV también apoya esta hipótesis.

Otros datos sugieren que la TAV podría ser una entidad diferente de la neumonía, que contribuye independientemente a un aumento de la estancia en la UCI y una mayor duración de la ventilación mecánica [1].

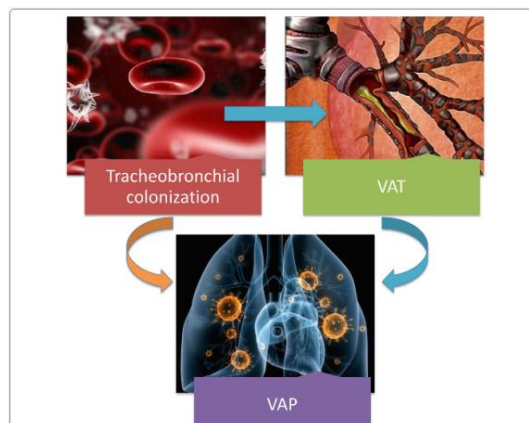


Figura 1: Progresión de la colonización traqueobronquial a TAV y NAV [12]

La respuesta inmune en infecciones respiratorias del paciente crítico.

El tracto respiratorio constituye la segunda mayor superficie mucosa después del tracto gastrointestinal, y sus características varían en función de su localización: en el tracto respiratorio superior se encuentra el tejido linfoide asociado a nariz (NALT) y laringe (LALT), que presenta unas características diferenciales con la mucosa del TRI donde encontramos el tejido linfoide asociado a los bronquios (BALT). Las diferencias radican fundamentalmente en que la parte superior está en contacto directo con la flora comensal de la cavidad orofaríngea, y sin embargo, el tracto inferior es estéril [13] [14].

La infección pulmonar bacteriana ocurre habitualmente tras la inhalación o aspiración de bacterias que han conseguido superar los mecanismos de protección de la vía aérea tales como la tos o el aclaramiento mucociliar, permitiendo la invasión bacteriana de la vía respiratoria inferior.

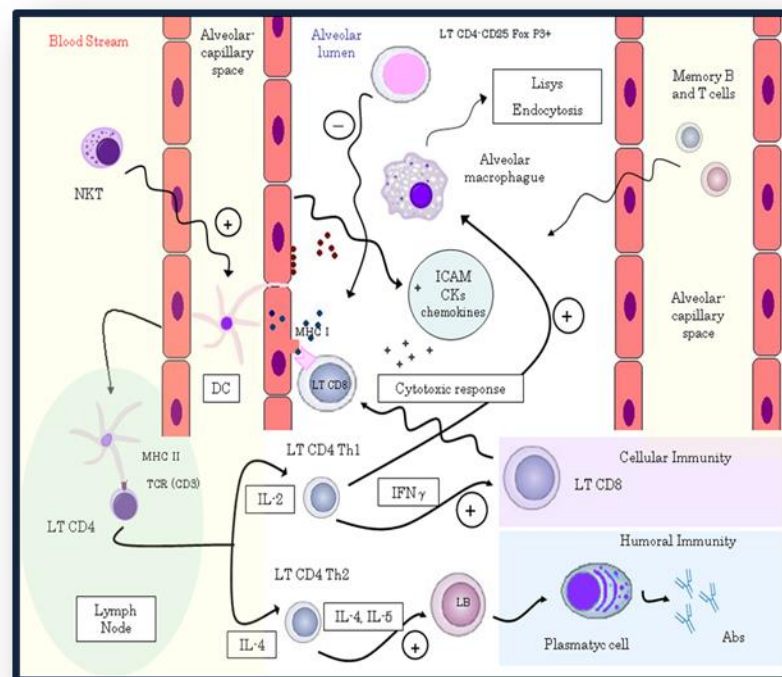


Figura 2: Esquema de la respuesta inmune a las infecciones respiratorias

La primera barrera de defensa inmune lo constituye la presencia de IgA en las secreciones broncoalveolares que evita la adherencia de la bacteria al epitelio por neutralización. La presencia de productos bacterianos genera un estado proinflamatorio a nivel pulmonar que activa la respuesta inmune innata con la actuación de α y β -defensinas (péptidos con acción antimicrobiana), catelicidinas (función quimioatrayente), o surfactante pulmonar (opsonización), todos ellos productos presentes en la mucosa respiratoria, que promueven junto con el sistema fagocítico la resolución de la infección.

A su vez, las células presentadoras de antígeno captan y procesan el antígeno para migrar a órganos linfoides secundarios donde se produce la activación de las células T, y la posterior colaboración con células B para desencadenar una respuesta inmune adaptativa de tipo humoral. A continuación, los anticuerpos junto con las células B y T activadas son recircularizadas hasta alcanzar la cavidad pulmonar donde finalmente, se produce la eliminación efectiva del patógeno con ayuda de las citocinas y factores quimiotácticos liberados. La presencia de IgG1, IgG3 e IgM en el área de infección permite la activación del complemento y la posterior lisis bacteriana (Figura 2).

Existe una evidencia incipiente de que los pacientes críticos y supuestamente inmunocompetentes pueden tener una alteración en su respuesta inmune que les ocasionaría una mayor susceptibilidad al desarrollo de infecciones nosocomiales.

Entre los posibles mecanismos que afectan al funcionamiento del sistema inmune se ha detectado una redistribución y secuestro de células del sistema inmune a tejidos infectados o que han sufrido traumatismos, una disminución de la concentración de inmunoglobulinas y elementos de serie roja y blanca, secundaria a una elevada reposición de volumen y su consiguiente hemodilución, el efecto inmunosupresor de las transfusiones sanguíneas y la administración de fármacos con efecto sobre el sistema inmune.

Por otra parte, no debemos dejar de considerar que el paciente crítico con frecuencia sufre enfermedades crónicas que llevan asociados defectos inmunitarios: EPOC, diabetes, insuficiencia cardiaca congestiva, asma, etc. [15] [16] [17] [18].

Otro aspecto de especial relevancia es el efecto de la ventilación mecánica. Se sabe que la intubación genera un ambiente inflamatorio que afecta a fenómenos esenciales de la respuesta inmune como son la presentación de antígeno y función del linfocito T. Estudios animales muestran como la aplicación de un primer insulto inflamatorio no infeccioso provoca una alteración de la respuesta inmune ante la aparición de una neumonía, bien en forma de una excesiva respuesta (con un aumento del número de neutrófilos alveolares y un marcado aumento de citoquinas proinflamatorias) o bien en forma de una respuesta deficitaria (con un conteo de neutrófilos alveolares y cifras de citoquinas inferiores con respecto a controles). En ambos casos se demuestra una disminución de la capacidad de eliminar bacterias del pulmón [18] [19]

Por tanto, parece que el evento que motiva el ingreso del paciente crítico en la UCI y el uso de medidas terapéuticas (por otra parte imprescindibles desde un punto de vista vital) supone un desequilibrio temporal del sistema inmune confiriendo al huésped una mayor susceptibilidad al desarrollo de infecciones nosocomiales.

Estudio de los perfiles de expresión génica en sangre periférica.

Desde el descubrimiento y caracterización del genoma humano, han surgido nuevas vías de investigación sobre el análisis global del material genético.

El análisis de expresión génica mediante tecnologías de alto rendimiento como los microarrays se ha convertido en una herramienta muy utilizada para crear una imagen global de las funciones celulares que acontecen en una enfermedad en base al estudio de la expresión y activación de miles de genes simultáneamente

En concreto, el estudio de los perfiles de expresión génica en sangre periférica ha demostrado ser una forma útil de entender los procesos patológicos que ocurren en los distintos órganos y sistemas. Es por ello que existen numerosos estudios que utilizan este tipo de aproximaciones para la búsqueda de marcadores moleculares asociados a diferentes enfermedades (cáncer, enfermedades autoinmunes, etc.) [20] [21][22] [23] .

En el caso de las enfermedades infecciosas, el conocimiento de las rutas celulares y las interacciones patógeno-huésped que tienen lugar en un proceso infeccioso es crucial para entender la patogénesis de estas enfermedades [24] [25].

Cuando se produce una infección, las células blancas migran al foco de agresión donde las células dendríticas reconocen los antígenos del patógeno implicado (Figura 3). Desde allí, las células presentadoras de antígeno migran a los nódulos linfoides regionales donde se produce la presentación antigénica a los linfocitos. Estos linfocitos activados salen al sistema linfático por los vasos linfáticos eferentes y, posteriormente, por el conducto torácico llegan a la circulación sanguínea (Figura 3).

Esta re-circulación de las células blancas -desde el sitio de infección a la circulación sanguínea- es lo que hace pensar que el estudio del transcriptoma en sangre periférica puede ser útil para conocer los eventos inmunopatogénicos que acontecen en el órgano afectado.

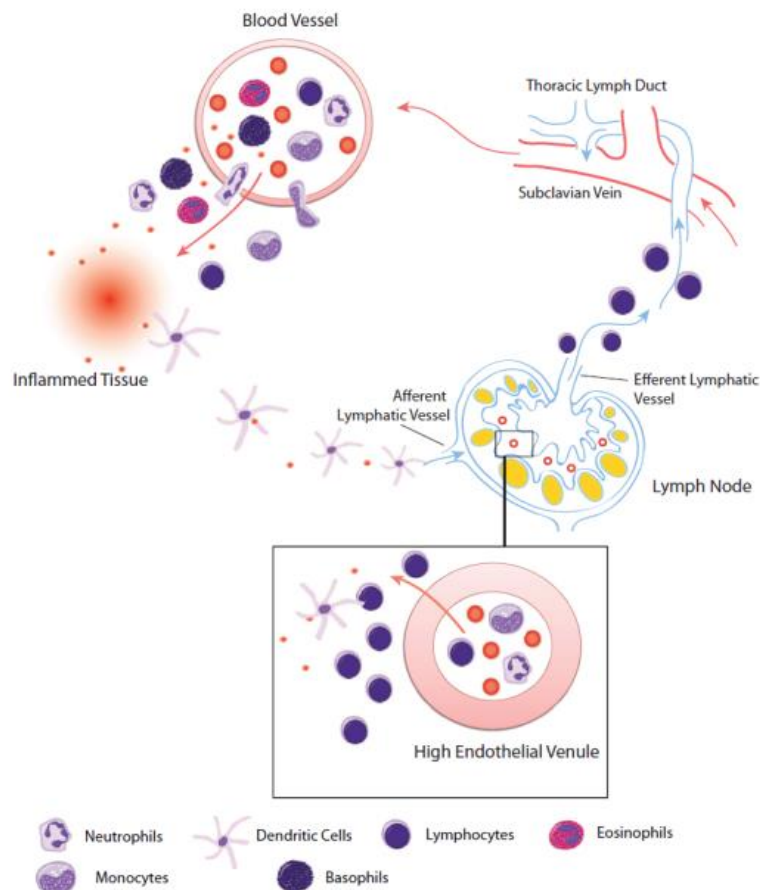


Figura 3: Re-circulación de células blancas.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Con todo lo mencionado hasta ahora, este trabajo parte de la hipótesis de que existen perfiles de expresión génica relacionados con el sistema inmunológico, que caracterizan a los pacientes que desarrollan infecciones respiratorias asociadas a la ventilación mecánica (NAV y TAV).

En base a esta hipótesis nos marcamos los siguientes objetivos:

1. Estudiar los perfiles de expresión génica de la NAV y la TAV.
2. Identificar la huella molecular característica de la infección respiratoria asociada a la ventilación mecánica.
3. Estudiar las alteraciones inmunológicas a nivel molecular que caracterizan a la infección respiratoria asociada a la ventilación mecánica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño del estudio

Se trata de un estudio prospectivo, observacional y multicéntrico en el que se recogieron datos demográficos, clínicos, analíticos y muestras biológicas de tres grupos diferentes de pacientes.

Se reclutó una cohorte de 67 pacientes que requirieron ventilación mecánica invasiva durante su estancia en la UCI desde el año 2013 al 2015, de acuerdo a los siguientes criterios:

Criterios de inclusión: ventilación mecánica más de 48 horas.

Criterios de exclusión: desarrollar una infección en las primeras 48-72 horas desde el inicio de la ventilación, no firmar el consentimiento informado, ser menor de edad.

De estos 67 pacientes, 23 desarrollaron una NAV, 27 una TAV y 17 pacientes nunca se infectaron (CMV). Además, se reclutaron 15 controles sanos, de edad y sexo similar para la posterior normalización de los datos.

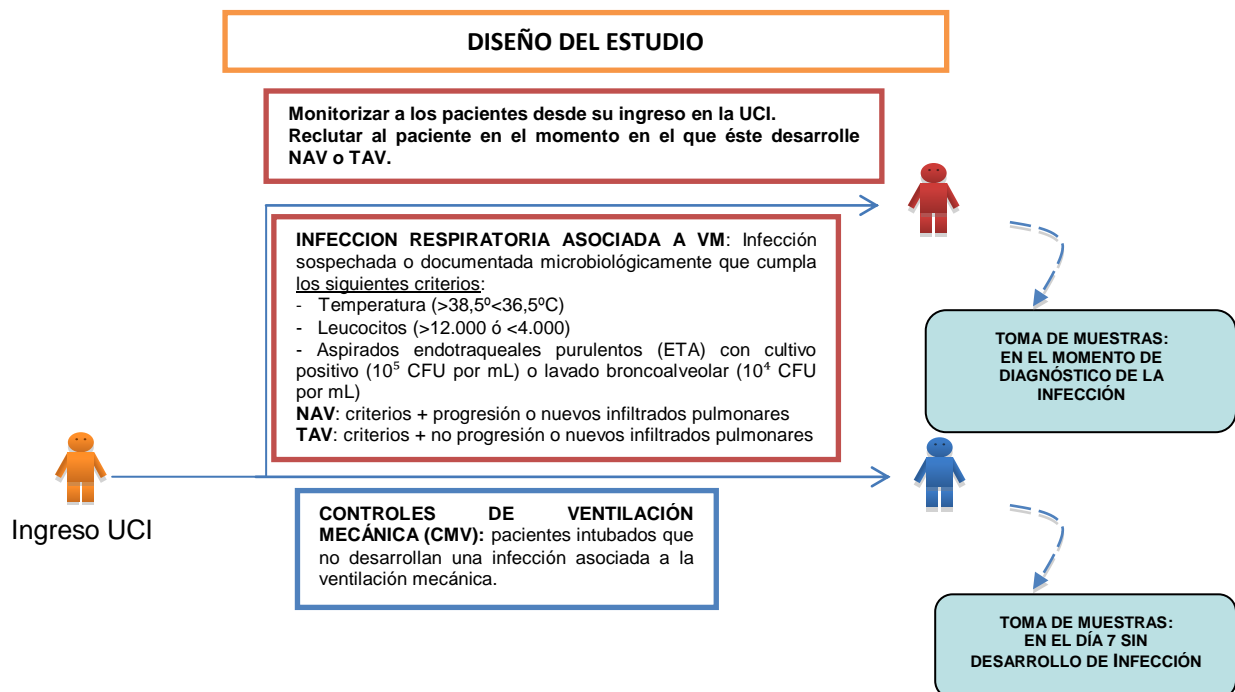


Figura 4: Diseño del estudio

Tabla 1: Procedencia de los pacientes incluidos en el estudio

Hospital de procedencia	Servicio	Tipo de paciente	Nº Pacientes incluidos en el estudio
Hospital Universitario La Fe (Valencia)	Servicio de Cuidados Intensivos	NAV	8
		TAV	5
Hospital Son Llatzer (Palma de Mallorca)	Servicio de Cuidados Intensivos	NAV	4
		TAV	3
Hospital Parc Taulí (Sabadell)	Servicio de Cuidados Intensivos	NAV	5
		TAV	6
Hospital Clínico Universitario (Valladolid)	Servicio de Cuidados Intensivos	NAV	4
		TAV	13
		CMV	17
Hospital Universitario Río Hortega (Valladolid)	Servicio de Cuidados Intensivos	NAV	2

Parámetros clínicos y muestras recogidas

A todos los pacientes que desarrollaron una NAV o TAV se les recogió una muestra de sangre en un tubo PaxGene en el momento del diagnóstico de la infección. El tiempo aproximado para realizar una infección asociada a la ventilación mecánica se calculó en torno a unos 7 días, por lo que para eliminar el factor de confusión que pudiera suponer el tiempo de ventilación mecánica, los tubos PaxGene del grupo de pacientes CMV se recogieron en torno a ese día.

Los tubos PAXgene contienen un aditivo que estabiliza el perfil de transcripción génica in vivo reduciendo la degradación del ARN in vitro y eliminando la inducción de la expresión génica. Este tubo se mantuvo en posición vertical a temperatura ambiente un tiempo mínimo de 2 horas antes de su congelación para asegurar la lisis completa de las células. La temperatura de almacenamiento fue de -80°C.

En paralelo a la recogida de muestras biológicas se recogieron variables clínicas, demográficas y analíticas de los pacientes incluidos en este estudio.

Análisis estadístico de las variables clínicas.

El análisis estadístico de los datos clínicos se llevó a cabo utilizando el programa Microsoft Excel y la versión 20.0 del programa SPSS para Windows. El nivel de significación estadística se fijó en 0,05.

Dado que la población de estudio no presentaba una distribución normal, según el test Shapiro-Wilk, se utilizaron pruebas no paramétricas para el análisis estadístico de los datos. Para comprobar si existían diferencias significativas de las variables cuantitativas se utilizó el test de Mann-Whitney. Para estudiar las diferencias en la distribución de las variables cualitativas se utilizó el test estadístico Chi-Cuadrado.

Técnicas de laboratorio



Figura 5: Flujo de trabajo en el análisis de RNA.

Extracción de ARN mensajero

La extracción de ARN total se realizó a partir de los tubos PAXgene empleando el equipo "PAXgene blood RNA kit". El fundamento de este kit se basa en la adsorción y desorción de los ácidos nucleicos en presencia de sales. En condiciones normales, los ácidos nucleicos están recubiertos de una capa hidratante de moléculas de agua que mantienen su solubilidad en soluciones acuosas. Con la adición de sales a los ácidos nucleicos, se destruye esta ordenada estructura de moléculas de agua de la capa hidratante, por lo que las sales crean un entorno hidrofóbico alrededor de los ácidos nucleicos. Bajo estas condiciones hidrofóbicas, al pasar los ácidos nucleicos a través de una columna con membrana de sílice, los ácidos nucleicos se unen perfectamente a ella, mientras que las proteínas, metabolitos y otros contaminantes no se unen y, por lo tanto, son eliminados de la muestra durante los pasos de lavado.

Para eliminar el ADN de la muestra y obtener únicamente ARN purificado se añade DNasa a la muestra. Posteriormente, el ARN se eluye de la membrana de sílice mediante tampones de elución con baja concentración en sales (ligeramente alcalinos) que permiten recuperar la capa hidratante de los ácidos nucleicos, produciendo así la liberación del ARN. Con este proceso de purificación, se obtiene ARN altamente purificado y listo para usar en procesos posteriores.

Procedimiento

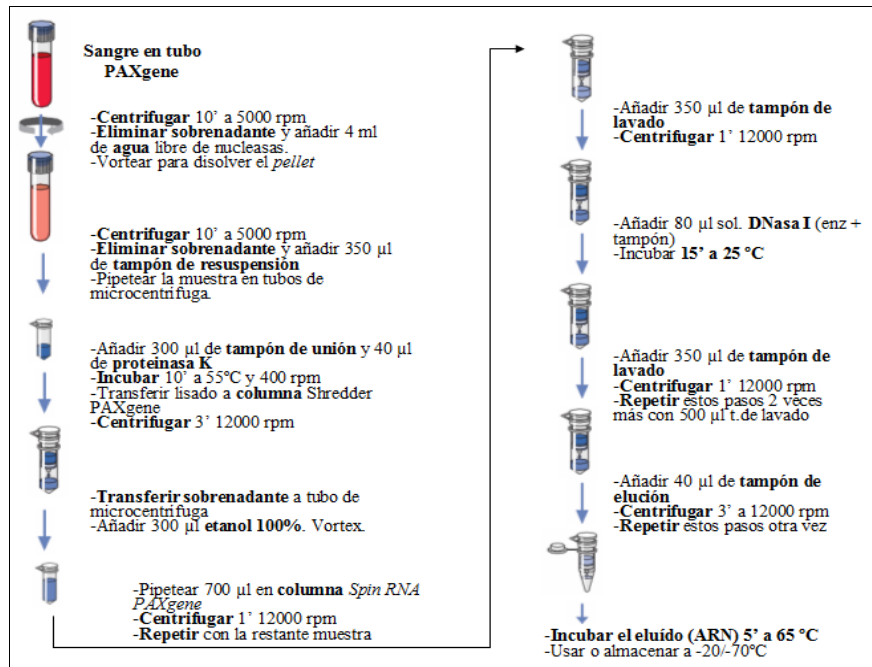


Figura 6: Procedimiento de extracción de ARNm

Evaluación de la calidad y cantidad del ARNm

Evaluación de la calidad: Las reacciones de amplificación de ARN pueden variar considerablemente en función de la integridad y la pureza del ARN de partida. Para evaluar estos parámetros en el ARN obtenido, se realizó una electroforesis automatizada utilizando el Bioanalizador Experion de BioRad (California, EE.UU.).

Esta plataforma realiza todos los pasos de la electroforesis en uno: separación de bandas, tinción y detección de las bandas generadas y lectura y toma de imagen. En este caso, se evaluó la integridad estudiando las bandas de ARNr 28s y 18s. Para considerar que un ARN está intacto, la banda del ARNr 28s debe ser aproximadamente el doble de intensa que la banda de ARNr 18s. Esta proporción 2:1 (28s:18s) es un buen indicador de calidad. Por el contrario, el ARN parcialmente degradado tendrá un aspecto manchado, sin bandas fuertes, o sin guardar la proporción 2:1. El ARN que se encuentre totalmente degradado aparecerá como una mancha de muy bajo peso molecular.

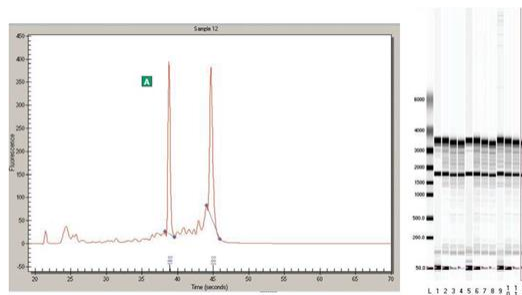


Figura 7: Resultado de la electroforesis

Además de las bandas, el bionalizador Experion proporciona un valor de pureza definido como RQI. Cuanto más próximo a 10 sea este valor, más puro será el ARN, considerándose como buenos los valores comprendidos entre 7 y 10, aceptables entre 4 y 6 e inaceptables entre 1 y 3.

Cuantificación de concentración: Para obtener resultados reproducibles y comparables en los análisis de expresión génica, es necesario utilizar una cantidad fija de ARN en todos los experimentos. Si se adapta un cantidad de ARN fijo y un tiempo de reacción de amplificado y marcaje concreto, se conseguirá la cantidad de ARNc necesaria para el experimento. Para cuantificar el ARN obtenido tras la extracción también se utilizó el bioanalizador Experion, (BioRad, California, EE.UU.) La concentración de ARN de partida recomendada para obtener una cantidad óptima de ARNc (500 ng a 2 g) es 65 y 200 ng/μl, siendo 100 ng/μl la concentración recomendada para los estudios de microarrays.

Procedimiento:

Las muestras de RNA y el "ladder" se desnaturalizaron mediante su incubación durante 2' a 70°C. Inmediatamente después, las muestras se enfriaron durante 5 minutos. Se generó el gel-stain (GS) y se limpiaron los electrodos del aparato según las recomendaciones del fabricante. Los chips utilizados fueron RNA StdSens Chip (Biorad). Cada chip se introdujo en la estación de cebado (Priming Station) donde se añadieron las soluciones tampón, el gel y las muestras (12 por cada chip). Una vez cebado el chip y dispensadas las muestras, se trasladó a la estación de electroforesis donde tuvo lugar la misma y la adquisición de los resultados.

Microarrays de expresión génica

Una vez evaluada la calidad y concentración de las muestras, se procedió a la hibridación de los microarrays de transcriptoma completo. Se trata de una técnica compleja con múltiples pasos que se detallan a continuación (Figura 8)

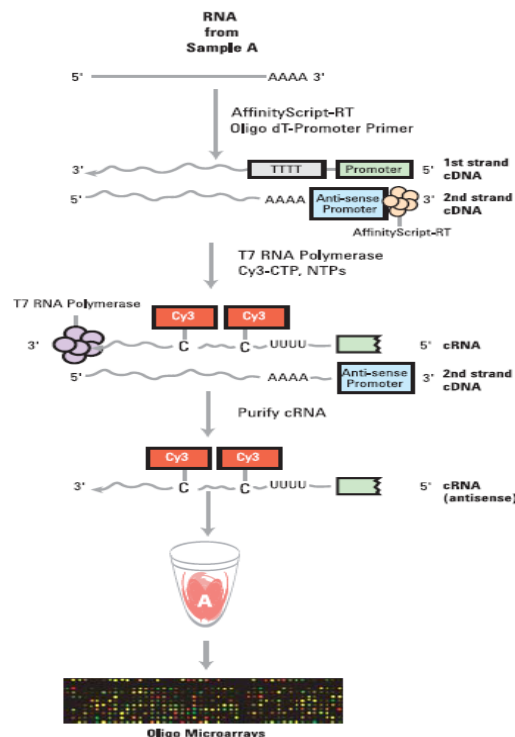


Figura 8: Fases de la hibridación de los microarrays de transcriptoma completo

Procedimiento:

Preparación de las muestras y generación de ADN copia (ADNc). Antes de comenzar con las muestras se prepararon los "Spikes" (controles internos). Se realizaron tres diluciones de la mezcla de controles internos con el buffer de dilución

Se mezclaron 0,5 µL de muestra con 2 µL de la última dilución de los controles internos y 1,8 µL de la mezcla de reacción que contenía los primers y H₂O libre de RNAsas. Esta mezcla se incubó 10' a 65°C. Transcurridos este tiempo, las muestras se mantuvieron en hielo durante 5'. Durante este proceso se preparó el resto de mezcla de reacción cómo se detalla en la siguiente tabla.

Componentes	Volumen µL
5x First Strand Buffer	2
0,1 M DTT	1
10 mM dNTP Mix	0,5
Affinity Script RNase Block Mix	1,2
Volumen total	4,7

Las muestras, junto con los primers y el agua se añadieron a la mezcla generada y se hibridaron durante 2 horas a 40°C y 15' a 70°C para generar el ADNc. Finalizado el proceso, el ADNc se mantuvo en hielo 5'.

Amplificación y marcaje. Se preparó la mezcla de reacción para la amplificación, marcaje y generación del "ARNc sintetizado". Para ello se utilizó el kit Quick Amp Labeling de Agilent (p / n 5190-0442). Se añadió la mezcla al ADNc previamente generado y se mantuvo 2 horas a 40°C.

Componentes	Volumen µL
H2O libre de RNAsas	0,75
5x Transcription Buffer	3,2
0,1 M DTT	0,6
NTP Mix	1
T7 RNA Polimerase Blend	0,21
Cyanine 3 CTP	0,24
Volumen Total	6

Purificación del ARNc. Una vez generado el ARNc marcado con la Cianina se procedió a su purificación mediante la utilización del kit Rneasy MiniKit (Quiagen) siguiendo las indicaciones del fabricante. El rendimiento recomendado para la hibridación de microarrays debe ser 1,65 y la actividad específica 6, según las especificaciones de la casa comercial.

Hibridación. Tras realizar el marcaje y purificación del ARNc, se procedió a hibridar las muestras con los microarrays de expresión génica de humano [Human GE 4x44K v2 Microarray Kit (Agilent p/n G4846A)] de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Previamente, las muestras se incubaron 30' a 60°C en oscuridad con una mezcla de buffer de fragmentación y bloqueo.

Componentes	Volumen μL
ARNc-Cy3	Volumen necesario para 1,65 ng de muestra
H2O libre de RNAsas	Volumen para completar
10X Blocking Agilent Buffer	11
25X Fragmentation Buffer	2,2
Volumen Total	55

Transcurrida la incubación, se añadieron 55 μL de buffer de hibridación (2x GEx hybridization buffer HI-RPM) y se procedió a su incubación con los microarrays.

La forma de cargar las muestras sobre los microarrays es un paso clave para una buena hibridación. En este experimento el formato de los microarrays fue 4x lo que significa que sobre un portaobjetos de cristal ("slide") encontramos 4 microarrays. Se cargaron 100 μL de cada muestra en un cubre de cristal evitando formar burbujas. Posteriormente, se colocó el slide sobre el cubre y este sándwich se transfirió a una cámara de acero necesaria para sellar el cubre con el slide. Las cámaras se introdujeron en el rotor del horno hibridador donde se mantuvieron 17 horas a 65°C y 10 rpm.

Tras la incubación se procedió a los lavados de los slides para eliminar restos de fluorescencia con los buffer 1 y 2 proporcionados por el fabricante. Para ello, los slides se sacaron de las cámaras de acero y se sumergieron en una bañera con el buffer 1 separando el cubre del slide. Inmediatamente después, se introdujeron en una nueva bañera que contenía la solución tampón 1, manteniéndolos en agitación durante 30 segundos. Por último, los slides se transfirieron a una nueva bañera que contenía la solución tampón 2 a 37°C donde se lavaron durante 1' en agitación. Finalmente se secaron cuidadosamente y cada uno de los slides se introdujo en un soporte especial para su escaneado.

Escaneado, procesamiento de la imagen y generación de resultados. Los microarrays se escanearon en la plataforma Agilent G2565BA. Para la extracción de los datos se utilizó el programa "*Feature Extraction 10.7.1.1*" de la misma casa comercial. El protocolo utilizado para la extracción de los datos fue GE1-107_sep09.

Control de calidad de la técnica. Tras el escaneado, el programa "*Feature Extraction*", además de generar los datos de expresión génica de cada una de las muestras, también aporta un documento pdf con información concerniente a la calidad de la técnica. Se evaluaron uno a uno los ficheros de calidad de cada microarray valorando parámetros como la señal neta del microarray, la distribución de la señal media en cada columna y fila del microarray, el ruido de fondo, la reproductibilidad (mediante el porcentaje de variación de sondas control que se encuentran duplicadas en todo el microarray) y la curva de los controles internos (spikes).

Análisis de perfiles de expresión génica

El análisis de datos se llevó a cabo mediante el uso del software GeneSpring GX 12.0. Los datos originales se limpiaron y se normalizaron siguiendo tres pasos:

1. Se restó la intensidad de fondo a cada una de las sondas del array.
2. Los valores de intensidad de señal de cada sonda se transformaron. Para ello, se realizó la normalización con el percentil 75 del valor de intensidad de todo el array, seguido de la transformación logarítmica de los datos.
3. Finalmente, se realizó una transformación basal utilizando la mediana de los niveles de expresión de los 15 controles sanos reclutados.

Tras realizar el pre-procesamiento de las muestras, se evaluó la calidad de los datos mediante un análisis de componentes principales (PCA), comprobando que ninguna muestra de ningún grupo se dispersara de las demás.

Una vez comprobada la calidad de las muestras, se realizaron diferentes filtros de los genes a comparar. Únicamente se analizaron aquellos genes cuyas sondas se hubieran detectado en al menos el 75% de las muestras de un grupo, eliminando también aquellos genes cuyos valores de expresión fueran muy bajos (entre -1 y 1). Se generó una lista final de genes en base a la cual se realizaron las comparaciones estadísticas.

Se compararon los niveles de expresión génica entre el grupo de pacientes con NAV y el grupo de pacientes con TAV. Además, se comparó el grupo de pacientes con infección asociada a la ventilación mecánica (NAV + TAV) y el grupo de controles con ventilación mecánica (CMV). Ambas comparaciones se realizaron mediante el test estadístico Mann-Whitney (GeneSpring GX 12.0). El nivel de significación se fijó en $p < 0,05$, aplicando un test de corrección de pruebas múltiples (Benjamini-Hochberg-FDR). Además, se aplicó un filtro para seleccionar aquellos genes cuyos niveles de expresión en el grupo de pacientes infectados variaban al menos 1.5 veces con respecto a los niveles de expresión del grupo control de pacientes no infectados (“fold change” = 1,5).

Identificación de los genes relacionados con el sistema inmune

Con el objetivo de evaluar la respuesta inmune en estos pacientes, se analizó la lista de genes procedente del análisis bioinformático realizado con GeneSpring GX 12.0 mediante el software bioinformático REACTOME. Esta plataforma es capaz de identificar qué genes están relacionados con diferentes funciones del organismo, entre ellas las del sistema inmune. Así, se identificaron los genes expresados diferencialmente involucrados en la respuesta inmune innata, adaptativa y señalización de citoquinas.

Análisis de rutas intracelulares

Una vez realizadas las comparaciones e identificados los genes relacionados con el sistema inmune, se realizó un análisis de las rutas de señalización intracelular en las que estos genes estaban implicados. Para ello, se utilizó el programa bioinformático DAVID, seleccionando la base de datos KEGG. Mediante el mismo, se analizaron las listas de genes y se identificaron las rutas canónicas diferencialmente expresadas ($p < 0.05$). Este método calcula el valor de significación de una ruta teniendo en cuenta el número de genes que están diferencialmente expresados en el análisis y que participan en la ruta, y el número total de genes que se conoce previamente que intervienen en esa ruta de señalización. Además de identificar las rutas diferencialmente expresadas, KEGG se utilizó para representar estas rutas y estudiar el papel de cada uno de los genes dentro de la vía.

RESULTADOS

Características demográficas, clínicas y analíticas de la población:

Las características de los pacientes incluidos en este estudio se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 2: Descriptivos

	NAV	TAV	CMV	Valor p (NAV vs TAV)	Valor p (NAV vs CMV)	Valor p (TAV vs CMV)
Demográfico						
Edad [años; mediana, (Rango intercuartil)]	55 (22)	58 (19)	68 (27)	n.s.	n.s.	n.s.
Sexo [% hombres]	69,57	74,07	58,87	n.s.	n.s.	n.s.
Comorbilidades [%]						
Diabetes	26,08	11,11	29,41	n.s.	n.s.	n.s.
HTA	0	14,81	29,41	n.s.	0,005	n.s.
EPOC	26,09	7,41	11,76	n.s.	n.s.	n.s.
Fallo hepático	4,35	3,70	17,75	n.s.	n.s.	n.s.
Fallo renal	0	3,70	0	n.s.	n.s.	n.s.
Fallo cardiaco	17,39	11,11	5,88	n.s.	n.s.	n.s.
Inmunosupresión	8,70	3,70	0	n.s.	n.s.	n.s.
Neoplasias	0	3,70	0	n.s.	n.s.	n.s.
Ingreso/Evolución						
Motivo de ingreso [%]						
Médico	78,3	59,3	76,5	n.s.	n.s.	n.s.
Quirúrgico	8,7	14,8	5,9	n.s.	n.s.	n.s.
Traumatismo	13	25,9	17,6	n.s.	n.s.	n.s.
Tiempo de Hospitalización [días; mediana, (Rango intercuartil)]	35,5 (41)	49 (51)	28 (55)	n.s.	n.s.	n.s.
Tiempo de ingreso en UCI [días; mediana, (Rango intercuartil)]	24 (36)	17 (16)	17 (14)	0,050	0,014	n.s.
Tiempo de ventilación mecánica [días; mediana, (Rango intercuartil)]	20 (22)	14 (13)	12 (5)	0,022	0,007	n.s.
APACHE en las primeras 24 horas [mediana, (Rango intercuartil)]	20 (17)	18 (9)	21 (12)	n.s.	n.s.	n.s.
Mortalidad [n exitus]	7	4	4	n.s.	n.s.	n.s.

	NAV	TAV	CMV	Valor p (NAV vs TAV)	Valor p (NAV vs CMV)	Valor p (TAV vs CMV)
Diagnóstico						
Temperatura [°C; mediana, (Rango intercuartil)]	38 (0)	38 (0)	37,5 (1)	n.s.	< 0.1	0,050
Secreciones purulentas [%]	95,7	77,8	5,9	< 0,1	< 0,001	< 0,001
Infiltrados pulmonares [n (%)]	23(100)	5 (18,52)	2 (11,76)	< 0,001	< 0,001	n.s.
CPIS	6 (1)	4 (3)	3 (2)	< 0,001	< 0,001	n.s.
SOFA	6 (5)	5 (3)	4 (5)	n.s.	n.s.	n.s.
Variables analíticas [mediana, (Rango intercuartil)]						
Leucocitos (cells/ μ L)	11600,00 (5640,00)	11890,00 (3500,00)	11110,00 (4510,00)	n.s.	n.s.	n.s.
Linfocitos (cells/ μ L)	1120,00 (612,30)	1259,52 (839,20)	1653,19 (838,69)	n.s.	n.s.	n.s.
Neutrófilos (cells/ μ L)	8622,90 (4624,04)	10170,00 (3563,58)	9032,43 (4473,67)	n.s.	n.s.	n.s.
Basófilos (cells/ μ L)	23,20 (30,00)	12,94 (23,52)	29,94 (29,90)	n.s.	n.s.	0,034
PCR (mg/L)	154,60 (199,36)	67,90 (172,60)	n.d	n.s.	n.d	n.d
PCT (ng/mL)	0,385 (2,20)	0,300 (0,340)	n.d	n.s.	n.d	n.d
Creatinina (mg/dL)	1,00 (0)	1,00 (0)	1,00 (0)	n.s.	n.s.	n.s.

Como se observa en la tabla, los grupos de pacientes presentaron edades y sexo similares, además de las mismas comorbilidades a excepción de la hipertensión, algo más frecuente en los controles de ventilación mecánica.

En cuanto al tiempo de hospitalización, no se observaron diferencias. Sin embargo los pacientes con NAV permanecían más tiempo ingresados en la UCI y requirieron más tiempo de ventilación mecánica.

Los pacientes con NAV tenían niveles significativamente más elevados del índice clínico de infección pulmonar (CPIS) con respecto a las traqueobronquitis y a los pacientes control., además de presentar mayor frecuencia de secreciones purulentas e infiltrados pulmonares.

En cuanto a la microbiología, ninguno de los pacientes control presentó un cultivo positivo, frente a un 60,87 % de los pacientes con NAV y un 69,57 % de los pacientes con TAV. Dentro de los pacientes con NAV con cultivo positivo un 57,14% de las bacterias aisladas fueron gram negativas, un 35,71 % gram positivas y un 7,14 % mixtas. En el caso de las TAV, el 56,25 % de las bacterias identificadas fueron gram negativas, el 31,25 % fueron gram positivas, identificándose bacterias de ambos tipos en un 12,50 % de estos pacientes.

La diversidad de bacterias identificadas en los cultivos de ambos tipos de pacientes se representa en la siguiente figura. Los microorganismos más prevalentes fueron los bacilos gram negativos, aunque el microorganismo individual más frecuente en ambos casos fue *Staphylococcus aureus sensible a meticilina*.

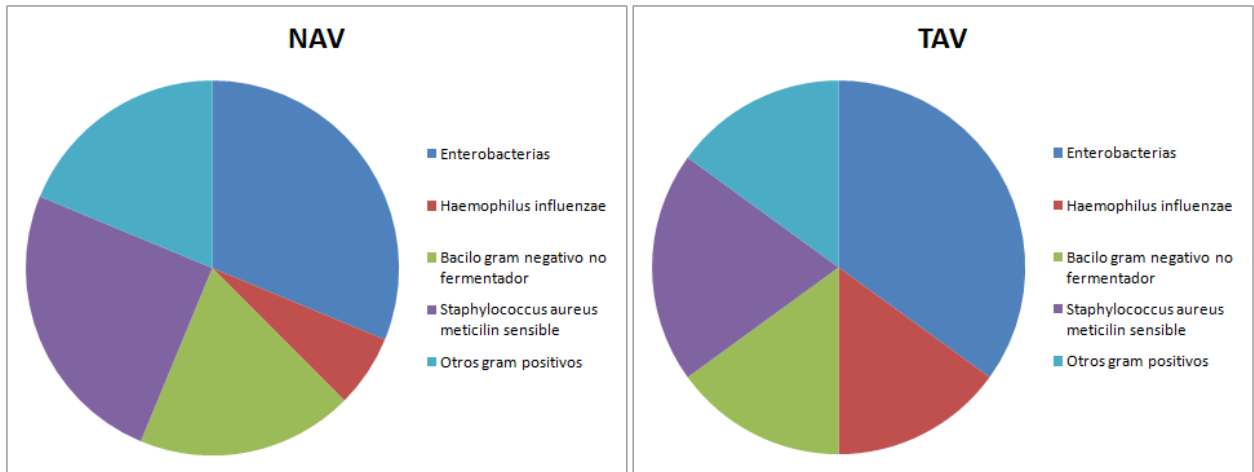


Figura 9: Diversidad bacteriana en la infección asociada a la ventilación mecánica.

Evaluación de los perfiles de expresión génica específicos de la NAV y la TAV:

Cuando se compararon los niveles de expresión génica entre los pacientes que desarrollaron una NAV y los pacientes que desarrollaron TAV, no se encontraron diferencias significativas. Esta falta de diferencias se puede observar cuando se representan los niveles de expresión de todos los genes estudiados en un análisis de componentes principales, viéndose como los pacientes no son capaces de agruparse en función de la expresión global de su transcriptoma.

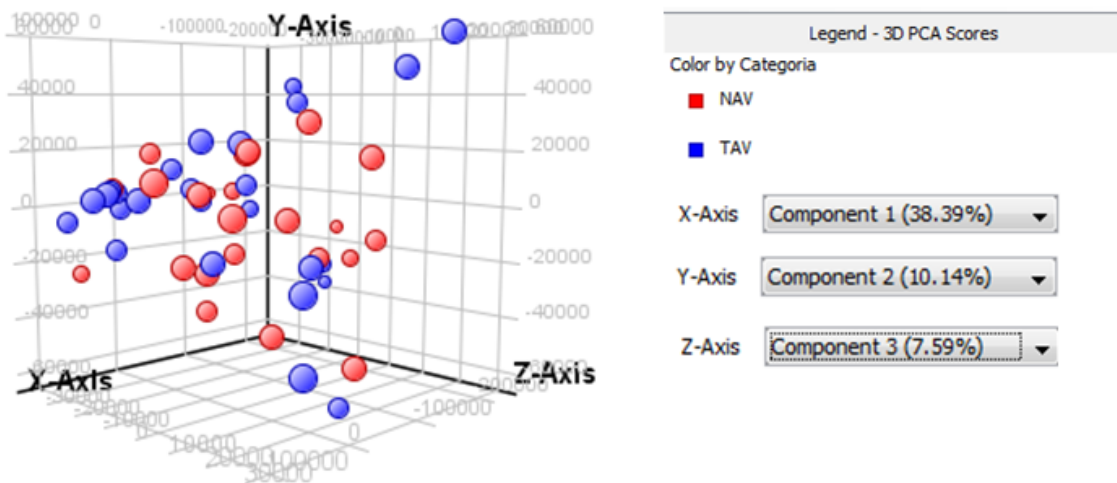


Figura 10: Análisis de Componentes Principales.

Evaluación de los perfiles de expresión génica característicos de las infecciones asociadas a la ventilación mecánica:

Para identificar la huella de expresión génica que caracteriza a las infecciones asociadas a la ventilación mecánica, y dado que no se encontraron diferencias entre las NAV y las TAV, estos dos grupos de pacientes se fusionaron en un uno y se compararon con el grupo de pacientes control.

Tras realizar un test de Mann-Whitney, aplicando un test de corrección de pruebas múltiples (Benjamini-Hochberg-FDR) y fijando un “fold change” de 1.5, se identificaron 1073 genes diferencialmente expresados entre ambos grupos, 819 de los cuales estaban sobre-expresados en el grupo de pacientes con infectados respecto a los controles de ventilación mecánica y 254 genes reprimidos (Figura 11).

En el análisis de cluster se pudo observar como los genes se agrupaban en función de sus niveles de expresión, (por un lado los genes sobreexpresados y por otro los genes reprimidos) y además se observó el comportamiento de los genes respecto a los controles sanos.

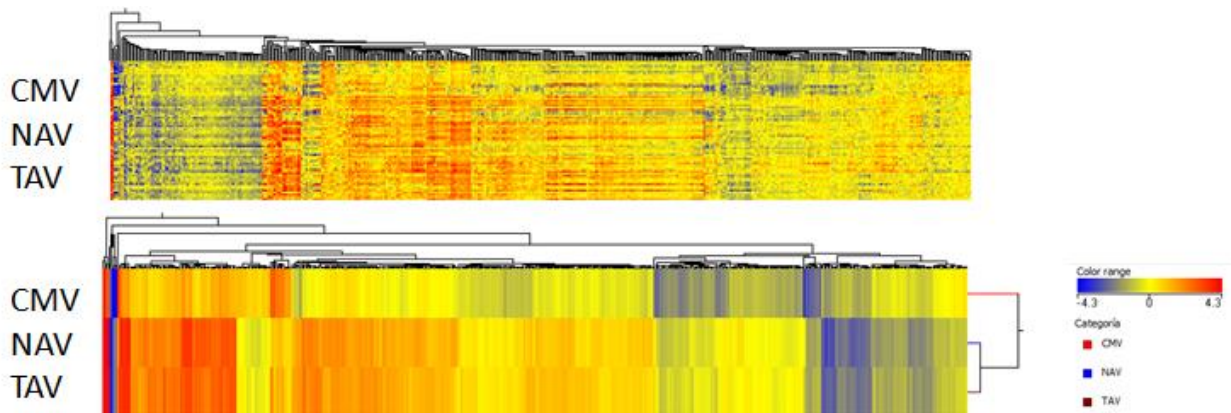


Figura 11: Cluster de los niveles de expresión génica de los 1073 genes en los grupos de pacientes.

Estudio de las alteraciones inmunológicas a nivel molecular de las infecciones asociadas a la ventilación mecánica:

Con el fin de identificar los genes relacionados con el sistema inmune, la lista de genes diferencialmente expresados se analizó en el software REACTOME. Este programa fue capaz de seleccionar 82 genes relacionados con la respuesta inmune innata, adaptativa y con la señalización de citoquinas. 18 de estos genes mostraban niveles de expresión menores en el grupo de los pacientes infectados, mientras que 65 genes estaban sobre-expresados.

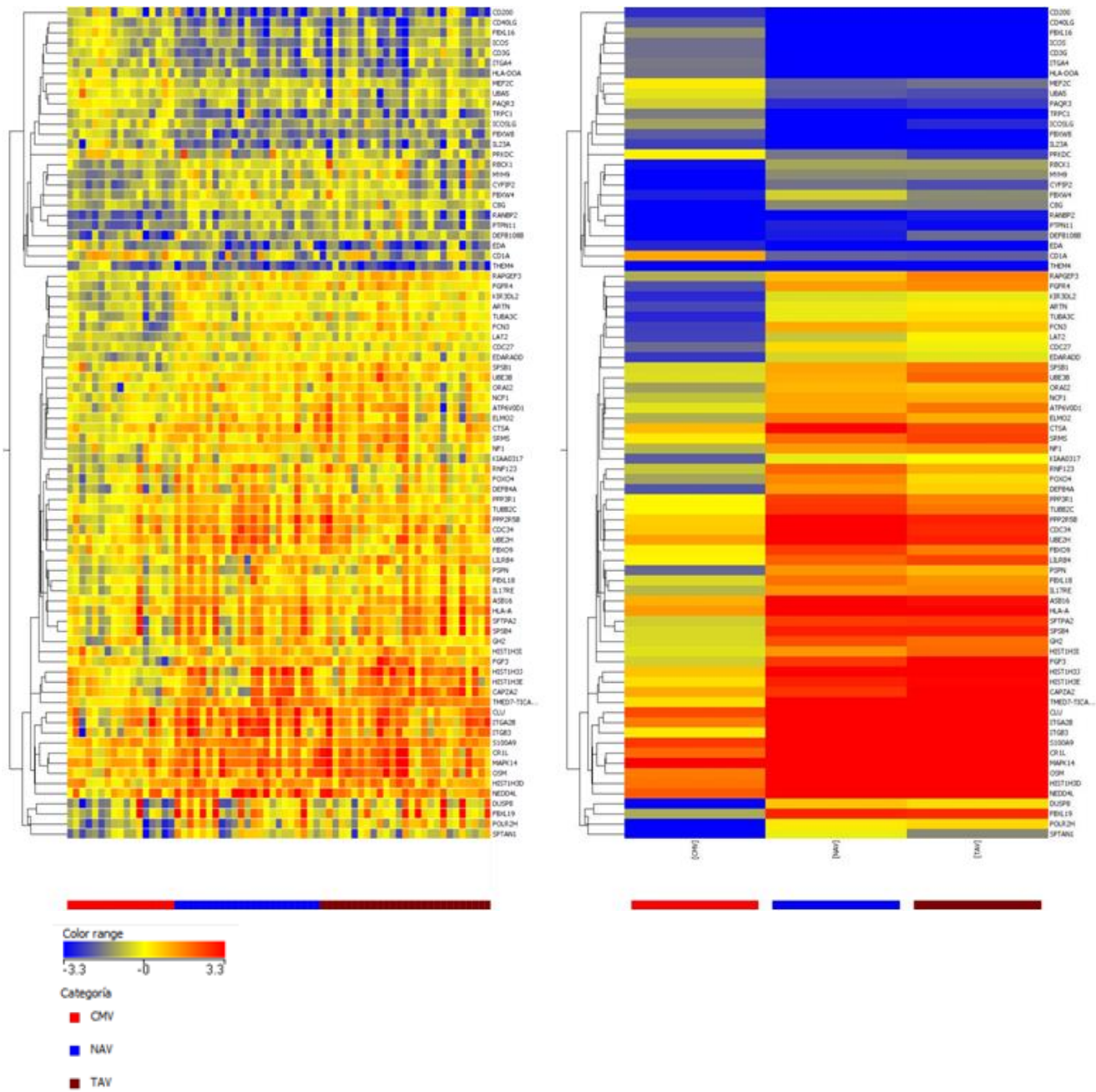


Figura 12: Cluster de los 82 genes relacionados con el sistema inmune en los grupos de pacientes.

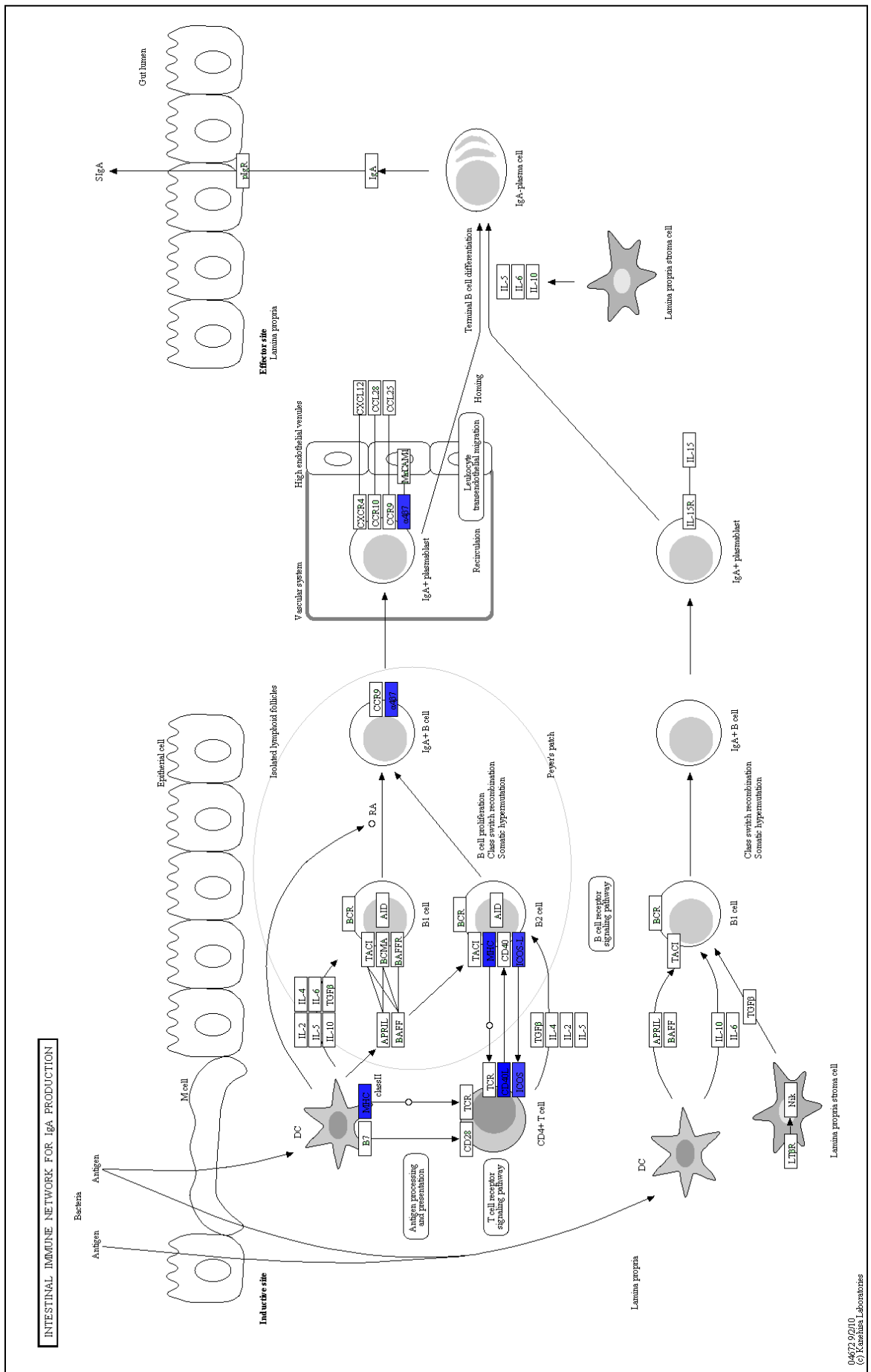
Análisis de rutas intracelulares

Una vez identificados qué genes del sistema inmune se encontraban alterados, el estudio se centró en identificar las rutas intracelulares en las que éstos intervenían. Para ello, se analizó la lista de los 82 genes con el software bioinformático DAVID, en base a la información almacenada en KEGG. DAVID identificó como primera ruta de señalización alterada la ruta “Intestinal immune network for IgA production”.

Tabla 3: Ruta de señalización intracelular más significativa según DAVID.

Ruta	Nº Genes detectados	%	PValor	Genes		
				Símbolo	FC	Descripción
Intestinal immune network for IgA production	5	1,98	<0,001	ICOS	1,60	Homo sapiens inducible T-cell co-stimulator
				ICOSL	1,53	inducible T-cell co-stimulator ligand
				HLA-DOA	1,74	Homo sapiens major histocompatibility complex, class II, DO alph
				CD40L	1,81	Homo sapiens CD40 ligand
				ITGA4	1,65	Homo sapiens integrin, alpha 4 (antigen CD49D, alpha 4 subunit of VLA-4 receptor)

Figura 13: Representación de la ruta "Intestinal immune network for IgA production".



04672.9/210
© Kanahisa Laboratories

DISCUSIÓN

Todavía se desconoce si la NAV y la TAV son dos entidades distintas o si la traqueobronquitis es un estadio intermedio entre la colonización del tracto respiratorio inferior y la neumonía. Además, seguimos sin saber por qué algunos pacientes intubados no sufren infecciones mientras que otros presentan estas complicaciones. Para avanzar en el conocimiento de la fisiopatología de las infecciones respiratorias asociadas a la ventilación mecánica, la integración de la información clínica con la información de los genes o rutas de señalización intracelular que se activan o reprimen en respuesta a la infección puede ser de gran ayuda.

El análisis de expresión génica por microarrays, permite obtener una gran cantidad de información de forma simultánea sobre la respuesta inmune del huésped y las rutas de señalización intracelular que se alteran tras la infección. Esta aproximación se ha utilizado para estudiar otras infecciones como la sepsis post quirúrgica [26] o infecciones respiratorias como las causadas por el SARS [27] o la gripe [28], entre otras muchas patologías. Estas herramientas de análisis masivo, además de ser útiles para entender los procesos fisiopatológicos de determinadas enfermedades, permiten identificar nuevos biomarcadores que posteriormente pueden ser analizados por otras técnicas más sencillas para su utilización en la práctica clínica.

En este estudio se integró la información clínica de los pacientes que desarrollaron una infección asociada a la ventilación mecánica con la información génica, utilizando microarrays de transcriptoma humano completo sobre ARNm de células de sangre periférica.

Como ya se ha comentado en apartados anteriores, la NAV y la TAV son dos patologías muy difíciles de distinguir clínicamente. Es por ello que el primer objetivo de este estudio fue estudiar si la neumonía asociada a la ventilación mecánica era diferente, desde el punto de vista molecular, a la traqueobronquitis. Sin embargo, tras el análisis bioinformático, no se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos de pacientes. Este resultado concuerda con la ausencia de diferencias significativas en la mayoría de las características clínicas estudiadas. Ni la edad, ni el sexo, ni la presencia de comorbilidades se relacionó con desarrollar una neumonía o traqueobronquitis tras la intubación de los pacientes. Tampoco se encontraron diferencias en la gravedad de los pacientes al ingreso (APACHE II), ni en el índice de fallo de órgano en el momento del diagnóstico (índice SOFA).

A pesar de que la NAV se asocia con una mayor morbilidad y duración de la ventilación mecánica en la Unidad de Cuidados Intensivos (UCI) [29], se ha propuesto que la traqueobronquitis es un estadio intermedio entre la colonización del tracto respiratorio inferior y la neumonía [12].

En este estudio, aunque no existieron diferencias en el tiempo de hospitalización ni en la mortalidad, posiblemente debido a que ambos grupos de pacientes ingresaron por otros motivos independientes al desarrollo de la infección (traumatismos, complicaciones quirúrgicas...), los pacientes que desarrollaron una NAV si permanecieron más tiempo ingresados en la UCI y presentaron un mayor tiempo de ventilación mecánica. Además los pacientes con NAV tenían niveles significativamente más elevados del índice clínico de infección pulmonar (CPIS) con respecto a las traqueobronquitis y a los pacientes control y una mayor frecuencia de secreciones purulentas e infiltrados pulmonares. Todos estos datos concuerdan con lo descrito en la literatura hasta el momento. [12].

Estos resultados, unidos a la ausencia de diferencias significativas en los niveles de expresión génica podría reforzar la idea que la NAV y la TAV son la misma entidad pero en diferentes estadios, tratándose de un continuo de la enfermedad a lo largo del tiempo. Sin embargo, sería necesario disponer de un mayor tamaño muestral para poder corroborar estos hallazgos e identificar diferencias más pequeñas entre ambas patologías.

El segundo objetivo de este estudio fue identificar las huellas moleculares de la infección asociada a la ventilación mecánica. Actualmente, el diagnóstico de NAV y TAV, al igual que en otras patologías, supone un reto para los clínicos. Debido a que no existe un gold standard para la detección precoz de la infección, se han propuesto algunos biomarcadores como la PCR y la PCT. Sin embargo, estas moléculas presentan una gran sensibilidad pero una baja especificidad, ya que, pueden verse elevadas en multitud de patologías infecciosas y no infecciosas (pancreatitis, isquemia, traumatismos, quemaduras [30]). Por todo esto, la combinación de biomarcadores es una buena estrategia para mejorar la sensibilidad y especificidad de los mismos a la hora de detectar la infección.

En este trabajo se identificaron 1073 genes diferencialmente expresados entre los pacientes controles y los pacientes que desarrollaron una infección asociada a ventilación mecánica. La validación de estos genes mediante otras técnicas más rápidas y sencillas podría dar lugar a la identificación de nuevos biomarcadores que permitiesen mejorar el diagnóstico de las infecciones asociadas a la ventilación mecánica. Actualmente, en el laboratorio de Investigación Médica en Infección e Inmunidad estamos seleccionando algunos de estos genes y cuantificando sus niveles de expresión por PCR digital, una técnica que permite cuantificar de forma absoluta y sin necesidad de curva patrón los niveles de expresión génica, con el fin de analizar su sensibilidad y especificidad para diagnosticar la infección asociada a la ventilación mecánica.

Por último, como tercer objetivo de este trabajo se planteó estudiar las alteraciones inmunológicas a nivel molecular que caracterizaron a los pacientes que desarrollaron una infección asociada a la ventilación mecánica, realizando un estudio de los genes implicados en la respuesta inmune.

Como se ha mencionado a lo largo de la introducción, existe una evidencia incipiente de que los pacientes críticos pueden tener una alteración en su respuesta inmune que les ocasionaría una mayor susceptibilidad al desarrollo de infecciones nosocomiales. Cada vez más, se piensa que el paciente crítico, y en concreto, el paciente intubado, puede presentar un estado de inmunodepresión, el cual podría favorecer que ciertos pacientes desarrollen una infección asociada a la ventilación mecánica. Estas alteraciones en el sistema inmune pueden manifestarse a través de una alteración de la expresión génica [31].

A excepción de los escasos datos referentes a la utilización de biomarcadores de inflamación para el diagnóstico y pronóstico de las infecciones asociadas a la ventilación mecánica [32], casi no existen estudios que evalúen la presencia de defectos en la respuesta inmune del paciente crítico y su efecto en la evolución de la infección asociada a la ventilación mecánica.

Mediante REACTOME se seleccionaron 82 moléculas de la lista total de genes diferencialmente expresados que participaban en la respuesta inmune innata, adaptativa y señalización de citoquinas. El análisis de rutas de señalización intracelular, mediante el programa bioinformático DAVID, identificó como la ruta de señalización más significativa la ruta denominada "Intestinal immune network for IgA production". Los genes que participaban en esta ruta presentaban niveles de expresión más bajos en los pacientes infectados. En concreto,

los genes que codifican HLA-DOA, ICOS, ICOSL y CD40L estaban deprimidos. Todas estas moléculas están implicadas en la sinapsis inmunológica.

El gen HLA-DOA es el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase II DO alfa. Está implicado en la modulación de la ruta de presentación de antígenos a través de las moléculas HLA de clase II, por la interacción con HLA-DMB [32]. Se sabe que en el desarrollo de la neumonía nosocomial, además de la modificación de la microbiota orofaríngea por el uso prolongado de antibióticos, se produce una inmunosupresión temporal que se manifiesta por una disminución de la expresión de algunos marcadores de superficie celulares como MHC de clase II (HLA-DR) en monocitos y macrófagos alveolares [33]

La molécula ICOS es un receptor de células T, que mejora todas las respuestas básicas de las células T a un antígeno extraño (la proliferación, secreción de linfocinas, sobre-regulación de las moléculas que median la interacción célula-célula, y una ayuda eficaz para la secreción de anticuerpos por las células B). Es esencial tanto para una interacción eficiente entre las células T y las células B, como para respuestas normales de anticuerpos a antígenos dependientes de células T. No regula la producción de IL- 2, pero superinduce la síntesis de IL-10. Previene la apoptosis de las células T previamente activadas y juega un papel fundamental en el “switching” de isotipos de inmunoglobulinas mediado por CD40 [34]

El gen ICOSL es un ligando del receptor específico de células T ICOS. Actúa como señal coestimuladora para la proliferación de células T y la secreción de citoquinas. Induce la proliferación de células B y su diferenciación a células plasmáticas. Podría jugar también un papel importante en la mediación de respuestas locales en condiciones inflamatorias, así como en la modulación de la respuesta inmune secundaria por coestimulación de células T memoria [35]

La molécula CD40L se expresa en la superficie de células T. Regula la función de las células B mediante su interacción con CD40 presente en estas células, y media su proliferación en ausencia de coestímulos así como la producción de IgE en presencia de IL-4. Está involucrada en el “switching” de inmunoglobulinas [36].

La baja expresión de estos genes en los pacientes infectados, podría indicar la existencia de un defecto en la sinapsis inmunológica a nivel sistémico, necesaria para una correcta presentación de antígeno y, en definitiva, una correcta respuesta adaptativa. Este proceso es clave para evitar la progresión de la infección y la eliminación de los microorganismos [37].

Estos resultados apoyarían la idea de que los pacientes críticos que desarrollan una NAV o una TAV tienen un cierto grado de inmunosupresión y explicaría que estos pacientes se infecten mientras que otros pacientes intubados no. Será necesario estudiar cuáles fueron los motivos por los cuales estos pacientes presentaron ese perfil y realizar estudios funcionales en modelos animales para aclarar qué papel tienen estas alteraciones en el desarrollo de la infección asociada a la ventilación mecánica. En todo caso, los perfiles de expresión génica diferencial descritos en este trabajo podrían utilizarse clínicamente como huellas moleculares de infección asociada a la ventilación mecánica.

CONCLUSIONES

Se identificó una huella molecular característica de la infección asociada a la ventilación mecánica, basada en la alteración de los niveles de expresión génica de 1073 genes. El futuro estudio de dichos genes podría ser útil para identificar biomarcadores de infección.

Los pacientes que desarrollaron una infección asociada a la ventilación mecánica mostraron alteraciones en los niveles de expresión génica de 82 genes implicados en la respuesta inmune.

Estas alteraciones se caracterizaron principalmente por la depresión de genes relacionados con la sinapsis inmunológica (HLA de clase II, ICOS, ICOSL y CD40L) en los pacientes que desarrollaron una neumonía o una traqueobronquitis asociada a la ventilación mecánica.

Este estudio demuestra que la transcriptómica es una herramienta útil para identificar posibles marcadores de infección asociada a la ventilación mecánica.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] I. Martín-Loeches, P. Povoá, A. Rodríguez, D. Curcio, D. Suarez, J.-P. Mira, M. L. Cordero, R. Lepecq, C. Girault, C. Candeias, P. Seguin, C. Paulino, J. Messika, A. G. Castro, J. Valles, L. Coelho, L. Rabello, T. Lisboa, D. Collins, A. Torres, J. Salluh, and S. Nseir, TAVeM study, “Incidence and prognosis of ventilator-associated tracheobronchitis (TAVeM): a multicentre, prospective, observational study,” *Lancet Respir. Med.*, vol. 3, no. 11, pp. 859–868, Nov. 2015.
- [2] “ESTUDIO NACIONAL DE VIGILANCIA DE INFECCIÓN NOSOCOMIAL EN SERVICIOS DE MEDICINA INTENSIVA,” SOCIEDAD ESPAÑOLA DE MEDICINA INTENSIVA CRÍTICA Y UNIDADES CORONARIAS (SEMICYUC). GRUPO DE TRABAJO DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS Y SEPSIS, INFORME 2015.
- [3] J. R. Edwards, K. D. Peterson, Y. Mu, S. Banerjee, K. Allen-Bridson, G. Morrell, M. A. Dudeck, D. A. Pollock, and T. C. Horan, “National Healthcare Safety Network (NHSN) report: data summary for 2006 through 2008, issued December 2009,” *Am. J. Infect. Control*, vol. 37, no. 10, pp. 783–805, Dec. 2009.
- [4] D. K. Heyland, D. J. Cook, L. Griffith, S. P. Keenan, and C. Brun-Buisson, “The attributable morbidity and mortality of ventilator-associated pneumonia in the critically ill patient. The Canadian Critical Trials Group,” *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, vol. 159, no. 4 Pt 1, pp. 1249–1256, Apr. 1999.
- [5] N. Safdar, C. Dezfulian, H. R. Collard, and S. Saint, “Clinical and economic consequences of ventilator-associated pneumonia: a systematic review,” *Crit. Care Med.*, vol. 33, no. 10, pp. 2184–2193, Oct. 2005.
- [6] J. Rello, H. Lode, G. Cornaglia, and R. Masterton, VAP Care Bundle Contributors, “A European care bundle for prevention of ventilator-associated pneumonia,” *Intensive Care Med.*, vol. 36, no. 5, pp. 773–780, May 2010.
- [7] D. Bird, A. Zambuto, C. O’Donnell, J. Silva, C. Korn, R. Burke, P. Burke, and S. Agarwal, “Adherence to ventilator-associated pneumonia bundle and incidence of ventilator-associated pneumonia in the surgical intensive care unit,” *Arch. Surg. Chic. Ill 1960*, vol. 145, no. 5, pp. 465–470, May 2010.
- [8] M. H. Kollef, B. Afessa, A. Anzueto, C. Veremakis, K. M. Kerr, B. D. Margolis, D. E. Craven, P. R. Roberts, A. C. Arroliga, R. D. Hubmayr, M. I. Restrepo, W. R. Auger, and R. Schinner, NASCENT Investigation Group, “Silver-coated endotracheal tubes and incidence of ventilator-associated pneumonia: the NASCENT randomized trial,” *JAMA*, vol. 300, no. 7, pp. 805–813, Aug. 2008.

- [9] E. L. Kuti, A. A. Patel, and C. I. Coleman, "Impact of inappropriate antibiotic therapy on mortality in patients with ventilator-associated pneumonia and blood stream infection: a meta-analysis," *J. Crit. Care*, vol. 23, no. 1, pp. 91–100, Mar. 2008.
- [10] M. Ioanas, M. Ferrer, M. Cavalcanti, R. Ferrer, S. Ewig, X. Filella, J. P. de la Bellacasa, and A. Torres, "Causes and predictors of nonresponse to treatment of intensive care unit-acquired pneumonia," *Crit. Care Med.*, vol. 32, no. 4, pp. 938–945, Apr. 2004.
- [11] G. Gursel, M. Aydogdu, E. Ozyilmaz, and T. N. Ozis, "Risk factors for treatment failure in patients with ventilator-associated pneumonia receiving appropriate antibiotic therapy," *J. Crit. Care*, vol. 23, no. 1, pp. 34–40, Mar. 2008.
- [12] S. Nseir, P. Pova, J. Salluh, A. Rodriguez, and I. Martin-Loeches, "Is there a continuum between ventilator-associated tracheobronchitis and ventilator-associated pneumonia?," *Intensive Care Med.*, vol. 42, no. 7, pp. 1190–1192, Jul. 2016.
- [13] M. F. Cesta, "Normal structure, function, and histology of mucosa-associated lymphoid tissue," *Toxicol. Pathol.*, vol. 34, no. 5, pp. 599–608, 2006.
- [14] P. Brandtzaeg, E. S. Baekkevold, I. N. Farstad, F. L. Jahnsen, F. E. Johansen, E. M. Nilsen, and T. Yamanaka, "Regional specialization in the mucosal immune system: what happens in the microcompartments?," *Immunol. Today*, vol. 20, no. 3, pp. 141–151, Mar. 1999.
- [15] Martin-Loeches I, Uildemolins M, Diaz E, "A new approach to ventilator-associated pneumonia based on the PIRO system.," in *In Annual update in intensive care and emergency medicine 2011*, 1st ed., Ed Springer, pp. 481–492.
- [16] E. C. Vamvakas and M. A. Blajchman, "Transfusion-related immunomodulation (TRIM): an update," *Blood Rev.*, vol. 21, no. 6, pp. 327–348, Nov. 2007.
- [17] G. Monneret, F. Venet, B.-J. Kullberg, and M. G. Netea, "ICU-acquired immunosuppression and the risk for secondary fungal infections," *Med. Mycol.*, vol. 49 Suppl 1, pp. S17–23, Apr. 2011.
- [18] R. Renckens, D. J. van Westerloo, J. J. T. H. Roelofs, J. M. Pater, M. J. Schultz, S. Florquin, and T. van der Poll, "Acute phase response impairs host defense against *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia in mice," *Crit. Care Med.*, vol. 36, no. 2, pp. 580–587, Feb. 2008.
- [19] P. Ramírez, M. Ferrer, R. Gimeno, S. Tormo, M. Valencia, R. Piñer, R. Menendez, and A. Torres, "Systemic inflammatory response and increased risk for ventilator-associated pneumonia: a preliminary study," *Crit. Care Med.*, vol. 37, no. 5, pp. 1691–1695, May 2009.
- [20] D. Sharon, R. Chen, and M. Snyder, "Systems biology approaches to disease marker discovery," *Dis. Markers*, vol. 28, no. 4, pp. 209–224, 2010.
- [21] P. K. Kreeger and D. A. Lauffenburger, "Cancer systems biology: a network modeling perspective," *Carcinogenesis*, vol. 31, no. 1, pp. 2–8, Jan. 2010.

- [22] V. C. Kytтарыs, S. Krishnan, and G. C. Tsokos, "Systems biology in systemic lupus erythematosus: integrating genes, biology and immune function," *Autoimmunity*, vol. 39, no. 8, pp. 705–709, Dec. 2006.
- [23] F. J. Quintana, M. F. Farez, and H. L. Weiner, "Systems biology approaches for the study of multiple sclerosis," *J. Cell. Mol. Med.*, vol. 12, no. 4, pp. 1087–1093, Aug. 2008.
- [24] Q. Yan, "Immunoinformatics and systems biology methods for personalized medicine," *Methods Mol. Biol. Clifton NJ*, vol. 662, pp. 203–220, 2010.
- [25] T. Sakata and E. A. Winzeler, "Genomics, systems biology and drug development for infectious diseases," *Mol. Biosyst.*, vol. 3, no. 12, pp. 841–848, Dec. 2007.
- [26] R. Almansa, M. Heredia-Rodríguez, E. Gomez-Sanchez, D. Andaluz-Ojeda, V. Iglesias, L. Rico, A. Ortega, E. Gomez-Pesquera, P. Liu, M. Aragón, J. M. Eiros, M. Á. Jiménez-Sousa, S. Resino, I. Gómez-Herreras, J. F. Bermejo-Martín, and E. Tamayo, "Transcriptomic correlates of organ failure extent in sepsis," *J. Infect.*, vol. 70, no. 5, pp. 445–456, May 2015.
- [27] M. J. Cameron, J. F. Bermejo-Martin, A. Danesh, M. P. Muller, and D. J. Kelvin, "Human immunopathogenesis of severe acute respiratory syndrome (SARS)," *Virus Res.*, vol. 133, no. 1, pp. 13–19, Apr. 2008.
- [28] J. F. Bermejo-Martin, I. Martin-Loeches, J. Rello, A. Antón, R. Almansa, L. Xu, G. Lopez-Campos, T. Pumarola, L. Ran, P. Ramirez, D. Banner, D. C. Ng, L. Socias, A. Loza, D. Andaluz, E. Maravi, M. J. Gómez-Sánchez, M. Gordón, M. C. Gallegos, V. Fernandez, S. Aldunate, C. León, P. Merino, J. Blanco, F. Martin-Sanchez, L. Rico, D. Varillas, V. Iglesias, M. Á. Marcos, F. Gandía, F. Bobillo, B. Nogueira, S. Rojo, S. Resino, C. Castro, R. Ortiz de Lejarazu, and D. Kelvin, "Host adaptive immunity deficiency in severe pandemic influenza," *Crit. Care Lond. Engl.*, vol. 14, no. 5, p. R167, 2010.
- [29] C. Pierrakos and J.-L. Vincent, "Sepsis biomarkers: a review," *Crit. Care Lond. Engl.*, vol. 14, no. 1, p. R15, 2010.
- [30] I. Martin-Loeches, E. Papiol, R. Almansa, G. López-Campos, J. F. Bermejo-Martin, and J. Rello, "Intubated patients developing tracheobronchitis or pneumonia have distinctive complement system gene expression signatures in the pre-infection period: a pilot study," *Med. Intensiva Soc. Esp. Med. Intensiva Unidades Coronarias*, vol. 36, no. 4, pp. 257–263, May 2012.
- [31] C.-E. Luyt, V. Guérin, A. Combes, J.-L. Trouillet, S. B. Ayed, M. Bernard, C. Gibert, and J. Chastre, "Procalcitonin kinetics as a prognostic marker of ventilator-associated pneumonia," *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, vol. 171, no. 1, pp. 48–53, Jan. 2005.
- [32] R. G. Wunderink, "Nosocomial pneumonia, including ventilator-associated pneumonia," *Proc. Am. Thorac. Soc.*, vol. 2, no. 5, pp. 440–444, 2005.
- [33] "HLA-DOA Gene - GeneCards | DOA Protein | DOA Antibody." [Online]. Available: <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=HLA-DOA>. [Accessed: 03-Jul-2016].

[34] “ICOS Gene - GeneCards | ICOS Protein | ICOS Antibody.” [Online]. Available: <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=ICOS>. [Accessed: 03-Jul-2016].

[35] “ICOSLG Gene - GeneCards | ICOSL Protein | ICOSL Antibody.” [Online]. Available: <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=ICOSLG>. [Accessed: 03-Jul-2016].

[36] “CD40LG Gene - GeneCards | CD40L Protein | CD40L Antibody.” [Online]. Available: <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CD40LG>. [Accessed: 03-Jul-2016].

[37] H. Y. Lee, D. J. Topham, S. Y. Park, J. Hollenbaugh, J. Treanor, T. R. Mosmann, X. Jin, B. M. Ward, H. Miao, J. Holden-Wiltse, A. S. Perelson, M. Zand, and H. Wu, “Simulation and prediction of the adaptive immune response to influenza A virus infection,” *J. Virol.*, vol. 83, no. 14, pp. 7151–7165, Jul. 2009.