

TRABAJO DE FIN DE GRADO

SUSCEPTIBILIDAD DEL TLR-4 EN EL DESARROLLO DE SHOCK SÉPTICO.



AUTOR: ÁLVARO TAMAYO VELASCO
TUTOR: DR JOSÉ MARÍA EIROS BOUZA

RESUMEN

Introducción: TLR-4 es un receptor transmembranoso que forma parte de la inmunidad innata. Su función es reconocer patrones moleculares expresados por agentes bacterianos y, seguidamente, estimular una respuesta inflamatoria. Nuestro objetivo es analizar si el polimorfismo TLR-4 rs4986790 se asocia al desarrollo de shock séptico tras una cirugía mayor.

Métodos: se realiza un estudio de casos y controles en 467 pacientes sometidos a cirugía cardíaca o abdominal. De ellos, 205 pacientes desarrollaron shock séptico (casos) y 262 pacientes desarrollaron SIRS (Controles). El polimorfismo TLR-4 rs4986790 fue genotipado por MassARRAY. El análisis de asociación se realizó bajo un modelo genético dominante (AG / GG vs. AA).

Resultados: el genotipo TLR-4 rs4986790 AG / GG se asocia con una menor probabilidad de shock séptico en el análisis de los pacientes sometidos, únicamente, a cirugía abdominal [odds ratio ajustado (aOR) = 2.6 (IC del 95% = 1,75; 6,289; p = 0,034], pero no en el total de pacientes (p = 0,059) o estratificando a los sometidos a cirugía cardíaca (p=0,617). Existen parámetros preoperatorios como insuficiencia renal crónica, tabaquismo y neoplasia (aOR=2,973; p=0,031); y postoperatorios como Score APACHE-II > 19 y Ácido láctico > 2mmol/l (aOR=3,401; p=0,030), que se asocian con dicha susceptibilidad.

Conclusiones: el genotipo TLR-4 rs4986790 AG / GG genera un efecto protector en el desarrollo de shock séptico en pacientes sometidos a cirugía mayor abdominal.

Palabras clave: TLR-4; SNPs; shock séptico; cirugía mayor.

INTRODUCCIÓN

La sepsis se define como una respuesta descontrolada del huésped a la infección que provoca la disfunción de uno o más órganos (1) (Fig.1). Es un cuadro clínico que preocupa a los profesionales sanitarios y la población general por la elevada morbilidad que conlleva, a pesar de los avances en el conocimiento de esta enfermedad, de los modernos medios técnicos surgidos en las unidades de cuidados críticos y de la aparición de nuevos antimicrobianos(2). Esta elevada morbilidad parece pueda ser debida en parte, a la ausencia de un conocimiento preciso y extenso sobre esta enfermedad, que permita tratar de forma dirigida y personalizada a los pacientes que la padecen. Los avances en la investigación molecular podrían comenzar a dar solución a este problema.

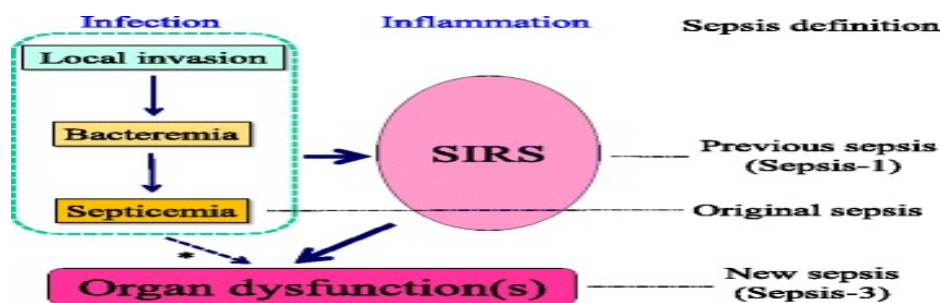


Figura 1: concepto de Sepsis. (1)

Investigadores que estudian sobre el tema, han observado alteraciones moleculares en el sistema inmunitario que condicionan el pronóstico de la sepsis o incluso la predisposición a desarrollarla. Algunas de estas investigaciones se ha centrado en los receptores Toll-like. Los receptores Toll-like (TLRs) son una familia de 13 proteínas de transmembrana, que pertenecen a los llamados receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) del sistema inmunitario innato (3–5). Juegan un papel fundamental en el reconocimiento de estructuras conservadas en los diferentes microorganismos (bacterias, virus, hongos...) (2), que reciben el nombre de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs). Los TLR tienen una estructura compuesta en su parte terminal (extracelular) por un dominio constituido por repeticiones ricas en leucina (LRR) junto a una secuencia flanqueadora rica en cisteína, que conecta con un dominio TIR (Toll/IL-1 Receptor) citoplasmático (intracelular) responsable del inicio de la

señalización. Uno de estos receptores, Toll-Like Receptor 4 (TLR-4) reconoce junto con la proteína MD-2 a los lipopolisacáridos bacterianos (LPS)(5), que son los principales componentes moleculares de la pared celular de bacterias Gram-negativas (Fig.2). El reconocimiento molecular de cantidades mínimas de LPS circulante (endotoxina) por el sistema de receptor TLR4, seguido por la dimerización del receptor en la membrana celular, inicia la cascada de interacciones proteína-proteína que conducen a la producción de citocinas proinflamatorias e interferones, lanzando de esta forma la inflamación y respuestas inmunes (Fig.3).

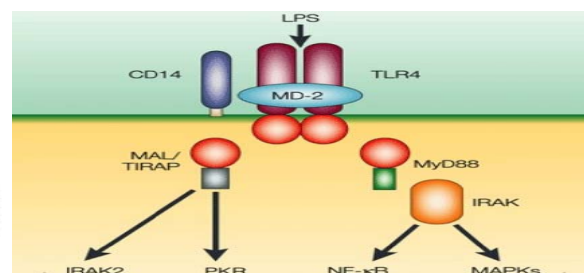
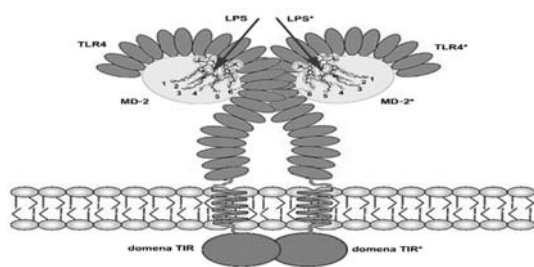


Figura 2: estructura del TLR-4. (5)

Figura 3: cascada inflamatoria derivada de la activación del TLR-4. (7)

Aunque la etiología precisa de la sepsis no está clara, variaciones en el material genético podrían modular la expresión de los receptores TLR-4, e influir en su funcionamiento, modificando así la predisposición a padecer una sepsis. Los polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) son variaciones en la secuencia de ADN que afecta a una sola base nitrogenada de una secuencia del genoma, y afectan al menos al 1% de la población (de lo contrario sería considerado como mutación puntual). Algunos autores incluyen como SNPs los cambios de unos pocos nucleótidos, así como las pequeñas inserciones y deleciones (6). Por tanto, la presencia de SNPs en el gen del receptor TLR4, podría predisponer o proteger a desarrollar una sepsis. Específicamente, el rs4986790 presenta una sustitución de la base de adenina (A) de uno o ambos alelos, por una guanina (G), ciertos estudios han demostrado una asociación en el desarrollo de sepsis.

Ampliar el conocimiento sobre el TLR-4 podría ser interesante en términos de valor clínico, dado que en un futuro se podrían plantear como diana terapéutica en el tratamiento de la sepsis. Por dicha razón, en este estudio vamos a analizar la relación del polimorfismo TLR-4 rs4986790 y la dicha enfermedad.

MATERIAL Y MÉTODOS

Diseño del estudio

Con la aprobación del Comité Ético se ha llevado a cabo un estudio unicéntrico, de casos y controles, en 467 pacientes pertenecientes a una base de datos anonimizada. Todos ellos son mayores de edad, de raza blanca y europeos. Fueron sometidos a cirugía mayor abdominal o cardíaca en el Hospital Clínico Universitario de Valladolid (España) entre abril de 2008 y noviembre de 2012. El grupo de casos consistió en 205 pacientes que desarrollaron shock séptico y el grupo control consistió en 262 pacientes con SIRS.

Datos clínicos

La cirugía mayor se consideró como un procedimiento quirúrgico en el cual cada paciente estaba bajo anestesia general con asistencia respiratoria.

La cirugía cardíaca incluyó cirugía valvular, coronaria y mixta.

La cirugía abdominal incluyó dehiscencia de la herida, perforación, cirugía biliar, isquemia, cirugía pancreática, absceso abdominal y perforación de la vejiga.

Se obtuvieron datos demográficos y clínicos de registros médicos: edad, sexo, tipo de cirugía, comorbilidades como diabetes, tabaquismo, obesidad, enolismo, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, hipertensión arterial, enfermedad renal crónica, neoplasia, enfermedad hepática y cardiopatía.

El bypass cardiopulmonar se llevó a cabo en todas las cirugías cardíacas. La gravedad de la sepsis se evaluó mediante el uso de dos sistemas de puntuación de la UCI calculados dentro de las primeras 24 horas después diagnóstico: (i) Fisiología aguda y evaluación de la salud crónica (Score APACHE II), que consiste en 12 variables fisiológicas y 2 variables relacionadas con la enfermedad, y varía de 0 a 71; (ii) Evaluación Secuencial de Fallas de Órganos (Score SOFA), que está compuesto por 6 variables, cada una representa una falla del sistema de un órgano, y varía de 0 a 24.

Los pacientes fueron evaluados por la presencia de SIRS o shock séptico después de una cirugía mayor durante hospitalización. El diagnóstico de SIRS se realizó durante las primeras 24 horas post-cirugía, el de shock séptico durante todo el tiempo de seguimiento postoperatorio. Se establecieron de acuerdo con

los criterios establecidos por las definiciones internacionales de sepsis SCCM / ESICM / ACCP / ATS / SIS Conferencia.

La administración de catecolaminas se realizó de acuerdo con las directrices para el tratamiento de la sepsis grave y shock séptico.

Las características basales de los pacientes se registraron dentro de las primeras 24 horas después del diagnóstico. Con respecto al shock séptico, la presencia de infección fue documentada por hallazgos microbiológicos positivos y el ácido láctico mayor a 2 mmol/l.

Los pacientes incluidos en el grupo SIRS fueron pacientes que tenían edad y sexo similar al grupo SS. Aquellos pacientes que ni tenían SIRS ni shock séptico fueron excluidos.

Genotipado de ADN

El ADN total se extrajo de la sangre periférica con el kit de preparación de plantilla de PCR alta pura (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania). Las muestras de ADN fueron genotipadas en el español National Genotyping Center (CeGen; <http://www.cegen.org/>) para el polimorfismo TLR-4 rs4986790, utilizando la plataforma MassARRAY de Sequenom (San Diego, CA, EE. UU.) y el ensayo iPLEX® Gold según el protocolo Illumina publicado.

El control de calidad se realizó de acuerdo con los criterios CeGen, que incluye muestras duplicadas en cada placa para verificar réplicas técnicas; controles negativos y positivos en cada lote para excluir la contaminación del ADN y garantizar un proceso de laboratorio técnicamente correcto, respectivamente.

VARIABLES DE RESULTADO

El objetivo final es estudiar el impacto del polimorfismo TLR-4 rs4986790 en el desarrollo de shock séptico y sus diferencias según el tipo de cirugía (cardíaca vs abdominal).

Análisis estadístico

Para la descripción de la población de estudio, se realizan tablas comparativas (Shock vs SIRS y Cirugía cardíaca vs Cirugía abdominal), donde se usaron pruebas no paramétricas: la prueba U de Mann-Whitney para las variables continuas y la prueba Chi-cuadrado para variables categóricas.

Posteriormente, se realizaron análisis de equilibrio Hardy-Weinberg (HWE) computados por el software Haploview 4.2. La significación estadística se obtiene mediante la prueba Chi-cuadrado. Valores numéricos del HWE p-valor ($>0,05$) expresan una muestra biológicamente creíble.

Para el análisis genético, se llevaron a cabo regresiones logísticas para evaluar la relación entre el polimorfismo TLR-4 rs4986790 y variables de resultado (grupo Shock séptico frente a grupo SIRS) en un contexto de modelo genético dominante (AG / GG vs. AA) y subdividiendo en función de la cirugía realizada.

El análisis multivariante de regresión se ajustó por las covariables significativas asociadas (considerando una $p < 0,1$ en este caso), evitando el exceso de ajuste de la regresión. Incluimos el SNP y las características más relevantes por algoritmo por pasos de acuerdo con el resultado de las variables analizadas y tras realizar un análisis de correlación entre las variables significativas.

Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando IBM SPSS Statistics para Windows, Versión 21.0 (IBM Corp, Chicago, Armonk, NY, EE. UU.). La significación estadística se definió como $p < 0.05$.

RESULTADOS

Características de la población de estudio

Las características basales poblacionales de los 205 casos (Shock séptico) y 262 controles (SIRS) se presentan en la **Tabla 1**. El grupo shock séptico tuvo un mayor porcentaje de pacientes con cirugía abdominal ($p<0.001$), cirugía de emergencia ($p<0.001$) y enfermedad renal crónica ($p<0.001$), y un menor porcentaje de neoplasia ($p=0.005$), y cardiopatía ($p<0.001$). Según los scores de gravedad, el grupo shock séptico tenía valores más altos de puntuaciones APACHE II y SOFA que el grupo SIRS ($p<0,001$). Además, a nivel infeccioso, el grupo shock séptico tuvo los porcentajes más altos de infecciones por Gram-negativos (52.7%), peritonitis (46.8%) y neumonías (47.3%). Finalmente, todos los valores analíticos y de mortalidad fueron superiores en el grupo shock séptico ($p<0.001$).

Las características demográficas y clínicas de los pacientes con shock séptico según el tipo de cirugía se muestran en la **Tabla 2**. El shock séptico en la cirugía abdominal se presentó el día de la cirugía, sin embargo, en la cirugía cardíaca se presentó unos días después de la cirugía ($p<0.001$). La duración del soporte respiratorio fue mayor en cirugía cardíaca que abdominal ($p<0.010$). Los pacientes que se sometieron a cirugía abdominal mostraron frecuencias más altas de cirugía urgente ($p<0,001$) y neoplasia ($p=0,001$) que los pacientes que se sometieron a cirugía cardíaca; mientras que encontramos frecuencias más bajas de hipertensión ($p=0.008$), cardiopatía ($p=0.001$) y obesidad ($p=0.044$). En cuanto a las condiciones de infección, el grupo de cirugía abdominal tuvo un mayor porcentaje de peritonitis ($p<0.001$) y un menor porcentaje de bacteriemia del catéter ($p<0.001$), endocarditis ($p<0.001$) y neumonía ($p<0.001$) que el grupo de cirugía cardíaca.

Características del polimorfismo TLR-4 rs4986790

Las frecuencias alélicas y genotípicas para el polimorfismo TLR-4 rs4986790 en la población de estudio se muestran en la **Tabla 3**. Los valores numéricos del HWE p-valor ($>0,05$) expresan una muestra biológicamente creíble. Analizando todos los pacientes (cirugía cardíaca y abdominal), el polimorfismo TLR-4

rs4986790 no se encuentra con el HWE en el grupo Shock séptico ($p=0,092$). De la misma manera, tampoco se encuentra en el grupo Shock séptico si estratificamos solamente en función de la cirugía abdominal ($p=0,072$). Destaca la baja frecuencia del alelo G en población europea (5,7%). Por tanto, el genotipo dominante AG / GG se encuentra en únicamente un 10,7% de la población europea, siendo mayor su frecuencia en el grupo SIRS que Shock séptico (13,3% y 9,7% respectivamente). Centrándonos en el grupo de nuestros casos (Shock séptico), es más frecuente el genotipo dominante AG / GG en ambas cirugías (9,7%) que en los sometidos a cirugía cardíaca (6,9%).

Asociación de polimorfismo TLR-4 rs4986790 con shock séptico

La relación entre el polimorfismo TLR-4 rs4986790 y el desarrollo de shock séptico bajo un modelo de herencia dominante (AG / GG vs AA) se muestra en la **Tabla 4 y Tabla 5**. El análisis univariante no muestra resultados significativos entre el polimorfismo y el desarrollo de shock séptico teniendo en cuenta todos los pacientes, sin embargo, como aparece reflejado en la tabla 4, en los pacientes sometidos a cirugía abdominal con el alelo G dominante (genotipo dominante (AG / GG)) si existe una relación significativa con el desarrollo de shock séptico ($p=0,034$). Por otro lado, el análisis multivariante lo dividimos en condiciones preoperatorias y en condiciones preoperatorios y postoperatorias. En ambos casos muestra que la ausencia del genotipo TLR-4 rs4986790 AG / GG se asocia significativamente con una mayor probabilidad de shock séptico en los pacientes de cirugía abdominal (preoperatorio: aOR=2,973; $p=0,031$. Preoperatorio + postoperatorio: aOR=3,876; $p=0,032$). Por tanto, la presencia del polimorfismo implica una disminución del riesgo, un efecto protector al desarrollo de shock séptico. Los parámetros que se asociaron con el desarrollo del shock séptico fueron neoplasia, tabaquismo e insuficiencia renal crónica en el multivariante preoperatorio, y ácido láctico mayor de 2 mmol/l y APACHE-II mayor de 19 en el multivariante postoperatorio.

Tabla 1: TABLA DE DESCRIPTIVOS: características de los pacientes según tengan SIRS o Shock séptico.

Características	SIRS	Shock Séptico	P- valor
Nº de pacientes	262	205	
Género (masculino)	166 (63%)	131 (64%)	n.s.
Edad (años)	72 (13)	73 (17)	n.s.
Comorbilidades			
Diabetes	50 (19,08%)	26 (12,68%)	n.s.
Cardiopatía	160 (61,06%)	92 (44,87%)	<0,001
EPOC	35 (13,35%)	36 (17,56%)	n.s.
HTA	161 (61,45%)	92 (44,87%)	n.s.
IRC	15 (5,72%)	30 (14,63%)	0,001
Neoplasia	93 (35,49%)	48 (23,41%)	0,005
Obesidad	34 (12,97%)	30 (14,63%)	n.s.
Tabaquismo	38 (14,50%)	36 (17,56%)	n.s.
Hepatopatía	5 (1,90%)	9 (4,39%)	n.s.
Enolismo	10 (3,81%)	15 (7,31%)	n.s.
Cirugía			
Urgente	20 (7,63%)	130 (63,41%)	<0,001
Abdominal	111 (42,36%)	123 (60%)	<0,001
Cardíaca	151 (57,63%)	82 (40%)	<0,001
Gravedad			
Score SOFA	3 (1)	9 (4)	<0,001
SOFA > 6	25 (9,5%)	201 (98%)	<0,001
Score APACHE-II	9 (1)	16 (5)	<0,001
APACHE-II > 19	3 (1,1%)	64 (31,2%)	<0,001
Infección			
Gram positivos	-	102 (49,75%)	n.a.
Gram negativos	-	108 (52,68%)	n.a.
Hongos	-	41 (20%)	n.a.
Bacteriemia catéter	-	70 (34,14%)	n.a.
Herida quirúrgica	-	49 (23,90%)	n.a.
ITU	-	24 (11,70%)	n.a.
Endocarditis	-	10 (4,87%)	n.a.
Peritonitis	-	96 (46,82%)	n.a.
Neumonía	-	97 (47,31%)	n.a.
Analítica			
Leucocitos (cel/mm ³)	10565 (4668)	14570 (11248)	<0,001
PCR (mg/l)	15,1 (48,2)	243 (167)	<0,001
PCT (ng/mL)	0,255 (0,64)	5,045 (16,37)	<0,001
Creatinina (mg/dl)	0,93 (0,4)	1,65 (1,8)	<0,001
Bilirrubina (mg/dl)	0,59 (0,42)	1 (1,33)	<0,001
Ac.Láctico (mg/dl)	20 (17)	26 (24)	<0,001
Ac.Láctico >2 (mmol/l)	150 (57,3%)	143 (69,8%)	0,006
Mortalidad			
Exitus totales	40 (15,26%)	115 (56,09%)	<0,001

Los valores se expresan como mediana (P25th - P75th) y valor absoluto (porcentaje). El P-Valor se calcula mediante la prueba Chi-cuadrado en variables categóricas y Prueba de Mann-Whitney en variables continuas.

Tabla 2: TABLA DE DESCRIPTIVOS: características de los pacientes con shock séptico según el tipo de cirugía (cardíaca, abdominal).

Características	Cardíaca	Abdominal	P-valor
Nº de pacientes	82	123	
Género (masculino)	54 (65,9%)	77 (62,6%)	n.s.
Edad (años)	73 (14)	73 (17)	n.s.
Comorbilidades			
Diabetes	14 (17,1%)	12 (9,8%)	n.s.
Cardiopatía	56 (68,3%)	36 (29,3%)	0,001
EPOC	15 (18,1%)	21 (17,1%)	n.s.
HTA	54 (65,9%)	58 (47,2%)	0,008
IRC	12 (14,6%)	18 (14,6%)	n.s.
Neoplasia	9 (11%)	39 (31,7%)	0,001
Obesidad	17 (20,7%)	13 (10,6%)	0,044
Tabaquismo	14 (17,1%)	22 (17,9%)	n.s.
Hepatopatía	2 (2,4%)	7 (5,7%)	n.s.
Enolismo	5 (6,1%)	10 (8,1%)	n.s.
Gravedad			
Score SOFA	9 (4)	8 (3)	n.s.
SOFA > 6	80 (97,6%)	121 (98,4%)	<0,001
Score APACHE II	15 (5)	17 (7)	n.s.
APACHE-II > 19	20 (24,4%)	44 (35,8%)	<0,001
Cirugía			
Urgente	29 (35,4%)	101 (82,1%)	<0,001
Programada	53 (64,6%)	22 (17,9%)	n.s.
Infección			
Gram positivos	49 (59,8%)	59 (48%)	n.s.
Gram negativos	47 (57,3%)	55 (44,7%)	n.s.
Hongos	15 (18,3%)	26 (21,1%)	n.s.
Bacteriemia catéter	44 (53,7%)	26 (21,1%)	<0,001
Herida quirúrgica	17 (20,7%)	32 (26%)	n.s.
ITU	11 (13,4%)	13 (10,6%)	n.s.
Endocarditis	10 (12,1%)	0 (0%)	<0,001
Peritonitis	0 (0%)	96 (78%)	<0,001
Neumonía	59 (72%)	38 (30,9%)	<0,001

Los valores se expresan como mediana (P25th - P75th) y valor absoluto (porcentaje). El P-Valor se calcula mediante la prueba Chi-cuadrado en variables categóricas y Prueba de Mann-Whitney en variables continuas.

Tabla 3: FRECUENCIAS ALÉLICAS Y GENOTÍPICAS: Polimorfismo TLR-4 rs4986790.

a) Cirugía cardíaca y abdominal:

	SNP	EU	Shock	SIRS	P-valor(a)	P-valor(b)
Nº		503	205	262		
HWE(P-valor)		0,248	0,092	0,052		
Alelos	A	94,3%	93,7%	92,6%	0,827	0,190
	G	5,7%	6,3%	7,4%	-	-
Genotipos	AA	449 (89,3%)	181 (88,3%)	227 (86,6%)	0,749	0,246
	AG	51 (10,1%)	22 (8,9%)	31 (11,8%)	0,674	0,342
	GG	3 (0,6%)	2 (1%)	4 (1,5%)	0,999	0,732

Las variables categóricas se expresan en porcentaje (valor absoluto). Los valores P se calcularon mediante pruebas de Chi-cuadrado. HWE: Equilibrio de Hardy-Weinberg. P-valor (a): entre los casos (shock séptico) y la población europea (EU). P-valor (b): entre los casos (shock séptico) y controles (SIRS).

b) Cirugía abdominal:

	SNP	EU	Shock	SIRS	P-value(a)	P-value(b)
Nº		503	123	111		
HWE(P-value)		0,248	0,072	0,731		
Alleles	A	94,3%	96,3%	91,9%	0,267	0,057
	G	5,7%	3,7%	8,1%	-	-
Genotypes	AA	449 (89,3%)	113 (93,5%)	94 (84,7%)	0,227	0,049
	AG	51 (10,1%)	7 (5,7%)	16 (14,4%)	0,202	0,048
	GG	3 (0,6%)	1 (0,8%)	1 (0,9%)	0,999	1,000

Las variables categóricas se expresan en porcentaje (valor absoluto). Los valores P se calcularon mediante pruebas de Chi-cuadrado. HWE: Equilibrio de Hardy-Weinberg. P-valor (a): entre los casos (shock séptico) y la población europea (EU). P-valor (b): entre los casos (shock séptico) y controles (SIRS).

Tabla 4: ANÁLISIS UNIVARIANTE: pacientes sometidos a cirugía abdominal en función de su genotipo (dominante, recesivo, aditivo).

TLR-4 rs 4986790	ODDS RATIO	IC (95%)	P-valor
Alelo G herencia dominante	2,6	1,075 – 6,289	0,034
Alelo G herencia recesiva	0,902	0,056 – 14,58	0,902

Las variables categóricas se expresan en porcentaje (valor absoluto). Los valores P se calcularon mediante pruebas de Chi-cuadrado. Además, se expresa el Intervalo de confianza al 95% y la Odds ratio.

Tabla 5: ANÁLISIS MULTIVARIANTE: pacientes sometidos a cirugía abdominal con genotipo dominante (AG / GG).

a) Condiciones preoperatorias:

	ODDS RATIO	IC (95%)	P-valor
TLR-4 rs 4986790 AG-GG	2,973	1,103-8,015	0,031
Neoplasia	0,184	0,103-0,329	<0,001
IRC	2,584	0,904-7,383	0,077
Tabaquismo	2,283	0,895-5,801	0,083

Los valores P se calcularon por ajuste de regresión logística para las características clínicas y epidemiológicas más importantes (ver sección de análisis estadístico). Además, se expresa el Intervalo de confianza al 95% y la Odds ratio.

b) Condiciones postoperatorias:

	ODDS RATIO	IC (95%)	P-valor
TLR-4 rs 4986790 AG-GG	3,401	1,126-10,274	0,030
Ac.Láctico > 2 mmol/l	4,305	2,323-7,978	<0,001
APACHE-II > 19	23,611	5,430-102,668	<0,001

Los valores P se calcularon por ajuste de regresión logística para las características clínicas y epidemiológicas más importantes (ver sección de análisis estadístico). Además, se expresa el Intervalo de confianza al 95% y la Odds ratio.

DISCUSION

A lo largo de este estudio, se analiza la influencia del polimorfismo TLR-4 rs4986790 con el desarrollo de shock séptico en pacientes operados de cirugía mayor (cardíaca o abdominal). El hecho principal que se constata, es el efecto protector del polimorfismo TLR-4 rs4986790 con genotipo dominante (AG / GG) y el desarrollo de shock séptico en pacientes sometidos específicamente a cirugía mayor abdominal ($p=0,034$). Sin embargo, esta relación no existe en el total de la población ni con el genotipo recesivo (AA).

El TLR-4 es un receptor transmembranoso, perteneciente a la inmunidad innata, cuya función es reconocer patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs). De forma específica reconoce los lipopolisacáridos bacterianos (LPS) que constituyen el componente principal de la pared bacteriana de las bacterias gram negativas. Seguidamente, estimulan la generación de citoquinas e interferones y con ello una respuesta inflamatoria e inmunitaria (4) (3). Este proceso es crítico en la patogenia de la sepsis y el shock séptico. Además, la susceptibilidad a la sepsis se ha relacionado con variaciones genéticas dentro de este polimorfismo. Con nuestro estudio, podemos establecer la relación del polimorfismo y el desarrollo del shock séptico. Dicha relación ha sido analizada previamente en diferentes estudios: en población asiática se han realizado numerosos estudios sobre el TLR-4, Rui Lui *et al* en un meta análisis llegan a la conclusión de que no existe asociación significativa (8), sin embargo, hay algunos estudios como el de Chen K *et al* que si encuentra una importante relación en el desarrollo de sepsis entre sus 303 pacientes operados de cirugía mayor(9). Un estudio muy interesante, debido a su similitud en los criterios y características de los pacientes (infecciones intraabdominales y neumonías), es el llevado a cabo por Rodriguez-Osorio CA *et al* donde comenta la menor prevalencia del polimorfismo del TLR-4 en población mexicana con respecto a otras y concluye en no encontrar asociación(10). Estudios basados en población europea que encuentren relaciones significativas no son demasiados, a pesar de ello, Jabandziev P *et al* analiza varios SNP, entre los que se encuentra nuestro polimorfismo, en población pediátrica checa llegando a la conclusión de la

existencia de una importante asociación en el desarrollo de la sepsis(11). Además, Kompoti M *et al* en un estudio de 215 pacientes griegos ingresados en unidades de cuidados intensivos encuentra clara asociación entre la sepsis y varios SNP del TLR-4, uno de ellos el rs4986790(12). La limitación de este último estudio es que aparece en enfermos ingresados y que reciben tratamiento médico, sin embargo, no ve asociación en enfermos quirúrgicos.

Realizamos dos análisis multivariantes (preoperatorio: aOR=2,973 y postoperatorio: aOR=3,401), ambos significativos con sus respectivas variables de ajuste. Nos permite comprender que la relación del TLR-4 con la sepsis, además de estar influida directamente por el aspecto genético (rs4986790 AG / GG genera efecto protector), está modificada por condiciones previas del paciente (comorbilidades) y por situaciones postquirúrgicas (Ácido láctico y Score APACHE-II). Tanto en cuanto las condiciones de cada paciente son más graves (postoperatorio), aumenta la aOR comparada a la situación basal previa del paciente. Por tanto, encontramos sentido al estudio, ya comentado, de Kompoti M *et al*, donde aparece relación entre el TLR y el desarrollo de sepsis en pacientes no operados que están en una unidad de cuidados intensivos(12). La discrepancia con nuestro estudio sería su no significación en pacientes operados de cirugía mayor, cuya explicación podría relacionarse con el menor tamaño muestral de enfermos en tales características.

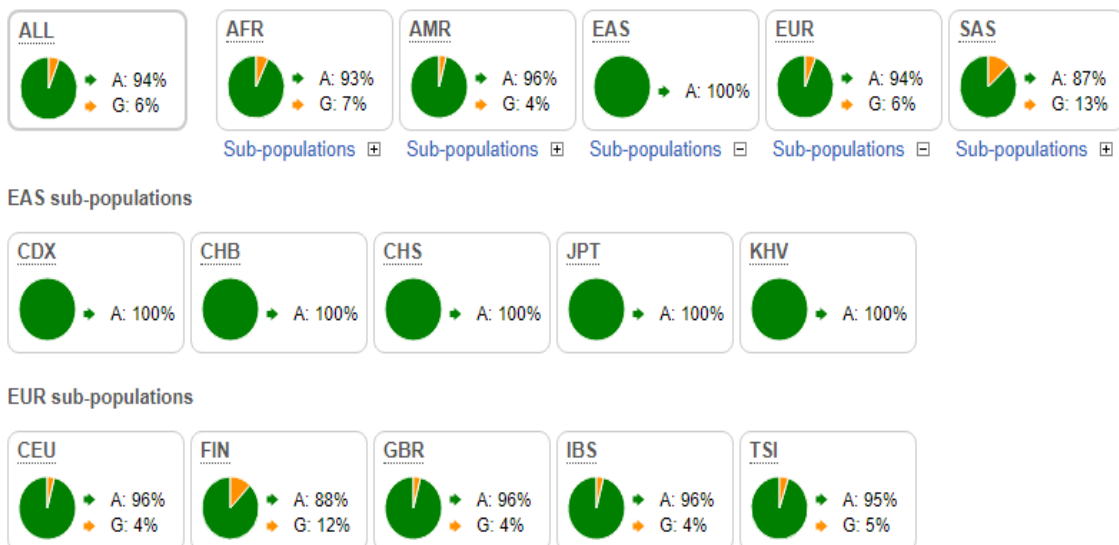


Figura 3: frecuencias alélicas del TLR-4 rs4986790.(13)

Uno de los aspectos importantes acerca del TLR-4 rs4986790 es la distribución a nivel mundial, la cual nos permite dar sentido a los estudios previamente comentados y a nuestro propio resultado en población española (Fig.3). Por un lado, en cualquier población existe una frecuencia enormemente mayor del alelo recesivo (A) que del dominante (G), llegando incluso a la no existencia del alelo G en la población del este de Asia (13).

En nuestro estudio, de los 205 pacientes con Shock séptico únicamente 16 pertenecen a genotipo AG / GG y el resto, 189, son genotipo AA.

Este dato, da sentido a que prácticamente la totalidad de los estudios publicados acerca de este SNP, no encuentran asociación con el desarrollo de la sepsis al no existir pacientes con genotipo AG / GG. Por lo tanto, coincide con el resultado de nuestro análisis univariante, donde con pacientes AA no aparece una relación significativa ($p=0,902$). Con respecto al estudio en población mexicana, acaban concluyendo que no encuentran relación significativa por su frecuencia menor a la media mundial de alelos G, que amplifica el problema de una muestra algo escasa de pacientes. Claramente, podemos evidenciar que en América el alelo G se encuentra en el 4% de la población, por el 6% de la media mundial o la media europea.

Una vez analizadas las frecuencias de cada alelo en las distintas poblaciones, es comprensible la heterogeneidad de los resultados en los diferentes estudios, sobre todo cuando, como en nuestro caso, nos centramos en el genotipo dominante (AG / GG) que tan baja frecuencia presenta.

A pesar de estas dificultades, como se expuso con anterioridad, existen estudios que hablan con significación estadística a favor de la relación del TLR-4 rs4986790 y el shock séptico. Son estudios europeos que por características étnicas se asocian con mayor similitud a nuestra muestra y en los que hay mayor número de enfermos con genotipo dominante. Todos ellos establecen una relación del SNP en su conjunto (dominancia y/o recesividad), no existen publicaciones que hablen directamente a favor únicamente del genotipo dominante como destacamos en este estudio. En el futuro, un tema interesante, sería analizar en muestras de tamaño superior si efectivamente existe una relación con el desarrollo de shock séptico, ya que de la nuestra, de 467

pacientes, como es de esperar, solo 59 son AG / GG (12,6%), casualmente porcentaje superior a la media europea.

Realizamos dos análisis multivariantes (preoperatorio: aOR=2,973 y postoperatorio: aOR=3,401), ambos significativos con sus respectivas variables de ajuste. Nos permite comprender que la relación del TLR-4 con la sepsis, además de estar influida directamente por el aspecto genético (rs4986790 AG / GG genera efecto protector), está modificada por condiciones previas del paciente (comorbilidades) y por situaciones postquirúrgicas (Ácido láctico y Score APACHE-II). Como mencionamos arriba, tanto en cuanto las condiciones de cada paciente son más graves (postoperatorio), aumenta la aOR comparada a la situación basal previa del paciente.

El tipo de cirugía es otra característica que influye completamente en el resultado. Acabamos de explicar cómo la baja frecuencia del alelo G podría explicar las discrepancias entre poblaciones, no la podemos usar para dar sentido a que exista un resultado significativo en la cirugía abdominal en nuestro estudio y, en cambio, no lo sea en la cirugía cardíaca o en ambas juntas.

Para poder darle explicación, debemos evaluar que diferencia a las infecciones postoperatorias de cirugía cardíaca con las de cirugía abdominal. Dado que el TLR-4 reconoce LPS de bacterias gram negativas, son en ellas en las que nos centraremos. Existen estudios que apoyan la idea de que algunas bacterias que infectan a nivel abdominal, podrían tener la capacidad de enmascarar el LPS de modo tal que no pueda ser reconocido por el TLR4. De esta forma, en el intestino, no se generaría una respuesta inflamatoria localizada (que permitiría limitar la infección a la submucosa) y, por tanto, escaparía a la circulación dentro de fagocitos causando la infección sistémica. La superficie luminal del intestino y del colon está continuamente expuesta a bacterias comensales gramnegativas y, por tanto, al LPS, lo que debería inducir la activación de los TLR y la estimulación de la liberación de mediadores proinflamatorios. Sin embargo, las células epiteliales intestinales expresan concentraciones bajas de este tipo de receptores para mantener una situación de ausencia de respuesta(14). Situaciones patológicas autoinmunes, como la enfermedad inflamatoria intestinal, se asocian con una sobreexpresión de algunos TLR (TLR4), dando lugar a una reactividad anormal ante las bacterias de la propia flora, lo que

sugiere que una alteración en la inmunidad innata podría contribuir a la patogenia de la enfermedad(15). Por tanto, en infecciones intestinales, la menor concentración de TLR en el epitelio podría relacionarse con el desarrollo de sepsis de una manera diferente a la generada en otras localizaciones.

En base a lo argumentado, la distribución mundial de frecuencias alélicas del TLR-4 rs4986790 junto con lo descrito en la literatura sobre nuestro tema da sentido a nuestros resultados. Las características diferenciales de la mucosa intestinal con respecto a otras, podría explicar nuestra significación en pacientes sometidos a cirugía abdominal. Sin embargo, para conocer con completa exactitud la razón de los resultados obtenidos y poderlos extrapolar a mayor número de población son necesarios más análisis con mayor tamaño muestral y mayor número de pacientes con genotipo AG / GG.

CONCLUSIÓN

El genotipo TLR-4 rs4986790 AG / GG genera un efecto protector en el desarrollo de shock séptico en pacientes sometidos a cirugía mayor abdominal. Nuestro estudio sugiere la importancia del TLR-4 en la patogenia de la sepsis, donde juega un papel fundamental. Análisis futuros donde se disponga de una mayor muestra de pacientes con tales características y tengan el alelo dominante G (con una frecuencia mundial únicamente del 6%) son necesarios para la confirmación de estos resultados.

BIBLIOGRAFÍA

1. Fujishima S. Organ dysfunction as a new standard for defining sepsis. *Inflamm Regen* [Internet]. 2016 Nov 15;36. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5725936/>
2. Antonelli M, Bonten M, Chastre J, Citerio G, Conti G, Curtis JR, et al. Year in review in Intensive Care Medicine 2011. II. Cardiovascular, infections, pneumonia and sepsis, critical care organization and outcome, education, ultrasonography, metabolism and coagulation. *Intensive Care Med*. 2012 Mar 1;38(3):345–58.
3. Kuzmich NN, Sivak KV, Chubarev VN, Porozov YB, Savateeva-Lyubimova TN, Peri F. TLR4 Signaling Pathway Modulators as Potential Therapeutics in Inflammation and Sepsis. *Vaccines* [Internet]. 2017 Oct 4;5(4). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5748601/>
4. Park BS, Lee J-O. Recognition of lipopolysaccharide pattern by TLR4 complexes. *Exp Mol Med*. 2013 Dec;45(12):e66.
5. Czerkies M, Kwiatkowska K. Toll-Like Receptors and their Contribution to Innate Immunity: Focus on TLR4 Activation by Lipopolysaccharide. *Adv Cell Biol*. 2014 Jan 12;0.
6. National Human Genome Research Institute (NHGRI) [Internet]. National Human Genome Research Institute (NHGRI). [cited 2018 Mar 12]. Available from: <https://www.genome.gov/>
7. Buer J, Balling R. Mice, microbes and models of infection. Vol. 4. 2003. 195 p.
8. Liu R, Mo Y-Y, Wang H-L, Tan Y, Wen X-J, Deng M-J, et al. The relationship between toll like receptor 4 gene rs4986790 and rs4986791 polymorphisms and sepsis susceptibility: A meta-analysis. *Sci Rep* [Internet]. 2016 Dec 13;6. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5154189/>
9. Chen K, Wang Y, Gu W, Zeng L, Jiang D, Du D, et al. Functional significance of the Toll-like receptor 4 promoter gene polymorphisms in the Chinese Han population. *Crit Care Med*. 2010 May;38(5):1292–9.
10. Rodriguez-Osorio CA, Lima G, Herrera-Caceres JO, Villegas-Torres BE, Zuñiga J, Ponce-de-Leon S, et al. Genetic variations in toll-like receptor 4 in Mexican-Mestizo patients with intra-abdominal infection and/or pneumonia. *Immunol Lett*. 2013 Jun 1;153(1):41–6.
11. Jabandziev P, Smerek M, Michalek J, Fedora M, Kosinova L, Hubacek JA, et al. Multiple gene-to-gene interactions in children with sepsis: a combination of five gene variants predicts outcome of life-threatening sepsis. *Crit Care*. 2014;18(1):R1.

12. Kompoti M, Michopoulos A, Michalia M, Clouva-Molyvdas P-M, Germeis AE, Speletas M. Genetic polymorphisms of innate and adaptive immunity as predictors of outcome in critically ill patients. *Immunobiology*. 2015 Mar 1;220(3):414–21.
13. rs4986790 (SNP) - Population genetics - Homo sapiens - GRCh37 Archive browser 91 [Internet]. [cited 2018 Mar 12]. Available from: http://grch37.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Population?db=core;r=9:120474802-120475802;v=rs4986790;vdb=variation;vf=3226044#population_freq_EAS
14. Abreu MT, Vora P, Faure E, Thomas LS, Arnold ET, Arditi M. Decreased expression of Toll-like receptor-4 and MD-2 correlates with intestinal epithelial cell protection against dysregulated proinflammatory gene expression in response to bacterial lipopolysaccharide. *J Immunol Baltim Md* 1950. 2001 Aug 1;167(3):1609–16.
15. Cario E, Podolsky DK. Differential Alteration in Intestinal Epithelial Cell Expression of Toll-Like Receptor 3 (TLR3) and TLR4 in Inflammatory Bowel Disease. *Infect Immun*. 2000 Dec;68(12):7010–7.

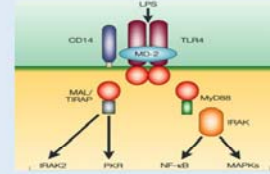
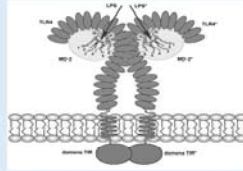
SUSCEPTIBILIDAD DEL TLR-4 EN EL DESARROLLO DE SHOCK SÉPTICO

ALUMNO: ÁLVARO TAMAYO VELASCO
TUTOR: DR JOSÉ MARÍA EIROS BOUZA



INTRODUCCIÓN

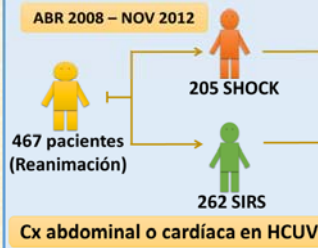
- **SEPSIS:**
 - Elevada morbimortalidad
- **TLR-4:**
 - I. Innata → PRRs → PAMPs → LPS
- **SNP:**
 - TLR-4 rs4986790



OBJETIVO

Relación del polimorfismo TLR-4 rs4986790 y el desarrollo de shock séptico en pacientes post-operados.

Estudio unicéntrico



MATERIALES Y MÉTODOS

Datos clínicos

- Género
- Edad
- Comorbilidades
- Cirugía
- Gravedad
- Analítica
- Infección
- Mortalidad

Bioestadística

Genotipado de DNA

- 1) Descripción
 - 1) Shock – SIRS
 - 2) Cirugía
- 2) Frecuencias alélicas (HWE)
- 3) Regresión
 - 1) Univariante
 - 2) Multivariante

RESULTADOS

1) ANÁLISIS UNIVARIANTE

2) ANÁLISIS MULTIVARIANTE

TLR-4 rs 4986790	OR	IC (95%)	p
Alelo G herencia dominante	2,60	1,08 – 6,29	0,034
Alelo G herencia recesiva	0,90	0,06 – 14,58	0,902

A) CONDICIONES PREOPERATORIAS

TLR-4 rs 4986790 AG-GG	OR	IC (95%)	p
TLR-4 rs 4986790 AG-GG	2,97	1,10-8,02	0,031
Neoplasia	0,18	0,10-0,33	<0,001
IRC	2,58	0,90-7,38	0,077
Tabaquismo	2,28	0,90-5,80	0,083

B) CONDICIONES POSTOPERATORIAS

TLR-4 rs 4986790 AG-GG	OR	IC (95%)	p
TLR-4 rs 4986790 AG-GG	3,40	1,13-10,27	0,030
Ac.Láctico > 2 mmol/l	4,31	2,32-7,98	<0,001
APACHEII > 19	23,61	5,43-102,67	<0,001

CONCLUSIÓN

El genotipo TLR-4 rs4986790 AG / GG (dominante) genera un efecto protector en el desarrollo de shock séptico en pacientes sometidos a cirugía mayor abdominal.

BIBLIOGRAFÍA

- Kuzmich NN, et al. Vaccines. 2017 Oct 4;5(4).
Kompoti M, et al. Immunobiology. 2015 Mar 1;220(3):414–21.
Rodriguez-Osorio CA, et al. Immunol Lett. 2013 Jun 1;153(1):41–6.