

UNIVERSIDAD DE VALLADOLID

Facultad de Medicina



TRABAJO FIN DE GRADO

**“Asociación entre el polimorfismo
rs2794521 de la PCR y riesgo de shock
séptico en pacientes postquirúrgicos”**

Autora: García Rueda, Carmen

Tutoras: Dra. Gómez Sánchez, Esther

Dra. Heredia Rodríguez, María



Junio 2019

INDICE DE CONTENIDOS

1. RESUMEN

2. INTRODUCCIÓN

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Diseño del estudio

3.2. Grupos de control

3.3. Datos clínicos

3.4. Genotipado de ADN

3.5. Variable de estudio

3.6. Análisis estadístico

4. RESULTADOS

4.1. Características de la población de estudio

4.2. Distribución de las frecuencias genotípicas

4.3. Análisis de supervivencia

4.4. Análisis de regresión logística para el genotipo CC del polimorfismo
rs2794521

5. DISCUSIÓN

6. CONCLUSIONES

7. BIBLIOGRAFÍA

ANEXOS

Póster

1. RESUMEN

Introducción: el propósito principal de este estudio es determinar si el polimorfismo de un solo nucleótido rs2794521 del gen de la PCR, relacionado con la inmunidad innata, se asocia al desarrollo de shock séptico después de una cirugía mayor.

Métodos: se realizó un estudio de casos y controles en 507 pacientes que habían sido sometidos a cirugía cardíaca o abdominal en el Hospital Clínico de Valladolid (España). El polimorfismo rs2794521 fue genotipado por MassARRAY. El análisis de asociación se realizó bajo un modelo genético de herencia recesiva (CC vs TT/CT).

Resultados: Se incluyeron un total de 507 pacientes con una edad media de 73 años y un 63% eran hombres. El análisis de supervivencia mostró que a pesar de que la variable CC del polimorfismo se asocia significativamente al desarrollo del shock séptico, la genética no se relacionó de forma estadísticamente significativa con la supervivencia en diferentes puntos de tiempo (a los 7, 28, 60 y 90 días). Los pacientes con el genotipo rs2794521 TT/CT tuvieron probabilidad de supervivencia más alta que el genotipo rs2794521 CC a los 7 días ($p = 0.214$), a los 28 días ($p = 0.49$), a los 60 días ($p = 0.673$) y a los 90 días ($p = 0.669$). El genotipo rs2794521 CC no se asoció con mayor riesgo de muerte relacionada con shock séptico durante los primeros 7, 28, 60 y 90 días. Por tipo de cirugía, ni la cirugía abdominal, ni la cardíaca mostraron algún efecto significativo sobre la mortalidad.

Conclusiones: los pacientes con genotipo rs2794521 TT/CT no tuvieron un mayor riesgo de muerte relacionado con el shock séptico después de cirugía mayor cardíaca o abdominal. Estos hallazgos necesitan una validación en cohortes independientes más grandes.

Palabras clave: PCR; SNPs; Inmunidad innata; Shock séptico; Cirugía mayor.

2. INTRODUCCIÓN

El concepto de sepsis ha evolucionado a lo largo de los años, y actualmente constituye una disfunción orgánica potencialmente mortal causada por una respuesta del huésped desregulada a la infección¹. Los avances en el conocimiento de la fisiopatología de la sepsis involucran no sólo la activación de respuestas inmunológicas pro- y antiinflamatorias sino también modificaciones en vías no inmunológicas.

El inicio de la respuesta inmune innata se produce ante el reconocimiento de patógenos microbianos mediado por receptores de reconocimiento de patrones (PRR), que reconocen estructuras moleculares conservadas, ampliamente compartidas por los patógenos, y que reciben el nombre de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs)². Así, tras el reconocimiento de los PAMPs, los PRRs inician una serie de vías de señalización que ejecutan la primera línea de defensa de las respuestas inmunológicas del hospedador necesarias para controlar las infecciones³.

Aunque la etiología precisa de la sepsis no está clara, variaciones en el material genético podrían modular la expresión de distintos componentes de la respuesta inmune innata, e influir en su funcionamiento, modificando así la predisposición a padecer una sepsis⁴.

Un polimorfismo genético (PG) es una variante alélica que existe de forma estable en una población. Para ser considerado un PG, debe presentar una frecuencia de al menos el 1%⁵.

Se pueden distinguir tres tipos de PG: los polimorfismos de repetición en tándem (VNTR, del inglés *variable number of tandem repeats*), los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP, del inglés *single nucleotide polymorphisms*) y la variación en el número de copias (CNV). Las variaciones genéticas individuales más frecuentes son las que afectan al cambio de una base nitrogenada por otra de ADN: son los llamados polimorfismos genéticos de un solo nucleótido (SNP)⁶. Los SNP pueden estar presentes bien en regiones codificantes del gen y afectar la función de la proteína, provocando un cambio en un aminoácido; o bien ubicarse en regiones no codificadoras, como en la región promotora del gen, variando los niveles de transcripción del gen y produciendo cambios en los niveles de proteína; en intrones (modulando la estabilidad de la proteína), en sitios de *splicing* (sitios donde ocurre la eliminación de intrones y unión de exones) o en regiones intragénicas, lo que puede producir alguna enfermedad o susceptibilidad a ésta. La mayoría de los SNP se encuentran en las regiones no-codificadoras (intrones y promotores) del genoma.

La proteína C reactiva (PCR) (**Figura 1**) es un reactante de fase aguda no específico de enfermedad, que se ha usado durante años para detectar lesiones agudas, infecciones e inflamaciones, así como para evaluar la actividad de las enfermedades inflamatorias⁷. Esta proteína se produce fundamentalmente en el hígado con el control de las citocinas, en especial de la interleucina-6, polipéptido usado como señal celular producida por células activadas, generalmente macrófagos, y originada en el sitio patológico.

La PCR, así llamada por su capacidad de precipitar el polisacárido C de *Streptococcus pneumoniae*, fue la primera proteína de fase aguda descrita y es un buen marcador sistémico de inflamación y daño tisular.

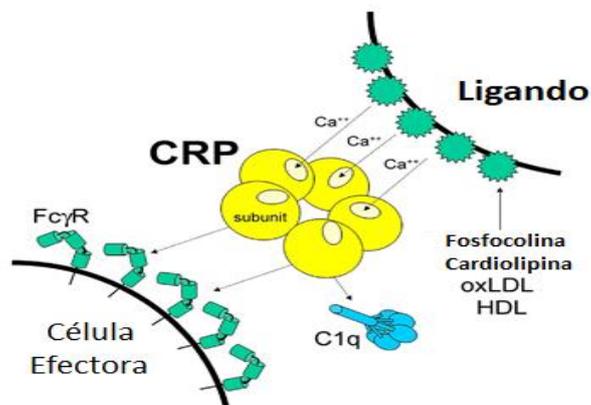


Figura 1. Proteína C Reactiva⁸.

La PCR es codificada por un gen ubicado en el brazo largo del cromosoma 1 (1q21-1q23), y contiene dos exones y un intrón (**Figura 2**), sin embargo, se trata de una región altamente polimórfica, con más de 40 variantes conocidas⁸.

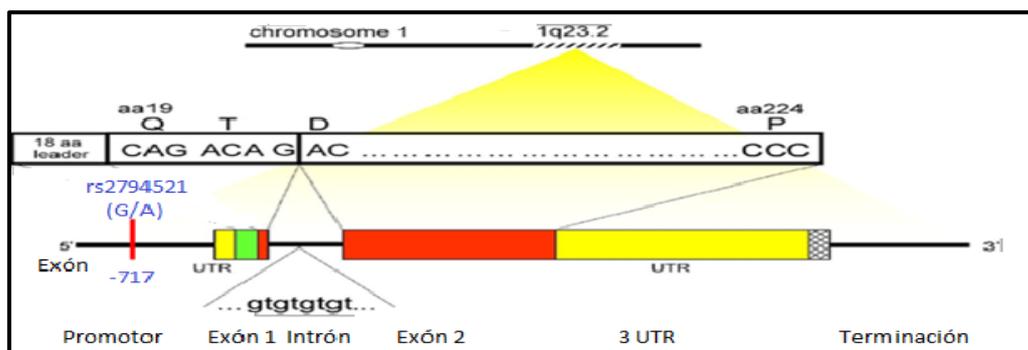


Figura 2. Estructura del gen de la PCR⁸ y posición del SNP rs2794521.

En el gen de la PCR se han descrito un número importante de polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) que además se han asociado con los niveles de PCR

plasmáticos⁹, como puede verse en el el National Center for Biotechnology Information (NCBI) SNP Database (**tabla 1**).

Región Genética	Posición común SNP	Cambio nucleótido	NCBI refSNP ID	Nucleótido asociado con altos niveles de PCR	Estudios de asociación con variaciones de niveles de PCR
Promotor	-757 -717 -409 -390	T>C A>G G>A C>T>A	rs3093059 rs2794521 rs3093062 rs3091244	T A G T	Zee 2004 Lange 2006 Kovacs 2005, Chen 2005 Szalai 2005 Kathiresan 2006, Danik 2007
Intrón	+29	A>T	rs1417938	A	Suk 2005, Miller 2005
Exón 2	+1059	G>C	rs1800947	G	Russell 2004, Balistreri 2006
3'UTR	+219 +1444 +2147 +2911	C>A C>T G>A C>G	rs3093066 rs1130864 rs1205 rs3093068	C T G C	Obisesan 2004 Brull 2003, D'Aiuto 2005 Russell 2004, Miller 2005 Kardys 2006

Tabla 1. Polimorfismos del gen PCR y asociación con niveles de PCR⁹.

Dentro de la región promotora del gen, los SNPs más estudiados y asociados con niveles de PCR son rs2794521 (A>G) y rs3091244 (SNP trialélico C>T>A).

El polimorfismo GT en la región promotora rs2794521 del gen de la PCR se ha asociado con un aumento en la mortalidad en neumonía invasiva por neumococo (^{10,11}). Sin embargo, no se han encontrado estudios en pacientes postquirúrgicos en relación al riesgo de desarrollar diferentes estadios de sepsis, lo cual podría resultar interesante debido a la alta morbilidad de esta entidad y los elevados costes asociados.

Por tanto, el objetivo de nuestro estudio fue valorar la correlación entre ser portador autosómico recesivo (CC vs CT/TT) del polimorfismo rs2794521 del gen de la PCR y el riesgo de sufrir sepsis y shock séptico en el postoperatorio de cirugía abdominal y cardiaca.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Diseño del estudio

Se realizó un estudio observacional retrospectivo, unicéntrico, de casos y controles, en el que se incluyeron un total de 507 pacientes, de los cuales 247 fueron categorizados como shock séptico (grupo caso) de acuerdo con los criterios de la SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference¹². Todos ellos eran blancos europeos, mayores de 18 años y fueron atendidos en el Hospital Clínico Universitario de Valladolid entre el 1 de enero de 2015 y el 31 de diciembre de 2017.

El protocolo del estudio fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital Clínico Universitario de Valladolid y se realizó de conformidad con la Declaración de Helsinki. Los pacientes dieron su consentimiento informado para ser incluidos en el estudio.

3.2. Grupos de control

Se incluyó un grupo de 260 pacientes con síndrome de respuesta inflamatoria sistémica de origen no infeccioso (SRIS, grupo control) que habían sido sometidos a cirugía mayor cardíaca o abdominal. El grupo de control tenía una edad y género similares a los pacientes del grupo de shock séptico y fueron recogidos en las mismas fechas.

Además, se realizó una comparación de las frecuencias alélicas y genotípicas del rs2794521 obtenidas en nuestro estudio, con las de sujetos sanos del Proyecto 1000 Genomas (<http://1000genomes.org/home>¹³). Seleccionamos la población Iberian Population in Spain (IBS) que incluía a 107 individuos.

3.3. Datos clínicos

Se recogieron los datos demográficos y clínicos de forma retrospectiva de registros médicos de todos los pacientes incluidos en el estudio: edad, sexo, hábito tabáquico o de alcohol, obesidad, tipo de cirugía, comorbilidades previas, como la existencia de diabetes, hipertensión, enfermedad renal crónica, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, enfermedad hepática, cardiomiopatía y neoplasia.

Para el análisis de asociación entre el polimorfismo y el riesgo de sufrir shock séptico tras la intervención de cirugía cardíaca y abdominal se seleccionó un modelo de herencia recesiva (CC vs TT/CT).

3.4. Genotipado de ADN

El DNA fue extraído de sangre periférica y las muestras recogidas en tubos de EDTA, correctamente identificadas, fueron enviadas para su análisis al Centro Nacional de Genotipado de España (CeGen; www.cegen.org), donde se realizó un genotipado del polimorfismo mediante la plataforma *MassArray de Agena Bioscience* (San Diego, CA, EE. UU.), utilizando el sistema de diseño de ensayo de iPLEX® Gold.

3.5. Variable de estudio

Se analiza como variable de estudio la susceptibilidad a la infección determinada por el diagnóstico de shock séptico. Se utilizaron cuatro puntos de censura: 7 días (mortalidad muy temprana), 28 días (mortalidad temprana), 60 días (mortalidad media) y 90 días (mortalidad tardía).

3.6. Análisis estadístico

Se utilizaron pruebas no paramétricas para la descripción de la población de estudio: la prueba U de Mann-Whitney para las variables continuas y la prueba exacta de Chi-cuadrado/Fisher para las variables categóricas. Para todos los análisis se definió significación estadística como p-valor $>0,05$. Se realizan tablas comparativas: Shock séptico vs SIRS y cirugía cardíaca vs cirugía abdominal.

Posteriormente se realizan análisis de desviación del equilibrio Hardy-Weinberg (HWE) computados por el software Haploview 4.2. Se estableció el modelo de herencia más apropiado para el polimorfismo mediante los criterios estadísticos de información de Akaike y Bayesiano, eligiendo aquel modelo con menor valor de los mismos y que correspondió al modelo de herencia con una p de menor valor. Se calcularon las OR de asociación entre cada genotipo y la variable resultado y los correspondientes intervalos del 95%.

Para el estudio de asociación genética, se llevaron a cabo regresiones logísticas binarias para evaluar la relación entre el polimorfismo rs2794521 de la PCR y variables de resultado (grupo Shock séptico vs grupo SIRS) en un contexto de modelo genético recesivo (TT/CT vs CC) y subdividiendo en función de la cirugía realizada. Las diferencias de supervivencia por cada genotipo se compararon mediante el test de log-rank. Se evaluó la interacción del polimorfismo con la probabilidad pronóstica prequirúrgica (regresión múltiple hacia delante por método de Wald). El análisis multivariante de regresión de Cox se ajustó por las covariables significativas asociadas evitando el sobreajuste de la regresión. Se incluye 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 fueron realizados utilizando IBM SPSS Statistics para Windows, Versión 21.0 (IBM Corp, Chicago, Armonk, NY, EE.UU.).

4. RESULTADOS

4.1. Características de la población de estudio

Las características demográficas y clínicas de la población de estudio se muestran en la **Tabla 1**. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en relación con la media de edad de los pacientes con diagnóstico de SIRS y shock séptico (9,8% vs 11,5% años, $p = 0,460$) ni con el género (63,4 % vs 63,3%, $p=0,990$).

También se asocia de forma estadísticamente significativa al Shock séptico, mayor proporción de pacientes con insuficiencia renal crónica ($p = 0,001$), mientras que la

existencia de neoplasia ($p = 0,002$) o cardiopatía ($p < 0,001$) se asocia al SIRS de forma estadísticamente significativa.

Respecto al tipo de cirugía, la mayoría de los pacientes en los que se llevó a cabo ésta de forma urgente, fueron diagnosticados de shock séptico (62,5%, $p < 0,001$).

TABLA 1. Características descriptivas de los pacientes de los grupos Shock séptico o SIRS.

VARIABLES	SIRS	Shock séptico	P-valor
Nº de Pacientes	260	247	
Sexo (V)	166 (63,4%)	157 (63,3%)	0,990
Edad (años)	71 (9,8%)	73 (11,5%)	0,460
Comorbilidades			
Fumador	38 (14,5%)	45 (18,1%)	0,266
Enolismo	10 (3,8%)	18 (7,3%)	0,088
Obesidad	34 (13%)	33 (13,3%)	0,912
Diabetes	50 (19,1%)	34 (13,7%)	0,102
Cardiopatía	160 (61,1%)	109 (44%)	<0,001
EPOC	35 (13,4%)	40 (16,1%)	0,377
HTA	161 (61,5%)	139 (56%)	0,215
IRC	15 (5,7%)	37 (14,9%)	0,001
Hepatopatía	5 (1,9%)	11 (4,4%)	0,102
Neoplasia	93 (35,5%)	57 (23%)	0,002
Tipo de cirugía	151 (57,6%)	103 (41,5%)	<0,001
Urgente	20 (7,6%)	155 (62,5%)	<0,001
Tiempo_ intub	-	4 (57,8%)	0,447
Gravedad			
Score SOFA	3 (1,5%)	8 (2,2%)	0,594
APACHE-II	9 (2,6%)	16 (5,5%)	0,861
Infección			
Gram +	-	122 (49,2%)	<0,001
Gram-	-	128 (51,6%)	<0,001
Hongos	-	46 (18,5%)	<0,001
Gram+ solo	2 (0,8%)	42 (16,9%)	<0,001
Gram- solo	4 (1,5%)	53 (21,4%)	<0,001
Mixto	5 (1,9%)	89 (35,9%)	<0,001
Bacteriemia catéter	-	83 (33,5%)	<0,001
Herida quirúrgica	4 (1,5%)	61 (24,6%)	<0,001
ITU	-	29 (11,7%)	<0,001
Endocarditis	-	16 (6,5%)	<0,001
Peritonitis	-	111 (44,8%)	<0,001
Neumonía	-	118 (47,6%)	<0,001

Valores expresados como media y porcentaje; significación estadística $p < 0,05$; SOFA: Sequential Organ Failure Assessment; APACHE: Acute Physiology and Chronic Health Evaluation; ITU: Infección del tracto urinario; EPOC: Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica; HTA: Hipertensión Arterial; IRC: Insuficiencia Renal Crónica.

Tabla 2. Comparativa de los pacientes con shock séptico entre los grupos sometidos a cirugía cardíaca y cirugía abdominal.

VARIABLES	Cardíaca	Abdominal	p-valor
Sexo (Varón)	53 (65,4%)	77 (62,6%)	0,681
Edad (años)	73 (9,3%)	71 (11,9%)	0,798
Comorbilidades			
Fumador	14 (17,3%)	22 (17,9%)	0,912
Enolismo	5 (6,2%)	10 (8,1%)	0,600
Obesidad	16 (19,8%)	13 (10,6%)	0,066
Diabetes	14 (17,3%)	12 (9,8%)	0,115
Cardiopatía	55 (67,9%)	36 (29,3%)	<0,001
EPOC	14 (17,3%)	21 (17,1%)	0,969
HTA	53 (65,4%)	58 (47,2%)	0,010
IRC	12 (14,8%)	18 (14,6%)	0,972
Hepatopatía	2 (2,5%)	7 (5,7%)	0,273
Neoplasia	9 (11,1%)	39 (31,7%)	0,001
Cirugía_Urgente	29 (35,8%)	101 (82,1%)	<0,001
tiempo_intub	6 (48,2)	3 (73,1%)	0,014
Gravedad			
Score SOFA	9 (3,1%)	8 (3,3%)	0,386
APACHE-II	15 (4,9%)	17 (6,5%)	0,160
Infección			
Gram+	47 (58%)	55 (44,7%)	0,063
Gram-	48 (59,3%)	59 (48%)	0,114
Hongos	15 (18,5%)	26 (21,1%)	0,648
Gram+ solo	18 (22,2%)	14 (11,4%)	0,037
Gram-solo	20 (24,7%)	20 (16,3%)	0,138
Mixto	33 (40,7%)	45 (36,6%)	0,550
Bacteremia Cateter	44 (54,3%)	26 (21,1%)	<0,001
Infección sitio Qx	17 (21%)	32 (26%)	0,411
ITU	10 (12,3%)	13 (10,6%)	0,695
Endocarditis	10 (12,3%)	-	<0,001
Peritonitis	-	96 (78%)	<0,001
Neumonía	-	118 (47,6%)	<0,001

Valores expresados como media, porcentaje y desviación típica; significación estadística $p < 0,05$; SOFA: Sequential Organ Failure Assessment; APACHE: Acute Physiology and Chronic Health Evaluation; ITU: Infección del tracto urinario; EPOC: Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica; HTA: Hipertensión Arterial; IRC: Insuficiencia Renal Crónica.

En la **Tabla 2** podemos observar que a la mayor parte de los pacientes intervenidos de cirugía urgente se les realizó cirugía abdominal mayor (82,1%, $p < 0,001$). El tiempo medio de intubación en el grupo sometido a cirugía cardíaca fue de $6 \pm$ y significativamente menor ($3 \pm$ días) en el grupo de pacientes a los que se les realizó cirugía abdominal (48,2% vs 73,1%, $p = 0,014$).

En el grupo intervenido de cirugía cardíaca predominaban los pacientes hipertensos (65,4%) ($p = 0,010$) y la cardiopatía (67,9%) ($p < 0,0010$), mientras que la neoplasia (32,7%) ($p = 0,001$) se asocia con más frecuencia a los grupos intervenidos de cirugía abdominal.

Con respecto a los parámetros infecciosos, la infección por catéter, endocarditis y la producida por Gram + se producen más frecuentemente en los pacientes intervenidos de cirugía cardíaca, mientras que la peritonitis y neumonía lo hacen con la cirugía abdominal, de forma estadísticamente significativa.

4.2. Distribución de las frecuencias genotípicas

Tabla 3. Tabla de frecuencias alélicas y genotípicas de rs2794521_CC según el tipo de cirugía y riesgo de SS o SIRS

Tipo de cirugía			rs2794521_CC		Total	p-valor
			TT/CT	CC		
Total	SIRS	Recuento	243	17	260	0,058
	SS	Recuento	219	28	247	
		% del total	47,4%	62,2%	48,7%	
Abdominal	SIRS	Recuento	105	5	110	0,02
	SS	Recuento	126	19	145	
		% del total	54,5%	79,2%	56,9%	
Cardíaca	SIRS	Recuento	138	12	150	0,816
	SS	Recuento	93	9	102	
		% del total	40,3%	42,9%	40,5%	

Los valores se expresan en n (%); significación estadística $p < 0,05$; SS: Shock Séptico.

En la **Tabla 3** se relaciona el riesgo de sufrir Shock séptico o SIRS tras ser intervenido de cirugía cardíaca y abdominal en base al polimorfismo, entendiendo que la transmisión es recesiva.

Se demuestra una asociación estadísticamente significativa entre el alelo CC del polimorfismo rs2794521 y el shock séptico en los pacientes intervenidos de cirugía abdominal. El 79,2 % de los pacientes portadores del alelo CC sometidos a cirugía abdominal desarrollaron shock séptico. Y sólo 5 de los 24 pacientes portadores del alelo CC presentaron SIRS ($p = 002$).

Las frecuencias de alelos y genotipos para el polimorfismo rs2794521 en pacientes con shock séptico en comparación con poblaciones ibéricas en España a partir de datos del Proyecto 1000 Genomas (<http://www.1000genomes.org/1000-genomes-browsers>) y pacientes SIRS se muestran en la **Tabla 4**. Se verifica que el polimorfismo genotipado se encuentra en equilibrio de Hardy-Weinberg. En general, no se encuentran diferencias significativas en las frecuencias alélicas y genotípicas entre los grupos.

Tabla 4. Distribución de frecuencias alélicas y genotípicas

	SNP	IBS	SIRS	Shock séptico	p-valor ^(a)	p-valor ^(b)
No.		107	260	204		
HWE (p-valor)		-	0,051	0,750		
Alelos	T	72,4%	74%	68,8%	0,684	0,306
	C	27,6%	25,9%	31,1%	-	-
Genotipos	TT	54,2%	54,6%	51,4%	0,481	0,229
	TC	36,4%	38,8%	34,8%	0,730	0,903
	CC	9,3%	6,5%	13,7%	0,490	0,071

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 población (IBS). P-valor (b): entre los casos (shock séptico) y controles (SIRS).

4.3. Análisis de supervivencia

Para el estudio de asociación genética, se seleccionó un modelo de herencia recesiva (CC vs. TT / CT) que era el que mejor se ajustaba a nuestros datos.

Tabla 5. Análisis de supervivencia del polimorfismo rs2794521 en diferentes momentos de tiempo

Puntos de censura (días)	Todos los pacientes %	Polimorfismo de rs2794521		valor p (log-rank test)
		TT/CT (%)	CC (%)	
7 días	93,5	93,9	88,9	0,214
28 días	76,9	77,4	71,1	0,490
60 días	67,8	68,5	60	0,673
90 días	66,8	67,7	57,8	0,669

Significación estadística $p < 0,05$

En la **Tabla 5** se muestran las probabilidades de supervivencia a los 7, 28, 60 y 90 días después del diagnóstico del shock séptico. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la supervivencia en ninguno de los puntos de censura analizados entre el genotipo TT/CT del rs2794521 de la PCR y el genotipo CC del rs2794521 de la PCR.

4.4 Análisis de regresión logística para el genotipo CC del polimorfismo rs2794521

Se realizó un análisis de regresión múltiple, representado en la **Tabla 6**, en el que se incluye el polimorfismo rs2794521-CC y aquellas características más relevantes por

algoritmo mediante pasos, de acuerdo con el resultado de las variables analizadas (cirugía urgente, edad, cardiopatía, hipertensión y neoplasia) en pacientes sometidos a cirugía abdominal. El genotipo CC del rs2794521 de la PCR se mostró como factor de riesgo independiente para el desarrollo de shock séptico, [OR 17,04 (1,69-171,12)], $p=0,016$.

Tabla 6. Regresión logística para shock séptico añadiendo como variable obligatoria el polimorfismo, en pacientes sometidos a cirugía abdominal

	p-valor	OR	I.C. 95% para OR	
			Inferior	Superior
rs2794521-CC	,016	17,04	1,69	171,12
Edad	,000	,903	,85	,95
Cardiopatía	,051	3,91	,99	15,40
HTA	,037	,26	,07	,92
Neoplasia	,080	,39	,13	1,11
Cirugía-Urgente	,000	17,77	5,36	58,87
Constante	,820	1,42		

Significación estadística $p < 0,05$. Valores expresados como OR e Intervalo de confianza al 95%

5. DISCUSIÓN

Los hallazgos más relevantes del presente estudio observacional retrospectivo son:

Características de la población a estudio.

El tipo de pacientes de nuestro estudio fue similar a otros trabajos publicados (¹⁴, ¹⁵). Se incluyeron pacientes con SIRS y shock séptico, sometidos a cirugía cardíaca y abdominal, y no hubo diferencias significativas entre los grupos en cuanto al sexo ni la edad. Además, se incluyó un grupo control a partir de los datos de la IBS en el que se compararon las frecuencias alélicas y genotípicas para el polimorfismo rs2794521 de nuestros pacientes con shock séptico y SIRS, con población blanca española a partir de datos del Proyecto 1000 Genomas, no encontrándose diferencias estadísticamente significativas, por lo que la muestra está en equilibrio de Hardy-Weinberg. Desviaciones de este equilibrio en el grupo de control podrían indicar errores importantes, bien de genotipado, bien de otros factores como son el sesgo de selección o la estratificación de la población. Si se altera la HWE, las inferencias del estudio podrían estar sesgadas¹⁶.

Se observó que la insuficiencia renal crónica está asociada en mayor proporción a pacientes con shock séptico, similar a otros estudios publicados. Del mismo modo, Suárez de la Rica y colaboradores¹⁷, además de otros trabajos, apoyan la relación,

con frecuencia y de manera precoz, del fallo renal agudo con el shock séptico, con un mayor incremento de la mortalidad (18, 19). Además, Vilander LM y colaboradores han comprobado la asociación entre determinados SNP y el fallo renal agudo en pacientes críticos con shock séptico²⁰.

No se hallaron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a parámetros de fallo de órgano ni tipo de microorganismos entre los pacientes intervenidos de cirugía abdominal y cardíaca. Los microorganismos más frecuentemente presentes en los cultivos fueron los Gram negativos, seguidos por Gram positivos y hongos. Encontramos discrepancias con la literatura revisada en pacientes postquirúrgicos cardíacos, ya que los microorganismos con más frecuencia aislados son Gram positivos. Creemos que esta diferencia puede deberse a que no hemos estratificado los focos de infección, y nuestros pacientes con shock séptico son fundamentalmente secundarios a neumonía nosocomial, donde son más frecuentes los microorganismos Gram negativos (21,22).

Distribución de frecuencias alélicas y genotípicas

Comparamos las frecuencias de alelos y genotipos para el polimorfismo rs2794521 en pacientes con shock séptico en relación con poblaciones ibéricas sanas (IBS), y no se encontraron diferencias significativas entre los grupos, lo que indica que no hay sesgo en nuestra cohorte con respecto a la distribución del SNP rs2794521.

Nuestro trabajo confirma una relación estadísticamente significativa entre el genotipo CC del polimorfismo rs2794521 de la PCR y el riesgo de shock séptico en pacientes blancos europeos que se sometieron a cirugía mayor abdominal. No hemos encontrado en la literatura revisada ningún trabajo que describa estos hallazgos en pacientes sometidos a cirugía abdominal o cardíaca.

Tjörvi y colaboradores, describieron la asociación entre algunos SNP del gen de la PCR, entre los que se encontraba el polimorfismo rs279552 de nuestro trabajo, y los niveles de PCR plasmáticos postoperatorios después de cirugía de derivación coronaria, en concreto, en pacientes sometidos a cirugía primaria y electiva de injerto de bypass coronario con bypass cardiopulmonar²³. En dicho estudio se relaciona el aumento en los niveles de PCR plasmáticos postoperatorios con las variantes del gen de la Proteína C Reactiva.

Existen algunos estudios que destacan el valor predictivo de la PCR y complicaciones postoperatorias, como la infección local en apendicitis aguda (Cánovas y colaboradores²⁴), o complicaciones postoperatorias en el día 4 después de cirugía colorrectal en un meta-análisis (Warschkow y colaboradores²⁵, 2012). En muchos

otros, la PCR revela ser un biomarcador específico de la infección que guarda relación con la gravedad del fracaso multiorgánico y la mortalidad²⁶.

Sin embargo, los únicos estudios que se han realizado del polimorfismo rs2794521 de la región promotora del gen de la PCR (Chen y colaboradores²⁷, Carlson y colaboradores²⁸, Wang y colaboradores²⁹ y Kotlega y colaboradores³⁰) asocian el genotipo G/G del polimorfismo con mayor mortalidad en neumonía invasiva por pneumococo y también con el nivel de PCR en plasma y lo relacionan significativamente con enfermedad coronaria.

Análisis de supervivencia

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a supervivencia en ninguno de los puntos de censura estudiados ni para el genotipo TT/CT del rs2794521 de la PCR ni el genotipo CC del rs2794521 de la PCR. Sería interesante estratificar los grupos por tipo de cirugía y realizar el análisis en el futuro.

Los resultados de la revisión bibliográfica arrojan resultados contradictorios, ya que existen trabajos como el de Eklund C y colaboradores que encuentran asociación entre determinados SNP en la región promotora del gen de la PCR y aumento de la mortalidad en pacientes con infección por *S. pneumoniae*³¹. Sin embargo, Mölkänen T y colaboradores¹⁰, observan que la mortalidad no se ve afectada por ninguno de los SNP de la PCR analizados. Existe una diferencia fundamental en cuanto al tipo de pacientes incluidos en los estudios, que no fueron postquirúrgicos, en contraste con nuestra muestra.

Relación entre el genotipo CC del rs2794521 y riesgo de shock séptico en intervenidos de cirugía abdominal mayor

El genotipo CC del rs2794521 de la PCR se mostró como factor de riesgo independiente para el desarrollo de shock séptico en el análisis de regresión múltiple. Es la primera vez que se describe esta relación con respecto a los trabajos publicados hasta la fecha, y es de especial importancia porque muestra asociación entre un genotipo concreto y pacientes postquirúrgicos. Los pacientes blancos europeos portadores del genotipo CC del rs2794521 de la PCR tienen más riesgo de desarrollar shock séptico, lo que implicaría posibilidad de actuar en la prevención o en el tratamiento de esta patología de tan alta prevalencia en un futuro.

Limitaciones del estudio

Se deben tener en cuenta algunas limitaciones para la correcta interpretación de los resultados. En primer lugar, este trabajo tiene un diseño retrospectivo, realizado en un

solo centro y el tamaño de la muestra reducido podría haber limitado los valores estadísticamente significativos entre el polimorfismo rs2794521 y el riesgo de shock séptico. Por lo tanto, sería necesario ampliar el tamaño muestral y realizar un estudio prospectivo con más centros participantes. Sin embargo, algunas de las fortalezas de nuestro estudio son, por un lado, la selección de la muestra, una población homogénea que incluye únicamente pacientes postquirúrgicos y, por otro lado, que se ha seguido un criterio de selección de casos y controles dentro del mismo grupo étnico, evitando falsos positivos.

Por otra parte, la gran mayoría de estudios de asociación de genes candidatos de la inmunidad innata con la sepsis o el shock séptico, han sido con pacientes ingresados en Unidades de Cuidados Intensivos con pacientes médicos, lo que nos limita la posibilidad de establecer elementos comparativos con los resultados de nuestro estudio en pacientes postquirúrgicos.

También nuestros hallazgos no concluyentes en algunos aspectos puedan deberse a que el polimorfismo rs2794521 no actúe solo, sino en sinergia con otros SNP en la región promotora de la PCR o que sea necesaria la asociación de genes candidatos en una población de pacientes postquirúrgicos o con otros factores genéticos³² que contribuyan al riesgo de muerte en el shock séptico.

Por ello sería necesario realizar nuevos estudios que corroboren las asociaciones encontradas.

6. CONCLUSIONES

La presencia del genotipo CC del rs2794521 se ha relacionado con aumento del riesgo de shock séptico en pacientes intervenidos de cirugía abdominal mayor, lo que en un futuro podría permitirnos un manejo más preciso de estos pacientes. Sería preciso realizar nuevos estudios con un mayor número de pacientes para corroborar estas asociaciones.

BIBLIOGRAFIA

- 1 Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, et al. The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (Sepsis-3). *Jama*. 23 de febrero de 2016;315(8):801-810.
- 2 Janeway Jr CA, Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annual review of immunology*. abril de 2002;20(1):197-216.
- 3 Medzhitov R, Janeway Jr C. Innate immunity. *New England Journal of Medicine*. 3 de agosto de 2000;343(5):338-344.
- 4 Tamayo Velasco, A. (2018). *Susceptibilidad del TLR-4 en el desarrollo de shock séptico* (trabajo fin de grado). Universidad de Valladolid, Valladolid.
- 5 Garnacho J, Garnacho MC, Ortiz C, Aldabó T. Genetic polymorphisms in sepsis. *Rev Med Intensiva*. abril de 2005;29(3):185-191.
- 6 Sirgo G, Rello J, Bodi M, Díaz E, Pérez Vela JL, Hernández G, et al. Genetic polymorphism in the critically-ill patient (I). General aspects, inflammation and sepsis. *Rev Med Intensiva*. abril de 2003;27:24-31.
- 7 Hernández M. A. C-reactive protein and atrial fibrillation. an old marker looking for a New target. *Rev Esp Cardiol*. febrero de 2006;59:94-98.
- 8 Hage FG, Szalai AJ. C-reactive protein gene polymorphisms, C-reactive protein blood levels, and cardiovascular disease risk. *Journal of the American College of Cardiology*. 18 de septiembre de 2007;50(12):1115-1122.
- 9 Navarro Sánchez MP. Determinantes genéticos y dietéticos de los niveles de Proteína C reactiva y relación de estos niveles con alteraciones metabólicas en la infancia [tesis doctoral]. Madrid: Laboratorio de Lípidos del IIS-Fundación Jiménez Díaz, Universidad Autónoma de Madrid; 2017.
- 10 Molkänen T, Rostila A, Ruotsalainen E, Alanne M, Perola M, Jarvinen A. Genetic polymorphism of the C-reactive protein (CRP) gene and a deep infection focus determine maximal serum CRO level in *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. Septiembre de 2010;29:1131-1137.
- 11 Gutiérrez Junco SM. (2014). Polymorphisms in genes of innate immunity determine the susceptibility and mortality of severe sepsis and septic shock (Tesis doctoral). Universidad de Valladolid. Valladolid.
- 12 Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D. et al. 2001 sccm/esicm/accp/ats/sis international sepsis definitions conference. *Intensive care medicine*. 1 de abril de 2003;29(4):430-438.
- 13 Genomes Project Consortium. Auton A, Brooks LD, Durbin RM, Garrison EP, Kang HM, Korbel JO, et al. A global reference for human genetic variation. *Nature*. 2015; 526:68-74.
- 14 Jiménez-Sousa MA, Medrano LM, Liu P, Fernández-Rodríguez A, Almansa R, Gómez-Sánchez E, et al. IL-6 rs1800795 polymorphism is associated with septic shock-related death in patients who underwent major surgery: a preliminary

- retrospective study. *Annals of intensive care*. 2017;7(1):22.
- 15 Gao JW, Zhang AQ, Pan W, Yue CL, Zeng L, Gu W, et al. Association between IL-6-174G/C polymorphism and the risk of sepsis and mortality: a systematic review And meta-analysis. *PLoS One*. 2015;10(3):e0118843.
 - 16 Namipashaki A, Razaghi-Moghadam Z, Ansari-Pour N. The essentiality of reporting Hardy-weinberg equilibrium calculations in population-based genetic association studies. *Cell J*. 2015;17:187-192.
 - 17 Suarez-de-La-Rica A, Anillo V, Montero A, Hernandez-Gancedo C, Lopez-Tofiño A, Gilsanz F, et al. Risk factors for acute kidney injury in critically ill patients with complicated intra-abdominal infection. *Journal of critical care*. 2017;38:104-108.
 - 18 Liétor A, Cuadra R, Tenorio T, Liaño F. Ira y Sepsis. Conceptos actuales. *NefroPlus*. 2010;3(3):9-19.
 - 19 Regueira T, Andresen M, Mercado M, Downey P. Physiopathology of acute renal failure during sepsis. *Med Intensiva*. 2011;35(7):424-432.
 - 20 Vilander LM, Kaunisto MA, Vaara ST, Pettilä V, FINNAKI Study Group Genetic variants in SERPINA4 and SERPINA5, but not BCL2 and SIK3 are associated with acute kidney injury in critically ill patients with septic shock. *Crit. Care*. 2017;21:47.
 - 21 Kotnis-Gaska A, Mazur P, Olechowska-Jarzab A, Stanisiz A, Bulanda M, Undas A. Sternal wound infections following cardiac surgery and their management a single-centre study from the years 2016-2017. *Kardiochir Torakochirurgia Pol*. Junio de 2018;15(2):79-85.
 - 22 Walter J, Haller S, Quinten C, Kärki T, Zacher B, Eckmanns T. Healthcare-associated pneumonia in acute care hospitals in European Union/European Economic Area countries: an analysis of data from a point prevalence survey, 2011 to 2012. *Eurosurveillance*. 2018;23(32).
 - 23 Perry TE, Muehlschlegel J, Liu KY, Fox A, Collard CD, Body D et al. C-Reactive protein gene variants are associated with postoperative C-reactive protein levels after coronary artery bypass surgery. *BMC medical genetics*. 2009;10(1):38.
 - 24 Cánovas N, Vera M, Candia R, Astroza G, Baksai K, Messenger K. Proteína C Reactiva como predictor en complicaciones postoperatorias en apendicitis aguda. *Rev. Chilena de cirugía*. 2003;55(6):628-630.
 - 25 Warschkow R, Beutner U, Steffen T, Muller S, Schimied B, Guller U et al. Safe and early discharge after colorectal surgery due to C-reactive protein: a diagnostic meta-analysis of 1832 patients. *Annals of Surgery* 2012;256(2):245-250.
 - 26 Lobo S, Lobo F, Peres D, Lopes-Ferreira F, Soliman H, Melot C. Los niveles de proteína C reactiva se correlacionan con la mortalidad y la insuficiencia orgánica en pacientes críticamente enfermos. *Cofre*. 2003;123:2043-2049.
 - 27 Chen J, Zhao J, Huang J, Su S, Qiang B, Gu D. -717A>G polymorphism of human C-reactive protein gene associated with coronary heart disease in ethnic Han Chinese: the Beijing atherosclerosis study. *J Mol Med (Berl)*. enero de

- 2005;83(1):72-78.
- 28 Carlson CS, Aldred SF, Lee PK, Tracy RP, Schwartz SM, Rieder M et al. Polymorphisms within the C-reactive protein (CRP) promoter region are associated with plasma CRP levels. *The American Journal of Human Genetics*. 2005;77(1):64-77.
 - 29 Wang L, Lu X, Li Y, Li H, Chen S, Gu D. Functional analysis of the C-reactive protein (CRP) gene-717A> G polymorphism associated with coronary heart disease. *BMC Medical genetics*. 2009;10(1):73.
 - 30 Kotłęga D, Białecka M, Kurzawski M, Drożdżik M, Ciećwież S, Gołąb-Janowska M, Nowacki et al. Risk factors of stroke and -717A>G (rs2794521) CRP gene polymorphism among stroke patients in West Pomerania province of Poland. *Neurol. Neurochir. Pol*. 2014;48:30-34.
 - 31 Eklund C, Huttunen R, Syrjänen J, Laine J, Vuento R, Hurme M. Polymorphism of the C-reactive protein gene is associated with mortality in bacteraemia. *Scand J Infect Dis* 2006;38(11-12):1069-1073.
 - 32 Jiménez-Sousa MA, Liu P, Medrano LM, Fernández-Rodríguez A, Almansa R, Gómez-Sánchez E, et al. Association of CD14 rs2569190 polymorphism with mortality in shock septic patients who underwent major cardiac or abdominal surgery: A retrospective study. *Scientific reports*. 2018;8(1):2698.

ANEXOS

Póster

ASOCIACIÓN ENTRE EL POLIMORFISMO rs2794521 DE LA PCR Y RIESGO DE SHOCK SÉPTICO EN PACIENTES POSTQUIRÚRGICOS

García Rueda, Carmen¹, Dra. Gómez Sánchez, Esther², Dra. Heredia Rodríguez, María²

¹Estudiante Facultad de Medicina.

²Departamento de Anestesiología y Reanimación, Hospital Clínico Universitario, Valladolid



Universidad de Valladolid

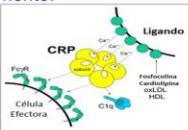
INTRODUCCIÓN

La sepsis constituye una disfunción orgánica potencialmente mortal causada por una respuesta del huésped desregulada a la infección, resultando ser la primera causa de muerte por infección, especialmente si no es diagnosticada y tratada precozmente.

La proteína C reactiva (PCR) es un reactante de fase aguda no específico de enfermedad.

En el gen de la PCR se han descrito un número importante de polimorfismos de un solo nucleótido (NNPs) que se han asociado con los niveles de PCR Plasmáticos.

Algunos SNP de la PCR (como el GT, situado en la región promotora rs2794521 del gen de la PCR), se ha asociado con aumento de mortalidad en neumonía invasiva por neumococo, sin embargo, no se han encontrado estudios en pacientes postquirúrgicos en relación al riesgo de desarrollar diferentes estados de sepsis, lo cual podría resultar interesante debido a la alta morbimortalidad de esta entidad y los elevados costes asociados.



Proteína C Reactiva

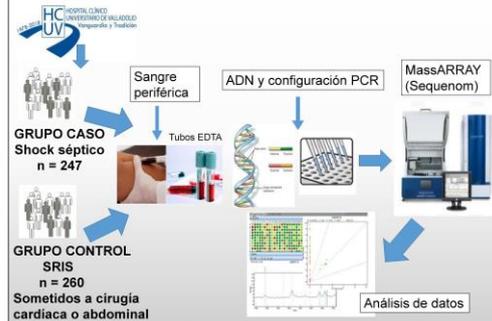


Estructura del gen de la PCR y posición del SNP rs2794521

OBJETIVOS

Determinar si el polimorfismo de un solo nucleótido rs2794521 del gen de la PCR, relacionado con la inmunidad innata, se asocia al desarrollo de shock séptico después de una cirugía mayor.

MATERIAL Y MÉTODOS



RESULTADOS

1. CARACTERÍSTICAS DESCRIPTIVAS DE LOS PACIENTES DE LOS GRUPOS SS o SIRS

VARIABLES	SIRS	Shock séptico	P-valor
Nº de Pacientes	260	247	
Sexo (V)	166 (63,4%)	157 (63,3%)	0,990
Edad (años)	71 (9,8%)	73 (11,5%)	0,460
Comorbilidades			
Fumador	38 (14,5%)	45 (18,1%)	0,266
Etnismo	10 (3,8%)	18 (7,3%)	0,088
Obesidad	34 (13%)	33 (13,3%)	0,912
Diabetes	50 (19,1%)	34 (13,7%)	0,102
Cardiopatía	160 (61,1%)	109 (44%)	<0,001
EPOC	35 (13,4%)	40 (16,1%)	0,377
HTA	161 (61,5%)	139 (56%)	0,215
IRC	15 (5,7%)	37 (14,9%)	0,001
Hepatopatía	5 (1,9%)	11 (4,4%)	0,102
Neoplasia	93 (35,5%)	57 (23%)	0,002
Tipo de cirugía	151 (57,6%)	103 (41,5%)	<0,001
Urgente	20 (7,6%)	15 (6,2,5%)	<0,001
Tiempo_intub		4 (57,8%)	0,447
Gravedad			
Score SOFA	3 (1,5%)	8 (2,2%)	0,594
APACHE-II	9 (2,6%)	16 (5,5%)	0,851
Infección			
Gram +	-	122 (49,2%)	<0,001
Gram-		128 (51,6%)	<0,001
Hongos		46 (18,5%)	<0,001
Gram+ solo	2 (0,8%)	42 (16,9%)	<0,001
Gram- solo	4 (1,5%)	53 (21,4%)	<0,001
Mixto	5 (1,9%)	89 (35,9%)	<0,001
Bacteriemia catéter		83 (33,5 %)	<0,001
Herida quirúrgica	4 (1,5%)	61 (24,6%)	<0,001
ITU		29 (11,7%)	<0,001
Endocarditis		16 (6,5%)	<0,001
Peritonitis		111 (44,8%)	<0,001
Neumonía		118 (47,6%)	<0,001

Valores expresados como media y porcentaje; significación estadística p < 0,05; SOFA Sequential Organ Failure Assessment; APACHE-II Acute Physiology and Chronic Health Evaluation; ITU: Infección del tracto urinario; EPOC: Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica; HTA: Hipertensión Arterial; IRC: Insuficiencia Renal Crónica; SS: Shock Séptico; SIRS: Síndrome de Respuesta Inflamatoria Sistémica.

2. FRECUENCIA DE ALELOS Y GENOTIPOS PARA EL POLIMORFISMO rs2794521 SEGÚN EL TIPO DE CIRUGÍA Y RIESGO DE SS O SIRS.

Tipo de cirugía	rs2794521_CC		Total	p-valor
	TT/CT	CC		
Total	SIRS Recuento 243	17	260	0,058
	SS Recuento 219	28	247	
	% del total 47,4%		62,2%	48,7%
Abdominal	SIRS Recuento 105	5	110	0,02
	SS Recuento 126	19	145	
	% del total 54,5%		79,2%	56,9%
Cardíaca	SIRS Recuento 138	12	150	0,816
	SS Recuento 93	9	102	
	% del total 40,3%		42,9%	40,5%

Los valores se expresan en n (%); significación estadística p < 0,05; SS: Shock Séptico

4. ANÁLISIS DE SUPERVIVENCIA DEL POLIMORFISMO rs2794521

Puntos de censura (días)	Todos los pacientes de Polimorfismo rs2794521		valor p (log-rank test)
	TT/C (%)	CC (%)	
7 días	93,5	93,9	88,9
28 días	76,9	77,4	71,1
60 días	67,8	68,5	60
90 días	66,8	67,7	57,8

Significación estadística p < 0,05

5. REGRESIÓN LOGÍSTICA PARA SHOCK SÉPTICO AÑADIENDO COMO VARIABLE OBLIGATORIA EL POLIMORFISMO, EN PACIENTES SOMETIDOS A CIRUGÍA ABDOMINAL

	p-valor	OR	I.C. 95% para OR	
			Inferior	Superior
rs2794521-CC	,016	17,04	1,69	171,12
Edad	,000	,903	,85	,95
Cardiopatía	,051	3,91	,99	15,40
HTA	,037	,26	,07	,92
Neoplasia	,080	,39	,13	1,11
Cirugía-Urgente	,000	17,77	5,36	58,87
Constante	,820	1,42		

Significación estadística p < 0,05. Valores expresados como OR e Intervalo de confianza al 95%

CONCLUSIONES

- La presencia del genotipo CC del rs2794521 se ha relacionado con aumento del riesgo de shock séptico en pacientes intervenidos de cirugía abdominal mayor, lo que en un futuro podría permitirnos un manejo más preciso de estos pacientes.
- El genotipo CC del rs2794521 de la PCR se mostró como factor de riesgo independiente para el desarrollo de shock séptico.
- Sería necesario realizar nuevos estudios con un mayor número de pacientes para corroborar estas asociaciones.

BIBLIOGRAFÍA

